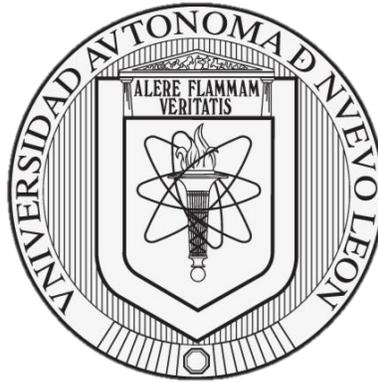


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EFFECTO DE UNA EMULSIÓN W/O CON EXTRACTO DE
Haematococcus pluvialis EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL
ACEITE DE AGUACATE (*Persea americana* Mill)**

POR

L.C.A Melissa Montserrat Gallegos Garza

como requisito para obtener el grado de Maestría en Manejo y Aprovechamiento Integral
de Recursos Bióticos.

2024

**EFFECTO DE UNA EMULSIÓN W/O CON EXTRACTO DE *Haematococcus pluvialis*
EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE AGUACATE (*Persea
americana* Mill)**

COMITÉ DE TESIS



Dr. Juan Gabriel Báez González

Director



Dra. Mayra Zulema Treviño Garza

Secretario



Dra. Claudia Tomasa Gallardo Rivera

Vocal 1



Dr. Carlos Abel Amaya Guerra

Vocal 2



Dr. Sergio Arturo Galindo

Vocal 3



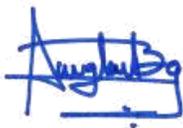


Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirectora de Posgrado

**EFFECTO DE UNA EMULSIÓN W/O CON EXTRACTO DE *Haematococcus pluvialis*
EN LA ESTABILIDAD OXIDATIVA DEL ACEITE DE AGUACATE (*Persea
americana* Mill)**

DIRECCIÓN DE TESIS



Dr. Juan Gabriel Báez González

Director



Dr. Eristeo García Márquez

Director externo

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por EL Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías. CONAHCyT con número de becario: 813627

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCyT por el financiamiento de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Facultad de Ciencias Biológicas y al CIATEJ unidad noreste, por apoyarme en la realización de mis estudios y experimentos.

Al Dr. Juan Gabriel Báez González, por guiarme en cada paso desde la licenciatura hasta el día de hoy.

Al Dr. Eristeo García Márquez, por sus enseñanzas y apoyo.

A la Dra. Claudia Gallardo Rivera, Dr. Carlos Amaya, Dra. Mayra Treviño, Dr. Sergio Galindo, Dra. Daniela Herrera, miembros del comité de tesis, por su apoyo, consejos y aportes en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. José Rodríguez, por sus enseñanzas y apoyo en la realización de experimentos.

A mis compañeras de posgrado Luisa, Paola e Itzel por compartir sus conocimientos, experiencias, consejos y buenos momentos que pasamos.

A mis amigas, Sofía, Brenda y Karen por su amistad incondicional, apoyo, consejos y cariño.

A mi papá y mi mamá, gracias por apoyarme en cada decisión y ser mi fuente inagotable de apoyo, inspiración y amor incondicional.

A mis hermanos Victor y Nena por cuidarme e impulsarme a dar siempre lo mejor de mí.

A Scarlet, Nu, Juno, Eevee y Mia por hacerme feliz cada día.

Al personal del departamento de alimentos por abrirme las puertas y haberme permitido realizar mi trabajo.

DEDICATORIA

A mi familia, el faro que ilumina mi camino en cada paso.

ÍNDICE

RESUMEN.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Aceite de aguacate.....	18
2.2 Aceites enriquecidos.....	20
2.3 Carotenoides.....	21
2.4 Astaxantina y <i>Haematococcus pluvialis</i>	22
2.6 Emulsiones.....	23
2.6.1 Emulsiones simples.....	24
2.6.2 Emulsiones agua en aceite (w/o).....	24
2.6.2 Emulsiones múltiples.....	25
2.6.3 Estabilidad.....	25
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 MATERIALES.....	30
6.2 MÉTODOS.....	30
6.2.1 Extracción de aceite de aguacate Hass.....	30
6.2.2 Características físicoquímicas.....	31
6.2.3 GC-MS análisis: determinación del perfil de ácidos grasos.....	31
6.2.4 Extracto de <i>H. pluvialis</i>	31
6.2.5 Caracterización de extracto de <i>H. pluvialis</i> : HPLC.....	32
6.2.6 Carotenoides totales.....	32
6.2.7 Capacidad antioxidante ABTS ^{•+}	33
6.2.8 Capacidad antioxidante DPPH ^{•+}	35
6.2.10 Índice de peróxidos (IP) en el aceite de aguacate.....	36
6.2.11 Método de TBARS (Valor de ácido tiobarbitúrico) en el aceite de aguacate ...	37
6.2.12 Estudio cinético.....	37
6.2.14 Proceso de elaboración de la emulsión (w/o $\phi=0.08$).....	37

6.2.15 Caracterización de la emulsión: estabilidad física (micrografías 100x y tamaño de partícula).....	38
6.2.16 Análisis estadístico.....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
7.1 Obtención del aceite de aguacate.....	40
7.2 Extracciones de <i>H. pluvialis</i>	42
7.3 Aceite de aguacate con extracto de <i>H. pluvialis</i>	47
7.4 Estabilidad oxidativa de aceites adicionados con extracto de <i>H. pluvialis</i>	47
7.5 Índice de peróxidos a diferentes temperaturas de almacenamiento.....	50
7.6 Malonaldehído a diferentes temperaturas de almacenamiento.....	51
7.7 Actividad antioxidante de aceites con <i>H. pluvialis</i>	54
7.8 Caracterización de la emulsión: estabilidad física.....	56
7.9 Aceites con emulsiones.....	61
7.10 Estabilidad oxidativa de aceites con emulsiones.....	61
7.11 Actividad antioxidante de aceites adicionados con emulsiones.....	66
8. CONCLUSIONES.....	68
9. PERSPECTIVAS.....	69
10. BIBLIOGRAFÍA.....	70
11. ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos en el aguacate Hass mexicano.....	18
Tabla 2. Ejemplos de algunos carotenoides y sus fuentes.....	21
Tabla 3. Concentración de extracto de <i>H. pluvialis</i> en el aceite de aguacate.....	36
Tabla 4. Formulaciones de emulsiones.....	38
Tabla 5. Rendimientos del aceite de aguacate.....	40
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del aceite de aguacate.....	41
Tabla 7. Perfil de ácidos grasos en aceite de aguacate.....	42
Tabla 8. Extracciones de <i>H. pluvialis</i>	42
Tabla 9. Actividad antioxidante y carotenoides de <i>H. pluvialis</i> (peso seco), a distintas potencias ultrasónicas.....	46
Tabla 10. Actividad antioxidante y carotenoides totales de extracto oleoso de <i>H. pluvialis</i> obtenido a 80% de potencia ultrasónica	46
Tabla 11. Productos de la oxidación primaria: Índice de peróxidos: parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate, con distintos tratamientos.....	54
Tabla 12. Productos de la oxidación avanzada (Malonaldehído): parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate, con distintos tratamientos.....	54
Tabla 13. Productos de la oxidación primaria: Índice de peróxidos: parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsión.....	65
Tabla 14. Productos de la oxidación secundaria (Malonaldehído): parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsión.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	22
Figura 2. Obtención del aceite de aguacate.....	40
Figura 3. Espectro UV de barrido de estándar de astaxantina y extractos de <i>H. pluvialis</i> ...43	
Figura 4. Concentración de astaxantina (mg/g) en el extracto seco de <i>H. pluvialis</i> determinados por HPLC.....	44
Figura 5. Cromatograma HPLC (DAD, 480 nm) de extractos de <i>H. pluvialis</i> a distintas potencias ultrasónicas.....	45
Figura 6. Extracto oleoso de <i>H. pluvialis</i>	46
Figura 7. Aceite de aguacate con distintas concentraciones de extracto de <i>H. pluvialis</i> , TBHQ y astaxantina.....	47
Figura 8. Oxidación primaria: Índice de peróxidos de aceite de aguacate (control) y muestras adicionadas con antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C.	50
Figura 9. Oxidación avanzada: producción de Malonaldehído (MDA) del aceite de aguacate (control) y con distintos antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C.....	51
Figura 10. Comparación de la oxidación primaria y avanzada de (a) índice de peróxidos y (b) Malonaldehído (MDA) en el aceite de aguacate con distintos antioxidantes, a 150°C.....	52
Figura 11. Actividad antioxidante ABTS (a) y DPPH (b) del aceite de aguacate con distintos antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C.....	55
Figura 12. Emulsiones a distintas temperaturas 25, 45 y 65°C monitoreadas durante 36 días.....	56
Figura 13. Micrografías 100x de las emulsiones a 25°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.....	57
Figura 14. Micrografías 100x de las emulsiones a 45°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.....	57
Figura 15. Micrografías 100x de las emulsiones a 65°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.....	58
Figura 16. Gráfico del tamaño de partícula ($d_{3,2}$) al paso del tiempo de las emulsiones...60	
Figura 17. Fotografías tomadas a los aceites con emulsión, almacenados a 25°C en presencia de luz.....	61

Figura 18. Oxidación primaria: Índice de peróxidos en aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento 25°C, 45°C y 65°C.	63
Figura 19. Oxidación avanzada: producción de Malonaldehido (MDA) del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C	64
Figura 20. Actividad antioxidante ABTS (a) y DPPH (b) del aceite de aguacate con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C.....	67
Figura 21. Curva de calibración para el método ABTS.....	82
Figura 22. Curva de calibración para el método DPPH.....	83
Figura 23. Curva de calibración para el método TBARS expresado como μM eq TEP (Tetraetoxipropano).....	84
Figura 24. Curva de calibración astaxantina por el método HPLC.....	85

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

μM	Micromolar
mM	Milimolar
TEAC	Actividad antioxidante equivalente a trolox
nm	Nanómetros
Kg	Kilogramo
Meq O ₂ /Kg	Miliequivalentes de oxígeno por Kilogramo
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
mL	Mililitros
L	Litro
g	Gramo
%	Porcentaje
MDA	Malonaldehido
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	Butilhidroxianisol
TBHQ	Terbutilhidroquinona
p/v	Relación peso/volumen
pO ₂	Presión parcial de oxígeno
EGCG	Galato de epigallocatequina
w/o	Emulsión agua en aceite
o/w	Emulsión aceite en agua
w/o/w	Emulsión múltiple agua en aceite en agua
o/w/o	Emulsión múltiple aceite en agua en aceite
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
IA	Índice de acidez
RD	Densidad relativa
IR	Índice de refracción

IP	Índice de peróxidos
N	Normalidad
V	Volumen
kJ	Kilo joule
K	Grados kelvin
J	Joules
ppm	Partes por millón
mm	Milímetros
mbar	Milibares
TEP	Tetraetoxipropano
Ea	Energía de activación
k	Constante de velocidad
R ²	Coefficiente de regresión
A	Aceite de aguacate sin antioxidantes
AT	Aceite de aguacate con 80 ppm de TBHQ
A100	Aceite de aguacate con 100 ppm de <i>H. pluvialis</i>
A500	Aceite de aguacate con 500 ppm de <i>H. pluvialis</i>
A1000	Aceite de aguacate con 1000 ppm de <i>H. pluvialis</i>
AX	Aceite de aguacate con 400 ppm de astaxantina
EC	Emulsión control
EAT	Emulsión con TBHQ
EAH	Emulsión con extracto de <i>H. pluvialis</i>
EAHC	Emulsión con <i>H. pluvialis</i> y catequina
C	Aceite + emulsión control
AT	Aceite + emulsión con TBHQ
AH	Aceite + emulsión con <i>H. pluvialis</i>
AHC	Aceite + emulsión con <i>H. pluvialis</i> y catequina

RESUMEN

En los últimos años, la obtención de aceite de aguacate cobra una relevancia particular en México, debido a que ostenta el liderazgo en la producción mundial de aguacate, alcanzando una cifra anual de 1.6 millones de toneladas.

El aceite de aguacate ha experimentado un notable aumento en su demanda, impulsado por el creciente interés en los alimentos funcionales. Este aceite ha capturado la atención por su perfil nutricional, destacando su riqueza en ácidos grasos insaturados, conocidos por sus beneficios para la salud cardiovascular y sus propiedades antiinflamatorias. No obstante, la presencia de estas insaturaciones lo hace más susceptible a la oxidación. Este proceso puede afectar adversamente tanto la calidad del aceite como su valor nutricional.

Para abordar este desafío, se busca la ayuda de antioxidantes obtenidos de fuentes naturales, como la astaxantina, un carotenoide del alga *Haematococcus pluvialis*. Este estudio se enfoca en retardar la oxidación del aceite de aguacate utilizando antioxidantes estabilizados en una emulsión agua en aceite, logrando así un aceite que cumple con estándares de calidad físicoquímicos. La combinación de carotenoides con otros antioxidantes, como polifenoles, se plantea como una estrategia efectiva contra la oxidación y el estrés oxidativo.

La emulsión con extracto de alga (AH) muestra una reducción del 26% en la formación de peróxidos en el aceite de aguacate, mientras que la emulsión con TBHQ (AT) logra una disminución del 29%, lo que indica que AH no supera el efecto de TBHQ. La emulsión AHC, que incorpora carotenoides y catequina, se destacó como un aditivo antioxidante natural, disminuye la formación de peróxidos en un 57% respecto al control. Dicha emulsión es una opción efectiva para sustituir el uso de antioxidantes sintéticos, como una alternativa para la industria alimentaria. Esto, no solo representa un avance significativo en la industria de alimentos y aceites, sino también una respuesta prometedora a las demandas del mercado. La emulsión AHC ofrece una alternativa natural y efectiva a los antioxidantes sintéticos, respondiendo a la creciente preferencia de los consumidores por productos más saludables y naturales. En resumen, este estudio tiene el potencial de impulsar la producción de aceite de aguacate de alta calidad y satisfacer la creciente demanda de los consumidores en busca de opciones más saludables y naturales.

ABSTRACT

In recent years, the production of avocado oil has become particularly relevant in Mexico, since it is the world leader in avocado production, reaching an annual figure of 1.6 million tons.

Avocado oil has experienced a notable increase in demand, driven by the growing interest in functional foods. This oil has captured attention for its nutritional profile, highlighting its richness in unsaturated fatty acids, known for their cardiovascular health benefits and anti-inflammatory properties. However, the presence of these unsaturations makes it more susceptible to oxidation. This process can adversely affect both the quality of the oil and its nutritional value.

To address this challenge, the help of antioxidants obtained from natural sources, such as astaxanthin, a carotenoid from the algae *Haematococcus pluvialis*, is sought. This study focuses on retarding the oxidation of avocado oil using antioxidants stabilized in a water-in-oil emulsion, thus achieving an oil that meets physicochemical quality standards. The combination of carotenoids with other antioxidants, such as polyphenols, is proposed as an effective strategy against oxidation and oxidative stress.

The emulsion with algae extract (AH) shows a 26% reduction in the formation of peroxides in avocado oil, while the emulsion with TBHQ (AT) achieves a 29% decrease, indicating that AH does not outperform the effect of TBHQ. The AHC emulsion, which incorporates carotenoids and catechin, stood out as a natural antioxidant additive, decreasing peroxide formation by 57% compared to the control. This emulsion is an effective option to replace the use of synthetic antioxidants, as an alternative for the food industry. This represents not only a significant advance in the food and oil industry, but also a promising response to market demands. AHC emulsion offers a natural and effective alternative to synthetic antioxidants, responding to the growing consumer preference for healthier and more natural products. In summary, this study has the potential to boost the production of high quality avocado oil and meet growing consumer demand for healthier and more natural options.

1. INTRODUCCIÓN

El aceite de aguacate ha experimentado un creciente aumento en su demanda, impulsado por el interés cada vez mayor en los alimentos funcionales y la conciencia sobre la importancia de una dieta equilibrada. En 2018, su valor fue de 669.5 millones de dólares y se proyecta que alcance los 1,452.2 millones de dólares para el año 2027 (Rodríguez-Moreno, 2019 y USDA, 2021). Este aceite, proveniente del aguacate (*Persea americana*), el cual es de gran interés gracias a su perfil nutricional, principalmente debido a su alto contenido de ácidos grasos insaturados, que se asocian con beneficios para la salud cardiovascular y propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, por estas insaturaciones, es más propenso a oxidarse por la presencia de oxígeno, lo que aumenta los niveles de peróxidos y, por lo tanto, en la velocidad de oxidación. Factores ambientales como la exposición al oxígeno, la luz y la temperatura aceleran las reacciones de oxidación. La oxidación no solo conlleva cambios químicos, sino también afecta las propiedades sensoriales y nutricionales de los aceites, lo que puede influir en la calidad del producto final.

Para retrasar el proceso de oxidación de los aceites, se buscan alternativas basadas en antioxidantes de origen natural, ya que el consumo en grandes cantidades o de manera regular de los antioxidantes sintéticos ha suscitado algunas preocupaciones en términos de impacto en la salud, como toxicidad a largo plazo y efectos en el sistema inmunológico (Eskandani, *et al.*, 2014, Gharavi, *et al.*, 2007, Esch, 1986).

Los carotenoides, que son compuestos pigmentados presentes en una amplia variedad de fuentes naturales, se han destacado por su capacidad antioxidante. Se ha observado que los carotenoides pueden atrapar radicales libres y prevenir la oxidación de los lípidos en los aceites. En particular, la astaxantina, un carotenoide que se encuentra en el alga *Haematococcus pluvialis*, ha demostrado ser un antioxidante potente, con un poder antioxidante considerablemente superior al de la vitamina C, el β -caroteno y otros antioxidantes comunes.

La astaxantina, principalmente presente en forma esterificada, se ha destacado por su capacidad para mantener la estabilidad de los aceites. Además, la combinación de carotenoides con otros antioxidantes, como los polifenoles, la vitamina C, la vitamina E y el ácido alfa lipoico, ha demostrado tener efectos sinérgicos en la protección contra los radicales

libres y el estrés oxidativo. Lo cual fortalece la acción antioxidante conjunta y mejora la capacidad de proteger las células y los tejidos del daño causado por los radicales libres.

El efecto sinérgico se basa en la capacidad de los antioxidantes para donar y recibir electrones, neutralizando así los radicales libres, los cuales reaccionan con los ácidos grasos insaturados produciendo aldehídos, cetonas, entre otros productos que se forman durante el proceso de oxidación. La combinación de dos o más antioxidantes puede tener un efecto mayor que la suma de sus efectos individuales debido a la cooperación y la regeneración mutua entre ellos. Esta cooperación, en el contexto de los carotenoides, se basa en su capacidad para actuar tanto como donantes como receptores de electrones, lo que les permite interactuar con otros antioxidantes y restaurar su funcionalidad. Además, los carotenoides pueden resguardar a otros antioxidantes de la oxidación, lo que contribuye al fortalecimiento del efecto antioxidante conjunto.

La combinación de antioxidantes es especialmente valiosa en la protección de aceites y grasas contra la oxidación. Los sistemas de emulsiones, que consisten en dos líquidos inmiscibles con la presencia de un agente emulsificante, permiten encapsular compuestos bioactivos y liberarlos de manera controlada.

El objetivo de este trabajo es retardar la velocidad de oxidación del aceite de aguacate utilizando antioxidantes, obtenidos del alga *Haematococcus pluvialis* y catequinas, los cuales estarán estabilizados en una emulsión agua en aceite.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aceite de aguacate

El aceite de aguacate es conocido por sus beneficios para la salud, ya que es una buena fuente de vitaminas, minerales y grasas saludables asociadas con la reducción del riesgo de enfermedades del corazón, y diabetes debido a su alto contenido de ácido oleico y antioxidantes. La obtención de este aceite cobra una relevancia particular debido a que México destaca como líder mundial en la producción y exportación de este fruto, generando ingresos significativos que alcanzan los 2024 millones de dólares (PROCOLOMBIA, 2018). En México, se cultivan las tres variedades de aguacate más valoradas por los consumidores: Hass, criollo y fuerte, siendo el aguacate Hass el que constituye el 97% de la producción nacional (Redagricola, 2021).

El mercado mundial de aceites vegetales, incluido el aceite de aguacate, está experimentando un crecimiento notable, impulsado por la creciente demanda de alimentos con propiedades funcionales. Según un informe, el mercado de aceite de aguacate se valió en 669.5 millones de dólares en 2018 y se proyecta alcanzar los 1,452.2 millones de dólares en 2027, con un crecimiento anual del 9.1 % entre 2019 y 2027 (Rodríguez-Moreno, 2019, USDA, 2021).

La pulpa del aguacate contiene alrededor del 60% de aceite (Flores, *et al.*, 2019). El aceite de aguacate se caracteriza por contener un 60% de ácidos grasos monoinsaturados, un 20% de ácidos grasos poliinsaturados y un 20% de ácidos grasos saturados (Pérez-Rosales, *et al.*, 2005).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos en el aguacate Hass mexicano (Rosales, *et al.*, 2005).

Ácido graso	% en el aguacate Hass.
Ácido palmítico	22.59
Ácido esteárico	0.24
Ácido palmitoleico	11.63
Ácido oleico	49.19
Ácido linolénico	14.72
Ácido α -linolénico	1.63

El contenido de ácidos grasos insaturados se relaciona con beneficios para la salud cardiovascular y propiedades antiinflamatorias (Flores, *et al.*, 2019). La oxidación de grasas y aceites es un proceso gradual que se denomina "periodo de inducción". Al final de este período, se alcanza una cantidad de peróxidos que desencadena un aumento en la velocidad de oxidación, lo que hace que el aceite desarrolle un olor y sabor "rancio" (Jiménez, *et al.*, 2001). En aceites con alto contenido de ácidos grasos insaturados, son más propensos a la oxidación por oxígeno, lo que aumenta los niveles de peróxidos y, por lo tanto, en la velocidad de oxidación. Factores ambientales como la exposición al oxígeno, la luz y la temperatura aceleran las reacciones de oxidación, generando diferentes productos a lo largo del tiempo. En la fase inicial de oxidación, se forman peróxidos, mientras que en la fase de oxidación secundaria se produce malonaldehído (MDA), seguido de la formación de compuestos volátiles de bajo peso molecular y decoloración. El proceso concluye con la formación de polímeros. Esta oxidación no solo conlleva cambios químicos, sino también afecta las propiedades sensoriales de los aceites, lo que a su vez puede influir en la calidad del producto final. Los radicales libres generados durante la oxidación pueden causar daños irreparables al interactuar con moléculas biológicas, como el ADN, proteínas o lípidos. El consumo de aceites en estado oxidado debido a la exposición a altas temperaturas se ha vinculado de manera positiva con el riesgo de hipertensión (Durán, *et al.*, 2015). Para retrasar el proceso de oxidación de los aceites, se buscan actualmente alternativas basadas en antioxidantes de origen natural, ya que los aceites comerciales suelen contener antioxidantes sintéticos como el BHT, el BHA y el TBHQ, que han demostrado tener efectos perjudiciales para la salud (Lingzhao, *et al.*, 2012).

La obtención de aceites vegetales es un proceso fundamental que involucra una variedad de métodos, cada uno con sus propias implicaciones en la calidad y características nutricionales del producto final. Entre los métodos más comunes se encuentran el prensado en frío, el prensado en caliente y la extracción con solventes. Las condiciones típicas para el prensado en frío incluyen una temperatura por debajo de los 100°C, una boquilla de diámetro de 4 mm y una velocidad de tornillo de 17 rpm (Vargas, *et al.*, 2019). Estas condiciones conservan mejor los compuestos sensibles al calor y pueden dar lugar a un aceite de mayor calidad en sabor y contenido nutricional. Los aceites prensados en frío son reconocidos por sus beneficios para la salud, ya que en su proceso de obtención no se emplean temperaturas

elevadas que podrían comprometer sus propiedades nutricionales (Yazdani-Nasab & Piravi-Vanak, 2015). Estos aceites tienen un mayor contenido fenólico, propiedades sensoriales características al fruto o semilla, además de un alto valor nutricional (Chandra, *et al.*, 2020). Los componentes bioactivos de los aceites prensados en frío, como tocoferoles, esteroides, carotenoides y fosfolípidos, contribuyen a sus beneficios para la salud (Makała, 2015).

2.2 Aceites enriquecidos

Los aceites enriquecidos son aquellos que han pasado por un procedimiento de fortificación con nutrientes específicos, como ácidos grasos esenciales, fitoesteroides, antioxidantes y otros compuestos beneficiosos. Estos nutrientes pueden incorporarse al aceite de forma natural o mediante procesos químicos controlados. Los aceites enriquecidos tienen el potencial de brindar ventajas para la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y la mejora de la salud del sistema nervioso, entre otros beneficios. Además de los aspectos relacionados con la salud, este enriquecimiento a veces se traduce en beneficios para la industria, ya que puede extender la vida útil del aceite, especialmente cuando se añaden antioxidantes. La acción antioxidante de los carotenoides puede extender la vida útil de los aceites, lo que es beneficioso tanto para los consumidores como para la industria alimentaria, ya que reduce el desperdicio de productos y los costos asociados con la producción y almacenamiento de aceites.

Se reportó que los carotenoides dan estabilidad al aceite de aguacate, pues pueden atrapar radicales libres y prevenir la oxidación de los lípidos en los aceites. Al neutralizar los radicales libres, los carotenoides pueden ayudar a mantener la frescura y la estabilidad de los aceites. Este efecto se ha evidenciado en un estudio realizado por Cerecedo-Cruz, *et al.*, (2018). En este estudio, se agregó una oleoresina obtenida del chile chipotle, que contiene carotenoides en una proporción de 1:3 (p/v: chile chipotle/aceite de aguacate). Los resultados indicaron que, después de 28 días, el contenido de peróxidos en el aceite enriquecido con carotenoides del chile chipotle fue significativamente menor en comparación con el control que no contenía estos carotenoides. Esto respalda la capacidad de los carotenoides para proteger los aceites de la oxidación y mantener su calidad a lo largo del tiempo.

2.3 Carotenoides

Los carotenoides son compuestos pigmentados que generan tonalidades amarillas, naranjas y rojas por la existencia de un cromóforo en su composición. Estos pigmentos se hallan en los tejidos fotosintéticos, a menudo en compañía de las clorofilas, así como en los tejidos vegetales no fotosintéticos, donde forman parte de los cromoplastos. Estos compuestos se pueden descubrir en una amplia variedad de fuentes naturales, incluyendo plantas, alimentos, levaduras, microalgas y en un sinnúmero de fuentes de la naturaleza (tabla 2). Químicamente son tetraterpenos, moléculas con 40 átomos de carbono. La familia de los carotenoides se puede dividir en dos grupos: carotenos (hidrocarburos) y xantofilas (hidrocarburos con átomos de oxígeno en su estructura). Así mismo las xantofilas pueden existir en estado libre o esterificado con ácidos grasos (Meléndez-Martínez, *et al.*, 2007). Actualmente existe un interés creciente en sus propiedades nutricionales por su poder antioxidante, ya que bloquean la acción de los radicales libres.

Tabla 2. Ejemplos de algunos carotenoides y sus fuentes (Jaswir, *et al.*, 2011).

Carotenos	Fuente	Xantofilas	Fuente
α -caroteno	Naranja	Luteína	Cempasuchil
β -caroteno	Zanahoria	Zeaxantina	Maíz
Licopeno	Tomate	Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Neurosporeno	<i>Neurospora crassa</i>	Fucoxantina	<i>Sargassum</i>
Fitoeno	<i>Passiflora setacea</i>	Violaxantina	

Los carotenoides son susceptibles a la degradación debido a varios factores, como la temperatura, la luz, el pH, el tiempo, la acción enzimática, el oxígeno y la actividad del agua. Dado que los carotenoides son compuestos altamente insaturados, son particularmente vulnerables a procesos de oxidación y cambios en su estructura durante la manipulación de alimentos. La degradación de los carotenoides se origina por reacciones de oxidación, las que ocurren sin intervención de enzimas y las provocadas por enzimas y las lipoxigenasas, y esto se observa principalmente en el secado de frutas y verduras (Meléndez-Martínez, *et al.*, 2004).

2.4 Astaxantina y *Haematococcus pluvialis*

La astaxantina es una xantofila la cual tiene un poder antioxidante 65 veces mayor que la vitamina c, 54 veces mayor que el β -caroteno, 10 veces mayor que la zeaxantina y la luteína y 100 veces mayor que el α -tocoferol. Lo cual sugiere un potencial significativo en la protección celular contra el estrés oxidativo (Shah, *et al.*, 2016). Este carotenoide se puede encontrar en diferentes fuentes como algas, algunas levaduras, crustáceos, etc.

Haematococcus pluvialis es una variedad de alga verde de agua dulce perteneciente a la familia *Haematococcaceae*. Su hábitat habitual en zonas de clima templado en todo el mundo.



Figura 1. *Haematococcus pluvialis*

Esta especie es reconocida por su elevado contenido de carotenoides, principalmente astaxantina, un antioxidante de gran potencia que desempeña un papel importante en la acuicultura, la industria cosmética y alimentaria. La astaxantina se encuentra en las células de reposo, las cuales se generan y acumulan de manera rápida cuando las condiciones ambientales se tornan desfavorables para el crecimiento celular normal. Estas condiciones de estrés pueden incluir alta luminosidad, elevada salinidad y limitada disponibilidad de nutrientes (Fernández-Lozano, *et al.*, 2015). En particular, la astaxantina que produce el alga *Haematococcus pluvialis*, principalmente se encuentra en forma esterificada, es decir, unida con ácidos grasos, lo que puede mejorar su solubilidad en lípidos y, en algunos casos, su estabilidad. El contenido de astaxantina es aproximadamente de 70% monoésteres, 25% diésteres y 5% libre (Camacho, *et al.*, 2013). De acuerdo con lo anterior, el contenido de carotenoides presentes en *H. pluvialis* sería 85% astaxantina esterificada (70% monoésteres, 25% diésteres), 5% astaxantina libre y 10% de otros carotenoides presentes en menor proporción, como el β -caroteno, cantaxantina, luteína, entre otros (Ruiz-Domínguez, *et al.*, 2019).

Una consideración importante para la obtención de la astaxantina a partir del alga *H. pluvialis*, es realizar una extracción de la astaxantina del alga y no añadir directamente el alga en alimentos, debido que, realizando una extracción, se incrementa la biodisponibilidad de este carotenoide, ya que, dentro de las células del alga, la astaxantina se encuentra rodeada por paredes celulares gruesas e impermeables que podrían limitar sus aplicaciones en la industria. Como se ha mencionado, esta xantofila está presente en diversas fuentes de origen natural, sin embargo, la astaxantina obtenida de fuentes naturales corresponde al 1% de la cantidad comercializada hoy en día en el mercado, por otro lado, su forma sintética es más comercializada y su uso para consumo humano aún no ha sido aprobado, principalmente se utiliza como alimento para algunas especies marinas como crustáceos y algunas variedades de trucha. Es importante mencionar que la variante sintética de la astaxantina tiene una capacidad antioxidante 20 veces menor que la obtenida de fuentes naturales. (Shah *et al.*, 2016) (Camacho *et al.*, 2013) (Lingzhao *et al.*, 2012) (Mezzomo & Ferreira, 2016).

2.6 Emulsiones

Una emulsión es un sistema disperso que consta de dos líquidos inmiscibles, que generalmente son de naturaleza polar y no polar, formando dos fases: una dispersa y una continua. Para lograr una estabilidad física, las emulsiones requieren la presencia de un agente emulsificante o tensoactivo en su formulación, el cual reduce la tensión superficial entre la fase oleosa y acuosa, resultando en una solución homogénea (Muñoz, *et al.*, 2007). Las emulsiones permiten encapsular compuestos bioactivos y liberarlos de manera controlada desde una fase a otra, lo que se conoce como encapsulación. La eficiencia de encapsulación, referida a la cantidad de compuesto encapsulado en la fase acuosa interna tras el proceso de elaboración de la emulsión múltiple, se usa para evaluar las propiedades de encapsulación de las emulsiones W1/O/W2 (Jiménez-Colmenero 2013). El método comúnmente utilizado es la homogeneización de alto corte, el cual implica el paso de una mezcla de líquidos inmiscibles a través de una serie de pequeñas aberturas a alta presión. Este proceso mecánico provoca la ruptura de las gotas de líquido disperso en fragmentos más pequeños, lo que resulta en una distribución más uniforme en la fase continua. Es un método eficaz para producir emulsiones estables con un tamaño de partícula homogéneo, adecuado para diversas aplicaciones industriales, farmacéuticas y alimentarias.

2.6.1 Emulsiones simples

Existen dos tipos principales de emulsiones simples o primarias: las de aceite en agua (O/W) y las de agua en aceite (W/O). En estos casos, la fase con menor proporción en la formulación se llama fase dispersa, y la sustancia que compone la fase predominante se llama fase continua (McClements 2015).

2.6.2 Emulsiones agua en aceite (w/o)

La investigación sobre emulsiones de agua en aceite se ha centrado en su estabilidad y aplicaciones potenciales. Este tipo de sistema disperso se ha utilizado en diversas aplicaciones, como la elaboración de aderezos para ensaladas, cremas y margarinas en la industria alimentaria. Además, estas emulsiones también se han estudiado para aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica, donde la estabilidad y la capacidad de transporte de ingredientes hidrofílicos son importantes.

Hamuro (1975) desarrolló una emulsión de aceite W/O de baja viscosidad con estabilidad mejorada, mientras que Awang (2008) preparó una emulsión de agua en aceite de palma y encontró que la estabilidad del sistema de emulsión aumentaba con una mayor velocidad de homogenización. Lin (2004) estudió la estabilidad de las emulsiones de éter de petróleo w/o y descubrió que un mayor contenido de agua y concentración de surfactante mejoraban la estabilidad.

Al-Sabagh, et al., (2011) llevaron a cabo la formulación de emulsiones agua-en-aceite (w/o), investigando el impacto de la proporción de la fase dispersa en el tamaño de partícula. El estudio abarcó la evaluación del tamaño de partícula mediante la incorporación de distintos porcentajes de agua (5%, 10%, y 14%) en las emulsiones, destacando que se observó un aumento en el tamaño de partícula al incrementar el porcentaje de agua.

Cabe señalar que emulsiones agua-en-aceite con elevados porcentajes de fase oleosa presentan mayores tamaños de partícula que emulsiones aceite-en-agua. Este fenómeno se atribuye a la influencia de la viscosidad de la fase oleosa en el tamaño de partícula, según lo señalado por Sugiura, et al., (2001). Otro factor que incide en la viscosidad es la concentración de emulsificante utilizado, como indican Nour y Yunus (2006), quienes afirman que tanto la concentración del emulsificante como el volumen de la fase dispersa ejercen un impacto significativo en el tamaño de partícula y la estabilidad de la emulsión.

Reducir la cantidad de fase dispersa no solo disminuye el tamaño de partícula, sino que también conlleva una reducción en la separación de fases a lo largo del tiempo. Por otro lado, el aumento en la concentración del emulsificante se correlaciona positivamente con el incremento en la viscosidad de la emulsión. Coincidiendo con estas observaciones, Zembyla, *et al.*, (2019) llevaron a cabo una investigación adicional utilizando altos porcentajes de aceite en la fase continua en emulsiones agua-en-aceite con curcumina. En este caso, se evidenció que el incremento en el porcentaje de agua de la fase dispersa, variando del 5% al 20%, resultó en un aumento en el tamaño de partícula de 20 a 25 μm .

Algunos ejemplos en la industria alimentaria y cosmética de este tipo de emulsiones son: la mantequilla, aderezos, cremas hidratantes, protectores solares, etc.

2.6.2 Emulsiones múltiples

Otras emulsiones, las múltiples o dobles, son sistemas coloidales en los que una emulsión primaria se dispersa en otra fase para formar una nueva emulsión. Estos sistemas incluyen el tipo W1/O/W2 (agua en aceite, en agua) y O1/W/O2 (aceite en agua, en aceite), lo que significa que tienen tres fases y requieren dos tipos diferentes de agentes emulsionantes debido a la naturaleza distinta de las interfases. Esto hace que las emulsiones múltiples sean termodinámicamente inestables en comparación con las emulsiones simples (Peredo-Luna & Jiménez-Munguía, 2012).

2.6.3 Estabilidad

Las emulsiones enfrentan desafíos significativos relacionados con la estabilidad física y química, ya que pueden experimentar la ruptura de sus membranas, lo que conlleva a la pérdida del material encapsulado. Las emulsiones enfrentan desafíos significativos relacionados con la estabilidad física, ya que pueden experimentar la ruptura de sus membranas, lo que conlleva a la pérdida del material encapsulado. Entre los principales mecanismos de ruptura se encuentran la coalescencia de la gota interior o exterior, así como el hinchamiento o encogimiento de la gota interna (Kosegarten-Conde y Jiménez-Munguía, 2012). Mientras que la estabilidad química implica la resistencia de la emulsión a cambios en su composición química debido a reacciones de oxidación, hidrólisis u otras transformaciones químicas. Ambos tipos de estabilidad son importantes para garantizar la calidad y eficacia de las emulsiones en diversas aplicaciones, ya que la estabilidad química

puede influir en la estabilidad física de una emulsión y viceversa debido a que cambios en la composición química pueden alterar las propiedades interfaciales de la emulsión. Por ejemplo, la oxidación de los lípidos en la fase oleosa puede generar compuestos que afecten la capacidad del agente emulsificante para mantener la interfaz entre las fases, lo que puede resultar en la coalescencia de las gotas y la separación de fases. Del mismo modo, la inestabilidad física de la emulsión puede facilitar la oxidación de los componentes químicos, ya que las interfaces expuestas pueden aumentar la velocidad de las reacciones químicas. Por tanto, la estabilidad química y física están relacionadas y pueden afectarse mutuamente en una emulsión.

3. JUSTIFICACIÓN

El aceite de aguacate, apreciado por sus propiedades nutricionales, está experimentando una creciente demanda. Según informes, el mercado de aceite de aguacate alcanzó un valor de 669.5 millones de dólares en 2018 y se prevé que alcance los 1,452.2 millones de dólares para 2027, con una tasa de crecimiento anual esperada del 9.1% entre 2019 y 2027. Este crecimiento va de la mano con la destacada producción mundial de aguacate en México. A pesar de sus beneficios, enfrenta el desafío de la oxidación, comprometiendo su calidad y valor nutricional. La justificación para centrarse en la preservación y extensión de su vida útil no solo responde a la creciente demanda del mercado, sino también asegura que los consumidores disfruten de un producto de alta calidad. La vida útil del aceite de aguacate es considerablemente más breve en comparación con la de los aceites comerciales que contienen menor cantidad de ácidos grasos insaturados. Esto se debe a la susceptibilidad del aceite de aguacate a la oxidación, lo que ha llevado al uso extendido de antioxidantes sintéticos como el BHT, BHA y TBHQ. Sin embargo, se ha demostrado que estos aditivos tienen efectos adversos para la salud, como toxicidad a largo plazo y efectos en el sistema inmunológico. Esta investigación se propone disminuir la velocidad de oxidación del aceite de aguacate mediante la adición de una emulsión que emplea antioxidantes naturales. Esta emulsión estará enriquecida con un extracto oleoso de *Haematococcus pluvialis*, un alga verde de agua dulce conocida por su destacado contenido en astaxantina, que constituye aproximadamente el 95% de los carotenoides totales. Este extracto oleoso no solo aportará sus propiedades antioxidantes, sino que también se combinará con catequinas, para estabilizar los radicales libres. El resultado de esta mezcla entre el extracto oleoso de *Haematococcus pluvialis* y las catequinas será una potente defensa contra la oxidación de aceites, y se espera que prolongue significativamente la vida útil de los productos grasos. Esta estrategia no solo beneficia a la industria alimentaria al reducir el desperdicio y los riesgos para la salud asociados con los antioxidantes sintéticos, sino que también promueve la utilización de ingredientes naturales y sostenibles en la producción de alimentos.

4. HIPÓTESIS

La emulsión con extracto de *H. pluvialis* disminuye la velocidad de oxidación del aceite de aguacate.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar emulsiones con extracto de *H. pluvialis* para retardar la oxidación del aceite de aguacate.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener el aceite de aguacate Hass por el método de prensado en frío
- Determinar las características fisicoquímicas y composición del aceite
- Obtener un extracto de *H. pluvialis* mediante energía sónica
- Determinar la composición del extracto y actividad antioxidante
- Evaluar la velocidad de oxidación y actividad antioxidante del aceite de aguacate adicionado con diferentes concentraciones de extracto de *H. pluvialis*
- Desarrollar emulsiones w/o físicamente estables con extracto de *H. pluvialis* y catequina
- Evaluar la velocidad de oxidación mediante cinética química y actividad antioxidante del aceite de aguacate con las emulsiones w/o

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIALES

Aguacate Hass adquirido comercialmente en un supermercado en Monterrey, Nuevo León (Mexico). *Haematococcus pluvialis* polvo liofilizado, (Astaxanthin 3.5%, fecha de producción 25-12-2021, NUTRIHERB BIOTECH CO, BioTech and Pharmaceutical Valley, Nanjing 210000, China. Aceite de coco met (Bionutrients Global, México), GRINDSTED® PGPR 90 Polyglycerol Polyricinoleate Índice de refracción a 65°C 1,463 - 1,467. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico) (purity $\geq 98\%$), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Persulfato de potasio (pureza 99.99%), trolox, TBHQ (tert-Butylhydroquinone) (pureza 97%), 1,1,3,3-Tetraetoxipropano (pureza $\geq 96\%$), (-)-Catequina de té verde HPLC (pureza $\geq 97\%$), Astaxanthin de Blakeslea trispora HPLC (pureza $\geq 97\%$), ácido tridecanoico acid (pureza $\geq 98\%$), fueron comprados en Sigma Company (USA). Acetona, etanol absoluto, hexano, almidón soluble. yoduro de potasio fueron adquiridos en CTR scientific (México). Ácido clorhídrico de DEQ (México). Acetato de etilo y 2-2-4-trimetilpentano (isooctano) fueron adquiridos en Fermont (México). Ácido acético y ácido sulfúrico adquiridos en Jalmek (México). Tiosulfato de sodio de JT Baker (USA). Ácido tiobarbitúrico fue adquirido de MP Bio (USA). Todos los reactivos fueron de grado analítico.

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Extracción de aceite de aguacate Hass

Se seleccionó la materia prima considerando, aguacates variedad Hass cuya piel es de textura rugosa a semirrugosa, siendo esta característica uniforme en toda la superficie. Su forma es semirredonda hasta aperada. Su color característico va del verde mate al negro. Su pulpa es verde amarillento, suave y sin fibra (NOM-128-SCFI-1998). Sin presencia de magulladuras, picaduras u otro tipo de alteraciones en la cáscara (CXS 197-1995), adquiridos en un mercado mayorista (Monterrey, Nuevo León, México). Los frutos de cada variedad se envolvieron en papel periódico y a temperatura ambiente (25 ± 1 ° C). Los aguacates se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier tipo de impurezas. Se procedió a pelar los aguacates de tal forma que se consiguió la mayor parte de pulpa (0.11% acidez), con un contenido de sólidos totales aparentes de 2.25 ± 0.060 °Brix (Anton Paar (modelo Abbemat 300), índice de madurez: 20.45%. La cual se sometió a secado a 60°C por 10 horas en un deshidratador (Hamilton beach, USA). Se alimentó la tolva de una prensa expeller para la obtención del aceite, posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm por 15 min, se midió el volumen obtenido y se envasó en botellas ámbar (Vargas, *et al.*, 2020).

6.2.2 Características físicoquímicas

Las características químicas evaluadas fueron: Índice de Peróxido (PI) según el método oficial AOCS con ligeras modificaciones propuestas por Crowe & White (2001), Índice de Acidez (IA) según el método de la ISO 660:2009 y determinación de pH con un potenciómetro marca Hanna instruments (modelo pH211). Las características físicas evaluadas fueron: Densidad Relativa (RD) utilizando el método del picnómetro según CODEX, Índice de Refracción (IR) se realizó siguiendo el método AOCS-Cc 7-25 (1998). Se utilizó el refractómetro digital marca Anton Para (modelo Abbemat 300) y el Color Instrumental por el método CIELAB, utilizando un colorímetro digital marca Hunterlab (modelo ColorFlex EZ).

6.2.3 GC-MS análisis: determinación del perfil de ácidos grasos

Se pesaron 30 mg del aceite, se adicionó 1 mL de estándar interno Triundecanoin (4000 ppm), 1 mL de hexano y 2 mL de ácido sulfúrico al 10% en un vial de 12 mL. La muestra se mantuvo a 80°C durante 1 h (ACCUBLOCK, Labnet). Las muestras se dejaron enfriar, se agregaron 4 mL de hexano y se mezcló durante un minuto, se mantuvo en reposo durante 10 min y se separó la fase orgánica. Se repitió dos veces. Los extractos orgánicos fueron mezclados en un matraz aforado y se ajustó el volumen a 10 mL. Se inyectaron 2 µl de cada muestra con un detector de ionización de llama (Agilent Technologies, 7890A (GC)/7693(ALS), CA, EUA). El análisis se realizó utilizando una columna capilar de sílice fundida (60 m x 0,25 mm id, 0,20 µm de espesor de película, Agilent GC, EUA). Temperatura inicial 100°C (4 min); 3°C/min; temperatura final 240°C; 15 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 225 °C y 285 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a un caudal de 0,75 mL/min con una relación de división de 200:1. Los picos se identificaron con patrones externos.

6.2.4 Extracto de *H. pluvialis*

De acuerdo con el procedimiento realizado por Ruen-ngam *et al.* (2011), se utilizó un baño ultrasónico (Sonic Ruptor 250, Omni, USA), utilizando una punta de procesamiento de 25.4 mm de diámetro. La extracción se realizó utilizando una relación 1:100 alga/acetona en un vaso de precipitado de 250 mL, protegido de la luz. Se colocó en una placa de agitación a 400 rpm, en el cual se sumergió la punta del ultrasonido a 1 cm de profundidad de la superficie. La corrida de extracción se realizó a 45 °C, variando la potencia ultrasónica en

40%, 60% y 80% durante 60 min. Después, la solución se filtró. Se realizó la evaporación del solvente en un rotavapor (RV10 digital, IKA, USA), acoplado a un termostato de refrigeración (LAUDA ALPHA RA8) a 35°C, 50 rpm y 500 mbar de presión, parámetros establecidos por Zaho, *et al.* (2016). El rendimiento de extracción fue determinado con la siguiente fórmula:

$$\%Rendimiento = \frac{g \text{ de extracto seco recuperado}}{g \text{ de alga}}$$

Para la actividad antioxidante, el extracto seco se resuspendió en 10 mL de acetato de etilo, se colocó en vortex 10 min, se centrifugó a 6500 rpm durante 15 min y finalmente se filtró a través de un filtro de jeringa con membrana de PTFE de 0.45 µm (Millex-FH). Para la determinación de la oxidación, el extracto seco se resuspendió directamente en aceite coco de triglicéridos de cadena media (extracto oleoso).

6.2.5 Caracterización de extracto de *H. pluvialis*: HPLC

Para esta parte del procedimiento, el extracto seco del alga se resuspendió en acetona se filtró a través de un filtro de jeringa con membrana de PTFE de 0.45 µm (Millex-FH). Los extractos del alga (*H. pluvialis*) se separaron en un HPLC Hewlett Packard equipado con un detector de matriz de fotodiodos. Se usó una columna Hypersil C₁₈ (5 µm) de 250, 4 mm de fase reversa (Hewlett Packard). El gradiente de elución se realizó de la siguiente manera con eluyente A (agua), eluyente B (metanol), eluyente C (acetona): 0 min 9 % A, 76 % B, 15 % C; 9 min 5% A, 45% B, 50% C; 15 min 4% A, 38% B, 58% C; 17 min 3% A, 27% B, 70% C; 22 min 3% A, 27% B, 70% C; 25 min 100% C; 26 min 100% C. El caudal fue de 1 ml min⁻¹. Las longitudes de onda de detección fueron 480 nm. Astaxantina (Sigma), se utilizó como estándar (Orosa *et al.*, 2005).

6.2.6 Carotenoides totales

Para la determinación del contenido de carotenoides totales, se tomaron 100 µL de muestra en 3 mL de acetona en un tubo falcon de 15 mL. Se colocó 2 min en vortex. Esta metodología se realizó en la oscuridad. Luego, se leyó con un espectrofotómetro thermo scientific genesys 10s uv-vis a 472 y 508 nm con acetona como blanco. Los carotenoides totales se expresaron siguiendo la ley de Lambert-Beer con las siguientes ecuaciones:

$$CR = \frac{2144.0 \times A_{508} - 403.3 \times A_{472}}{270.9} \quad (1)$$

$$CY = \frac{1724.3 \times A_{472} - 2450.1 \times A_{508}}{270.9} \quad (2)$$

$$CT = CR + CY \quad (3)$$

Donde: CR es la fracción de carotenoides rojos; CY es la fracción de carotenoide amarillo y CT es el total de carotenoides;

A508 y A472 es la absorbancia de lectura en estas longitudes de onda expresada en nm.

(Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera, 2001).

6.2.7 Capacidad antioxidante ABTS•⁺

El radical ABTS•⁺ se origina a partir de su precursor, conocido como el Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS•⁺) según el estudio de Prior et al. en 2005. Este radical catiónico, que se caracteriza por su tonalidad verdeazulada, posee estabilidad y exhibe un espectro de absorción en la región del ultravioleta-visible.

Es esencial destacar que este radical es de origen artificial y no reproduce de manera precisa las condiciones in vivo. Desde una perspectiva termodinámica, puede ser reducido por compuestos que posean un potencial redox inferior al del ABTS•⁺ (0.68V), lo que lo hace susceptible a reacciones con numerosos compuestos fenólicos que tienen un potencial más bajo. La interpretación de los resultados de este ensayo puede verse influida por la elección de tiempos de reacción, ya que pueden ser demasiado cortos o largos, lo cual representa un desafío.

Una ventaja significativa de este método es su capacidad para realizar muestras hidrosolubles y liposolubles, permitiendo la selección del disolvente apropiado para cada caso.

En nuestro estudio actual, hemos implementado el método ABTS•⁺ generando el radical de manera química mediante el uso de persulfato potásico. La oxidación con persulfato potásico se realiza a temperatura ambiente, en un entorno sin exposición a la luz, con un tiempo de reacción que oscila entre 12 y 16 horas. Notablemente, el persulfato potásico y el ABTS•⁺ reaccionan en proporciones estequiométricas (1:0.5). Una vez que el radical ha sido generado, la medición se lleva a cabo a través de un ensayo de post-adición, tal como se detalla en el trabajo de (Prior, *et al.*, 2005).

Preparación del reactivo:

- ABTS^{•+} 7mM.

Se disolvieron 0.038 g de sal amónica cristalizada de ABTS^{•+} en 10 mL de agua destilada.

- Solución persulfato potásico 2,45 mM.

Se disolvieron 0.0066 g del reactivo en 10 mL de agua destilada.

- Preparación radical ABTS^{•+}.

Se mezclaron partes iguales de la solución de ABTS^{•+} 7mM y la de persulfato potásico 2.45mM.

La mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas para la formación del radical (Martysiak-Żurowska & Wenta, 2012). Esta solución es estable durante dos días. La solución de ABTS^{•+} se diluyó con etanol para obtener una absorbancia de 0.7 a 734 nm. Esto se consiguió mezclando 2.5 mL de la solución del radical con aproximadamente 100 mL de etanol absoluto.

Curva de calibración de trolox ABTS^{•+}

Para elaborar la solución stock se disolvieron 0.001 g de Trolox en 10 mL de etanol absoluto. A partir de esta solución se hicieron diluciones a concentraciones de 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 μ M. Se tomaron 300 μ L de cada dilución, después, a cada celda se le agregó 2.7 mL del ABTS^{•+}. Se dejó reposar por 7 minutos en la oscuridad. Se tomaron las lecturas en un espectrofotómetro thermo scientific genesys 10s uv-vis a 734 nm.

Determinación de la capacidad antioxidante ABTS^{•+}

Del extracto de *H. pluvialis* se tomó 0.3 mL y se diluyó en 2.7 mL de acetato de etilo, de esta solución diluida se tomaron 300 μ L y se añadieron 2.7 mL de ABTS^{•+} previamente ajustado a 0.700 ± 0.005 de absorbancia. Cada muestra se realizó por triplicado. Posteriormente se tomaron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro thermo scientific genesys 10s uv-vis a 734 nm después de 7 minutos de reposo. Todo este método se realizó en oscuridad. Los resultados se calcularon con una curva de calibración utilizando trolox como estándar y se expresaron como μ M TEAC.

6.2.8 Capacidad antioxidante DPPH•⁺.

Se utilizó el método del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•⁺) (Nenseter, *et al.*, 1995). El DPPH•⁺ es un radical libre utilizado como indicador para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes compuestos. Este radical presenta un color violeta oscuro debido a su electrón desapareado, y su concentración puede ser medida espectrofotométricamente mediante la pérdida de absorbancia a 517 nm.

Preparación del reactivo:

Se pesaron 0.0039 g del reactivo DPPH•⁺ y se aforaron a 100 mL con etanol absoluto y después se midió la absorbancia de la solución a 517 nm, ajustando a 1.

Curva de calibración de trolox DPPH•⁺.

Para elaborar la solución stock se pesaron 25 mg de Trolox ($M = 250.29$ g/mol) y se aforaron a 100 mL con etanol absoluto. Para realizar la curva se elaboraron diluciones de 0, 16, 32, 48, 64, 80, 96 y 112 μ M. Se tomaron 750 μ L de cada dilución, después, a cada celda se le agregó 2.25 mL del DPPH•⁺. Se dejó reposar por 90 minutos en la oscuridad. Se tomaron las lecturas en el espectrofotómetro UV Genesys 5 a 517 nm.

Determinación de la capacidad antioxidante DPPH•⁺

Del extracto de *H. pluvialis* se tomó 0.3 mL y se diluyó en 2.7 mL de acetato de etilo, de esta solución diluida se tomaron 750 μ L y se añadieron 2.25 mL de DPPH•⁺ previamente ajustado a 1.000 ± 0.005 de absorbancia. Cada muestra se realizó por triplicado. Posteriormente se tomaron las lecturas correspondientes en un espectrofotómetro thermo scientific genesys 10s uv-vis a 517 nm después de 90 minutos de reposo. Todo este método se realizó en oscuridad. Los resultados se calcularon con una curva de calibración utilizando trolox como estándar y se expresaron como μ M TEAC.

6.2.9 Aceite de aguacate con extracto de *H. pluvialis*

Se agregó el extracto oleoso de *H. pluvialis* al aceite de aguacate con agitación suave para asegurar la disolución completa, las concentraciones se enuncian en la tabla 3. Como muestras control, será aceite de aguacate sin antioxidante y aceite de aguacate con TBHQ.

Tabla 3. Concentración de extracto de *H. pluvialis* en el aceite de aguacate.

Clave	Ppm (mg/L)
AT	TBHQ [80 ppm]*
A	Extracto [0 ppm]
A100	Extracto [100 ppm]
A500	Extracto [500 ppm]
A1000	Extracto [1,000 ppm]
AX	Astaxantina [400 ppm]

*Dato obtenido del listado de ingredientes en aceites comerciales.

Condiciones de almacenamiento

Los aceites se almacenaron a 25, 45 y 65 °C. En oscuridad. Las muestras se analizaron durante 36 días. Durante este periodo de almacenamiento se determinaron cada 4 días el contenido de peróxidos (meq O₂/kg) y los productos de la oxidación secundaria (TBARS), Estos mismos análisis se realizaron en condiciones de oxidación a celerada (150°C) durante 180 min, realizando las determinaciones cada 30 min. Las metodologías previamente mencionadas son presentadas a continuación.

6.2.10 Índice de peróxidos (IP) en el aceite de aguacate

El IP se evaluó siguiendo el método oficial AOCS con ligeras modificaciones propuestas por Crowe & White (2001), los resultados se expresaron como miliequivalentes de peróxido de oxígeno activo por kilogramo de aceite (meq O₂/kg). En un matraz Erlenmeyer se agregaron 0.5 g de aceite, se le añadieron 3 mL de ácido acético-isooctano 3:2. Se mezcló la solución manualmente y se añadieron 50 µL de una solución de yoduro de potasio saturada. Se agito 2 min seguido de un reposo. Se agregaron 3 mL de agua destilada recién hervida y fría. Posteriormente se añadieron 200 µL de una solución de almidón al 1%. Se titulará con tiosulfato de sodio 0.01 N. El valor de peróxidos se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{(N)(V)(1000)}{g \text{ de muestra}} \quad (4)$$

Donde: N es la normalidad de tiosulfato de sodio, V es el volumen de tiosulfato de sodio gastado.

6.2.11 Método de TBARS (Valor de ácido tiobarbitúrico) en el aceite de aguacate

A 910 μL de aceite se le agregaron 2.5 mL de agua destilada, se mezclaron en vortex 2 minutos. Posteriormente se centrifugaron 5 minutos a 5000 rpm, 2 mL del sobrenadante se pasó a tubos de ensaye, a los cuales se les agregaron 2 mL del reactivo TBA (46 mM). Después fueron colocados en un baño de temperatura controlada a 100°C por 35 minutos, al término de este tiempo se colocaron en un baño de hielo por 10 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm por 20 minutos y se recolectó el sobrenadante. Se leyó a una absorbancia de 532 nm en un espectrofotómetro thermo scientific genesys 10s uv-vis (Poyato, *et al.*, 2013). Las concentraciones se determinaron utilizando una curva estándar de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) (0.6 a 11 μM). Los resultados se expresaron como μmol equivalente de MDA/kg de aceite (μM eq MDA/kg). Los procedimientos se llevaron a cabo por triplicado.

6.2.12 Estudio cinético

Las velocidades de oxidación para la formación de peróxidos y malonaldehído, se calcularon tomando en cuenta el promedio de las repeticiones determinadas a lo largo de los 36 días de almacenamiento, a cada temperatura evaluada.

Se utilizó la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad (5)$$

La forma lineal de la ecuación es:

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{-E_a}{RT}\right) \times \frac{1}{T} \quad (6)$$

Donde k es la constante de velocidad, A es el factor preexponencial, E_a es la energía de activación (kJ/mol), R es la constante universal de los gases ($8.3145 \text{ J/mol}^{-1}/\text{K}^{-1}$) y T es la temperatura.

6.2.14 Proceso de elaboración de la emulsión (w/o $\phi=0.08$)

La fase oleosa se preparó mezclando 83 g de aceite mct con 9 g de grinsted PGPR y extracto de *H. pluvialis*, esta mezcla se llevó a un Homogeneizador (IKA ultra turrax) a 3000 rpm durante 2 min, mientras se adicionaba la fase acuosa, la cual se elaboró adicionando catequina, propilenglicol y etanol. Ambas fases fueron homogenizadas durante 3 min a 5000 rpm.

Tabla 4. Formulaciones de emulsiones.

	EC	EAT	EAH	EAHC
			%	
Propilenglicol	3.8	3.8	3.8	3.5
Etanol	4.2	4.2	4.2	3.9
Catequina	0.0	0.0	0.0	0.6
Aceite mct	83.0	82.9	63.0	63.0
Extracto seco de <i>H. pluvialis</i>	0.0	0.0	0.9	0.9
TBHQ	0.0	0.1	0.0	0.0
Grinsted PGPR	9.0	9.0	9.0	9.0

6.2.15 Caracterización de la emulsión: estabilidad física (micrografías 100x y tamaño de partícula)

Se tomaron fotografías en un microscopio Leica ICC50 utilizando un objetivo de 100x, de las emulsiones durante un mes.

Un criterio que se utilizará para medir la estabilidad física de la emulsión será determinando el tamaño de partícula (d_{32}). Para esto se utilizó el software GIMP 2.10.12 para la edición de las micrografías y posteriormente el software Image-Pro Plus versión 6.0, para determinar el diámetro de los glóbulos de la emulsión, este dato se convirtió al d_{32} usando la siguiente fórmula:

$$d_{3,2} = \frac{\sum d^3}{\sum d^2} \quad (9)$$

Aceite de aguacate con emulsión

Se agregó 5.5 g de cada una de las emulsiones de la tabla 4, por cada 100 g de aceite de aguacate con agitación suave para asegurar la disolución completa.

Condiciones de almacenamiento

Los aceites se almacenaron a 25, 45 y 65 °C. En oscuridad. Las muestras se analizaron durante 36 días. Durante este periodo de almacenamiento se determinaron cada 4 días el contenido de peróxidos (meq O₂/kg) y los productos de la oxidación secundaria (TBARS), Cada 6 días se determinó la actividad antioxidante.

6.2.16 Análisis estadístico

En el objetivo 2 se realizó un anova de un factor. La diferencia entre medias se consideró significativa a $p \leq 0.05$. En aquellos resultaron significativos, se siguió con prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Esto para cada una de las temperaturas evaluadas.

Los resultados obtenidos en el objetivo 3, 4 y 5, de las diferentes pruebas con los distintos tratamientos fueron analizados mediante Anova bifactorial evaluando 2 factores: Tratamiento (antioxidante) y Tiempo. La diferencia entre medias se consideró significativa a $p \leq 0.05$. En aquellos resultaron significativos, se siguió con prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Esto para cada una de las temperaturas evaluadas.

Todas las determinaciones fisicoquímicas se realizaron por triplicado (n=3). Para estos análisis se utilizó el software estadístico SPSS 23.0. Las gráficas se realizaron con los softwares OriginLab y Grapher, con apoyo en el programa Microsoft Excel 2013.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención del aceite de aguacate

Luego de realizar el deshidratado a 60°C durante 10 h y la extracción del aceite de aguacate (Figura 2) se determinaron los rendimientos de cada componente del aguacate. Respecto a los rendimientos obtenidos del aceite se obtuvo un valor de 56% de aceite de aguacate (base seca), los datos se observan en la tabla 5.



Figura 2. Obtención del aceite de aguacate.

De acuerdo con lo reportado por Werman & Neeman (1987), Estrada & Morocho (2020), Satriana, *et al.*, (2019), Sanata, *et al.*, (2015), el rendimiento del aceite de aguacate considerando la pulpa como base seca, se han obtenido rendimientos de 57.7, 38.9, 42.8, y 55.7%, respectivamente. Lo cual coincide con el rendimiento del aceite de aguacate obtenido por prensado en frío (Tabla 5) $56\pm 3.13\%$.

Tabla 5. Rendimientos del aceite de aguacate.

	Rendimiento (%)
Cascara y hueso	31 ± 1.30
Pulpa	69 ± 1.30
Pulpa seca	32 ± 1.70
Pulpa seca del fruto total	22 ± 0.88
Aceite de aguacate (del fruto total)	12 ± 0.225
Aceite aguacate (pulpa base húmeda)	17 ± 0.01
Aceite aguacate (pulpa base seca)	56 ± 3.13

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar.

Para la evaluación de la calidad del aceite de aguacate Hass (*Persea americana* MILL.) se le evaluaron los parámetros fisicoquímicos, que se muestran en la tabla 6. Respecto al valor de peróxidos la NMX-F-811-SCFI-2021 establece un límite máximo permisible de 10.0 meq O₂/Kg, el aceite obtenido no sobrepasa este límite. Así mismo la obtención de estos valores de peróxido, también se ha reportado por otros autores, Kilic-Buyukkurt (2021), obtuvo un valor de peróxidos de 10.19±0.84 meq O₂/Kg en aceite de aguacate prensado en frío y Prescha, *et al.*, (2014) en aceite de aguacate prensado en frío obtuvieron 9.55 meq O₂/Kg, esto podría indicar que el prensado en frío también podría tener cierta influencia en el nivel de oxidación. Para el pH, Bizimana, *et al.*, (1993) obtuvieron un pH para el aceite de aguacate de 5.55, lo cual coincide con lo obtenido. Por otro lado, la densidad relativa, el índice de refracción y los ácidos grasos libres también coinciden con lo establecido por la normativa mexicana.

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del aceite de aguacate.

Parámetro	Valor
Peróxidos (meq O ₂ /Kg aceite)	9.45±1.011
Ácidos grasos libres (como ácido oleico) (%)	2.31±0.10
Densidad relativa 25°C (g/mL)	0.91±0.0002
Índice de refracción	1.4675±0.000
pH	5.7±0.001
Color (CIELab)	L* 2.71 a* 3.16 b* 4.42

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar.

En el análisis del perfil de ácidos grasos se obtuvo un % de ácidos grasos saturados (SFA) de 18.93%, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) de 68.46% y ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de 10.93%. Lo cual es comparable a lo reportado por Santana, *et al.*, (2019), en el aceite de aguacate donde establecen un contenido de 22.2% de ácidos grasos saturados, 66.1% de ácidos grasos monoinsaturados y 12% de ácidos grasos poliinsaturados. Así mismo Berasategi, *et al.*, (2012) presenta un perfil de ácidos grasos SFA 19.31% (ácido palmítico 18.74%), MUFA 68.40% (ácido palmitoleico 7.88%, ácido oleico 54.4%, ácido

vaccenico 5.87%), PUFA 11.75% (ácido linoleico 10.87%), resultados que son muy aproximados a los obtenidos en la tabla 7. En algunas investigaciones se reportan juntos el ácido oleico y el ácido vaccenico debido a la similitud de la estructura, tal es el caso de Wang, *et al.*, (2020) un 66.21% de ácido oleico y ácido vaccenico.

Tabla 7. Perfil de ácidos grasos en aceite de aguacate.

<i>Ácidos grasos</i>	<i>%</i>
C16:0 Ácido palmítico	18.93
C16:1 Ácido palmitoleico	9.70
C18:1 Ácido Oleico	52.30
C18:1 Ácido vaccenico	6.46
C18:2n-6 Ácido linoleico	10.93
SFA	18.93
MUFA	68.46
PUFA	10.93

7.2 Extracciones de *H. pluvialis*

En la obtención del extracto de *H. pluvialis*, se evaluaron distintas potencias ultrasónicas para obtener la mayor eficiencia respecto a la actividad antioxidante ($\mu\text{mol eq. trolox/g}$), respecto al rendimiento de el extracto seco obtenido, no se observaron diferencias significativas entre las distas potencias de extracción (Tabla 8).

Tabla 8. Extracciones de *H. pluvialis*.

Potencia de extracción ultrasónica	Watts	Alga peso seco (g)	Extracto seco (g)	Rendimiento (%)
40%	2.80	2.00 \pm 0.010	0.17 \pm 0.014	8.60 \pm 0.717 ^a
60%	15.3	2.03 \pm 0.059	0.18 \pm 0.027	8.91 \pm 1.076 ^a
80%	20.2	2.00 \pm 0.003	0.19 \pm 0.009	9.42 \pm 0.440 ^a

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice entre columnas difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Al realizar un barrido UV-VIS a los extractos obtenidos a las tres potencias evaluadas (figura 3), se observa que al aumentar la potencia de extracción, se presenta un pico con una absorbancia mayor en la región característica de carotenoides, la cual se encuentra en un intervalo de 400 a 500 nm, sin embargo en esta región también se encuentran las clorofilas tipo B, en un intervalo de 428 a 453 nm, por lo tanto podría haber una superposición entre carotenoides y clorofila tipo B en el espectro UV-Vis, por otro lado se observa otro pico entre

650 y 675 nm, esta zona es característica de las clorofilas tipo A. Lo que diferencia a estos tipos de clorofila, es que la de tipo A tiene un grupo metilo en su estructura. (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). A pesar de una posible superposición entre los carotenoides del alga *H. pluvialis* y clorofilas tipo B, el espectro observado para los extractos coincide con el obtenido por Li, *et al.*, (2012), en donde de igual manera realizó un barrido UV-Vis a un extracto de *H. pluvialis* y observo ambos picos característicos del alga, donde menciona que de acuerdo al pico obtenido, la región donde se encontraban los carotenoides era entre 450 y 550 nm, em cambio, en la figura 3 podemos observar la región de los carotenoides entre 425 y 525 nm, esta diferencia podría ser debido al solvente utilizado, para este análisis se utilizó acetona, Li y colaboradores elucidaron el espectro del alga utilizando DMSO como solvente. Esto coincide con lo reportado por Lichtenthaler & Buschmann (2001), quienes mencionan que, en un mismo extracto al incrementar la polaridad del solvente, puede haber ligeros cambios en las longitudes de onda tanto de carotenoides, como de clorofilas.

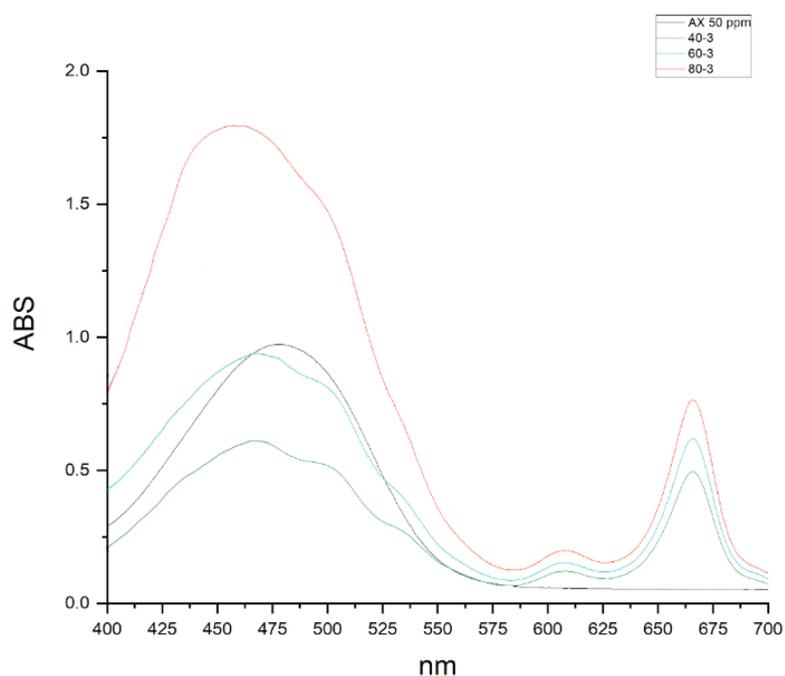


Figura 3. Espectro UV de barrido de estándar de astaxantina y extractos de *H. pluvialis*.

--Extracto de *H. pluvialis* realizado con 40% de potencia, --Extracto de *H. pluvialis* realizado con 60% de potencia --Extracto de *H. pluvialis* realizado con 80% de potencia, --Estándar de astaxantina a 50 ppm

Para la cuantificación de astaxantina libre por medio de HPLC (figura 4), se observa que, al aumentar la potencia de extracción, también aumenta el contenido de astaxantina, se observan diferencias significativas entre las potencias ultrasónicas evaluadas, donde la que presento una mayor concentración de astaxantina fue 80%, obteniendo 8.26 mg de astaxantina/g de extracto seco de *H. pluvialis*. Ruiz-Domínguez, *et al.* (2019), realizaron la cuantificación de los carotenoides de *H. pluvialis* y obtuvieron 6.82 ± 0.19 mg de astaxantina/g, lo que concuerda con el valor obtenido.

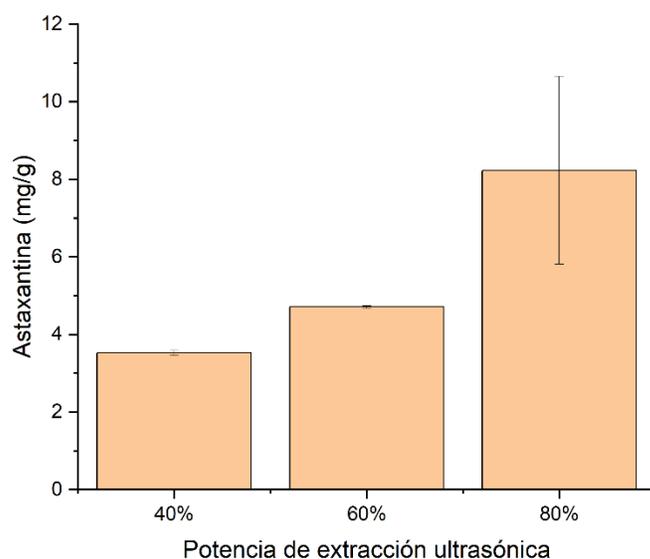


Figura 4. Concentración de astaxantina (mg/g) en el extracto seco de *H. pluvialis* determinados por HPLC.

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice entre columnas difieren estadísticamente ($p < 0.05$).

En los cromatogramas presentados en la figura 5, se observan 3 regiones características con sus respectivos picos. El primer pico es característico de la astaxantina libre, la cual, generalmente se presenta en cantidades muy pequeñas, ya que la mayor parte de la astaxantina en *Haematococcus pluvialis* se encuentran en forma de monoésteres asociados con ácidos grasos unidos de cadena corta. Aproximadamente el 70% es monoéster de astaxantina, el 25% es diéster de astaxantina y el 5% es astaxantina libre (Todorović, *et al.*, 2021). Si comparamos los resultados anteriores con los obtenidos en la Figura 5 - C, podemos afirmar claramente que la concentración máxima de monoéster de astaxantina se observó

cuando se utilizó el 80% de potencia, lo cual promueve la mayor liberación de astaxantina esterificada en los extractos obtenidos.

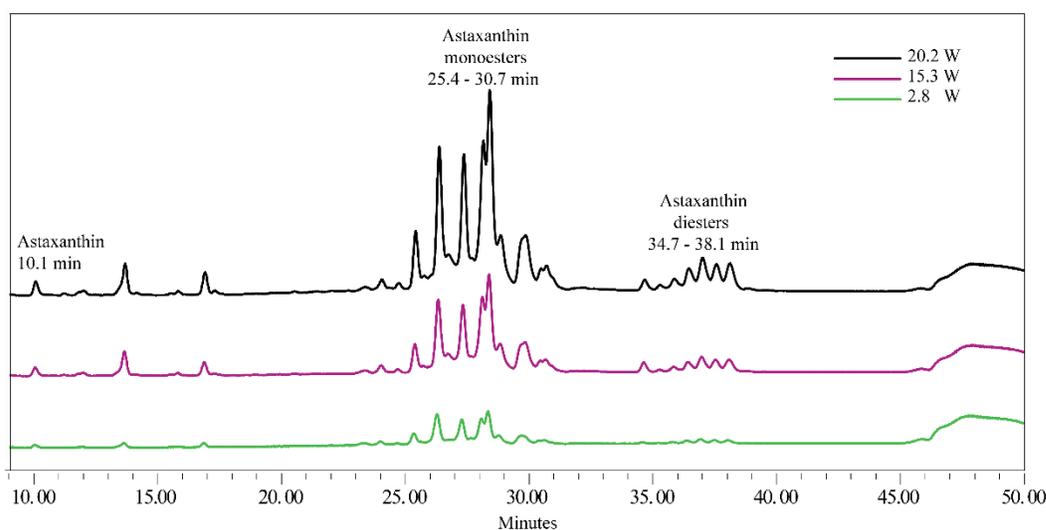


Figura 5. Cromatograma HPLC (DAD, 480 nm) de extractos de *H. pluvialis* a distintas potencias ultrasónicas.

En la tabla 9 podemos observar que al incrementar la energía de extracción, la actividad antioxidante aumenta, especialmente en la técnica de ABTS, en donde cada porcentaje de potencia ultrasónica evaluado presenta diferencias significativas, por otro lado en el método de DPPH entre 60% y 80% de potencia ultrasónica no existe diferencia significativa, esto podríamos atribuirlo a que en el método de DPPH cuantifica principalmente antioxidantes hidrófilos, además se ha reportado que es posible una interferencia en la absorbancia de los carotenoides presentes en *H. pluvialis* (400-500 nm) en presencia del reactivo DPPH, ya que esta técnica se determina a 517 nm (Castillo, *et al.*, 2022). El uso del radical ABTS se realiza a 734 nm, donde no interfieren los carotenoides. Esta técnica presenta un amplio espectro, ya que cuantifica tanto hidrófilos como lipófilos, donde los carotenoides presentes en el alga son lipófilos. La diferencia en la actividad antioxidante en función a la potencia ultrasónica podríamos atribuirlo a que la eficiencia de extracción mejora al aumentar el % de potencia y por ende el contenido de carotenoides aumenta. Goiris, *et al.*, (2012) Determinaron la actividad antioxidante por el método ABTS en extractos etanol/agua de *H. pluvialis* y obtuvieron 5.71 ± 0.12 $\mu\text{mol eq. Trolox/ g}$ de alga seca, lo cual coincide con lo observado en la tabla 9. Para el contenido de carotenoides, el método UV-Vis, se ve limitado ya que solo se estarían cuantificando los carotenoides libres presentes en *H. pluvialis*, es decir,

cantaxantina, β caroteno, luteína, astaxantina, etc, este método no estaría determinando la astaxantina esterificada. Ruiz-Domínguez, *et al.*, (2019), reportan un contenido de carotenoides libres de 13.5 mg/g, lo cual es similar a los datos obtenidos (Tabla 9), el resto de los carotenoides que reportan estos autores, son la astaxantina mono y diester, con un contenido de 89.4 mg/g, obteniendo un contenido total de carotenoides (libres y esterificados) de 114.9 mg/g.

Tabla 9. Actividad antioxidante y carotenoides de *H. pluvialis* (peso seco), a distintas potencias ultrasónicas.

Potencia de extracción ultrasónica	Watts	DPPH (μmol eq. trolox/g D.W.)	ABTS (μmol eq. trolox/g D.W.)	Carotenoides (mg/g)
40%	2.80	3.50 \pm 0.645 ^a	4.95 \pm 0.036 ^a	7.42 ^a
60%	15.3	6.21 \pm 0.909 ^b	6.21 \pm 0.594 ^b	12.54 ^b
80%	20.2	6.81 \pm 1.455 ^b	7.30 \pm 0.263 ^c	19.92 ^c

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar. Valores con diferente letra de superíndice entre columnas difieren estadísticamente ($p < 0.05$)

Tabla 10. Actividad antioxidante y carotenoides totales de extracto oleoso de *H. pluvialis* obtenido a 80% de potencia ultrasónica.

ABTS (μmol eq trolox./g D.W.)	DPPH (μmol eq trolox./g D.W.)	Carotenoides (mg/g)
9.39 \pm 0.163	6.12 \pm 0.273	21.33 \pm 0.98

Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones con sus respectivas desviaciones estándar.



Figura 6. Extracto oleoso de *H. pluvialis*.

7.3 Aceite de aguacate con extracto de *H. pluvialis*

El extracto de *H. pluvialis* se añadió en distintas concentraciones al aceite de aguacate, obteniendo los aceites presentados en la figura 7.

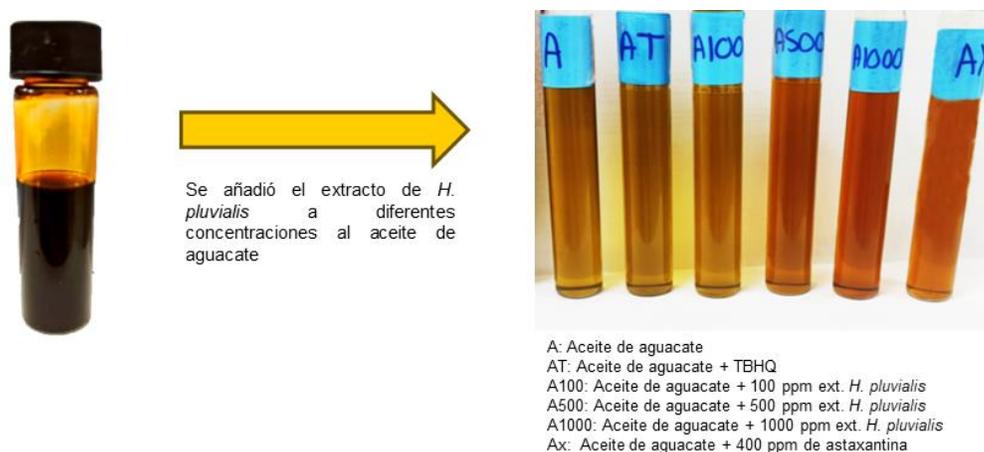


Figura 7. Aceite de aguacate con distintas concentraciones de extracto de *H. pluvialis*, TBHQ y astaxantina.

7.4 Estabilidad oxidativa de aceites adicionados con extracto de *H. pluvialis*

La oxidación en aceites es un fenómeno que suele ocurrir de manera progresiva, sin embargo, la velocidad de oxidación se ve influenciada por parámetros como temperatura, luz, oxígeno y presencia de antioxidantes. Estos últimos, suelen tener la capacidad de disminuir la velocidad de oxidación, sin embargo, en altas concentraciones, algunos antioxidantes también pueden ocasionar en el aceite una tendencia prooxidante, lo cual, en lugar de disminuir la velocidad de oxidación, podría aumentarla y oxidar más rápido el aceite. En la figura 8 y 9 se presenta la determinación del índice de peróxidos y la cuantificación de malonaldehído a 25, 45 y 65 °C, se puede observar que, con el incremento de la temperatura, también aumentan las concentraciones de los productos de la oxidación (peróxidos y malonaldehído). Respecto al índice de peróxidos, se observa claramente como el aceite de aguacate sin antioxidante (control) incrementa rápidamente su valor de peróxido, a comparación de añadir extracto de *H. pluvialis*, lo que redujo dicho valor. El añadir extracto de *H. pluvialis* disminuyó el valor de peróxidos, esto es debido a que los antioxidantes presentes en el alga, los cuales principalmente son astaxantina monoéster, actúa como un aceptor de radicales libres, lo cual retrasaría la velocidad con la que el aceite se está oxidando (Pu & Sathivel, 2011). Así mismo, no se observa diferencia estadísticamente significativa al variar la concentración de *H. pluvialis* (100,500 y 1000 ppm), lo cual coincide con lo

reportado por Wang., *et al.*, (2012), quienes añadieron extracto de *H. pluvialis* (200, 600 y 1000 ppm) en un aceite de girasol y observaron que en este intervalo de concentraciones no se observó diferencia notoria en el índice de peróxidos. Lo anterior implica que quizá sea necesario evaluar concentraciones mayores y observar su influencia en la oxidación del aceite. El que no se observe diferencia entre las concentraciones mencionadas podría deberse a que como menciona Rao, *et al.*, (2007) la astaxantina en *H. pluvialis* al estar esterificada (principalmente como astaxantina monoéster) tiende a ser más estable y empieza a degradarse arriba de 90°C. Se ha reportado que el uso de carotenoides en el aceite de aguacate es alternativa para brindarle mayor estabilidad oxidativa, (Cerecedo-Cruz *et al.*, 2018), añadieron una oleoresina obtenida del chile chipotle en relación 1:3 (p/v: chile chipotle/aceite de aguacate), y observaron que el contenido de peróxidos al cabo de 28 días fue menor, que el control que no contenía carotenoides obtenidos del chile chipotle. Por otro lado, en las tres temperaturas evaluadas 25,45 y 65 °C, se puede observar en el índice de peróxidos del aceite de aguacate con astaxantina, una tendencia prooxidante, en el análisis estadístico realizado se obtuvo que existe diferencia significativa entre el aceite con aguacate con astaxantina y el aceite de aguacate control. Podríamos inferir que al usar 400 ppm de astaxantina se observó un aumento en la oxidación comparándolo con el aceite de aguacate control, sobre todo al incrementar la temperatura. Esto concuerda con lo reportado por Espinaco, *et al.*, (2021), donde evaluaron el índice de peróxidos al aceite chía, adicionando 400 ppm de astaxantina y observaron una tendencia a oxidar más rápido el aceite control (aceite de chía sin antioxidante). La muestra de aceite con TBHQ a 25 y 45°C no presento diferencia significativa comparado con los aceites que contienen *H. pluvialis*, sin embargo, a 65°C se presenta diferencia significativa, mostrando el menor índice de peróxidos. Por otro lado, para la cuantificación de los productos secundarios de la oxidación, determinados por el método de TBARS obteniendo mg eq. MDA/Kg de aceite, se observa que a 25°C la muestra de aceite con 1000 ppm de *H. pluvialis* presenta el valor más alto, a 45°C el aceite de aguacate control y a 65°C el aceite de aguacate con astaxantina. Este método nos brinda información acerca de cómo se comenzará a comportar el índice de peróxidos, Du & Bramlage, (1993). demostraron que el valor de peróxido en los aceites está altamente correlacionado con la concentración de malonaldehído, ya que puede ser oxidado por los peróxidos y producir mayor concentración de malonaldehído como producto de oxidación,

de acuerdo con la figura 9, podríamos deducir que el aceite con astaxantina y con 1000 ppm de *H. pluvialis*, eventualmente mostraran una tendencia prooxidante en el índice de peróxidos. En algunos casos al incrementar la temperatura, el efecto de los antioxidantes se puede perder, incluso actuar como prooxidante en altas concentraciones (Yeşilsu & Özyurt, 2019).

7.5 Índice de peróxidos a diferentes temperaturas de almacenamiento

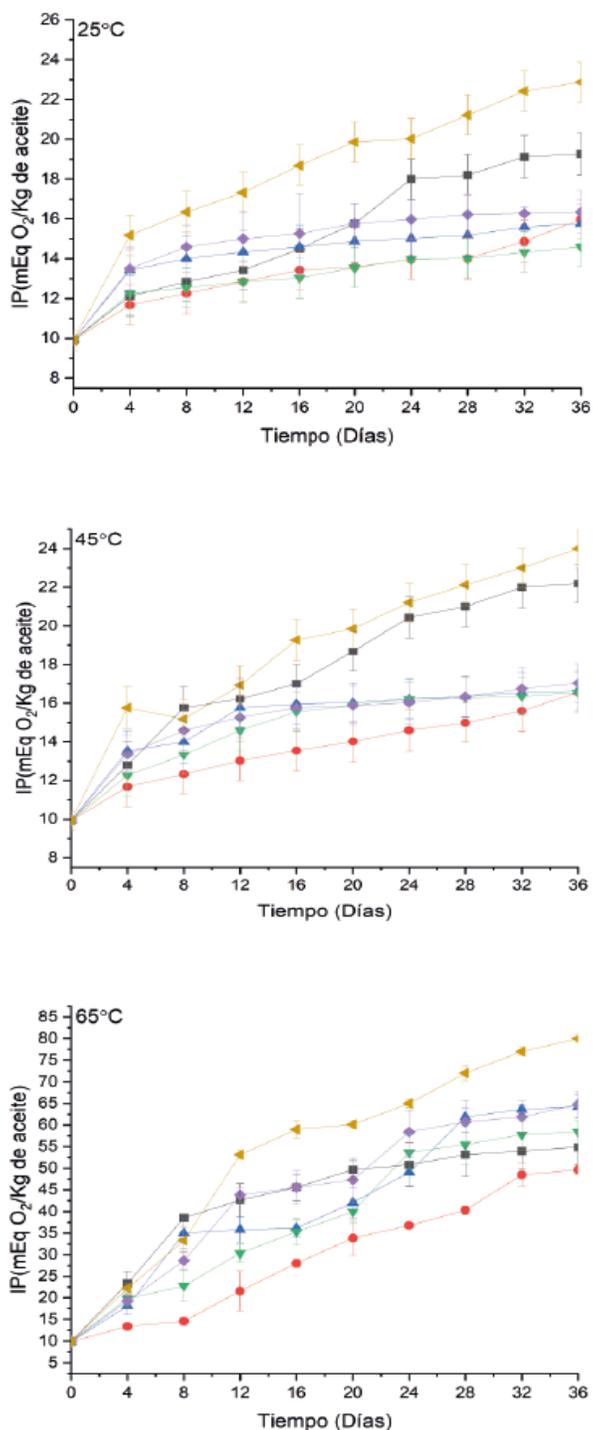


Figura 8. Oxidación primaria de aceite de aguacate (control) y muestras adicionadas con antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + TBHQ ▲ Aceite de aguacate + 100 ppm ext. *H. pluvialis* ▼ Aceite de aguacate + 500 ppm ext. *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + 1000 ppm ext. *H. pluvialis* ◀ Aceite de aguacate + 400 ppm de astaxantina. Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones.

7.6 Malonaldehido a diferentes temperaturas de almacenamiento.

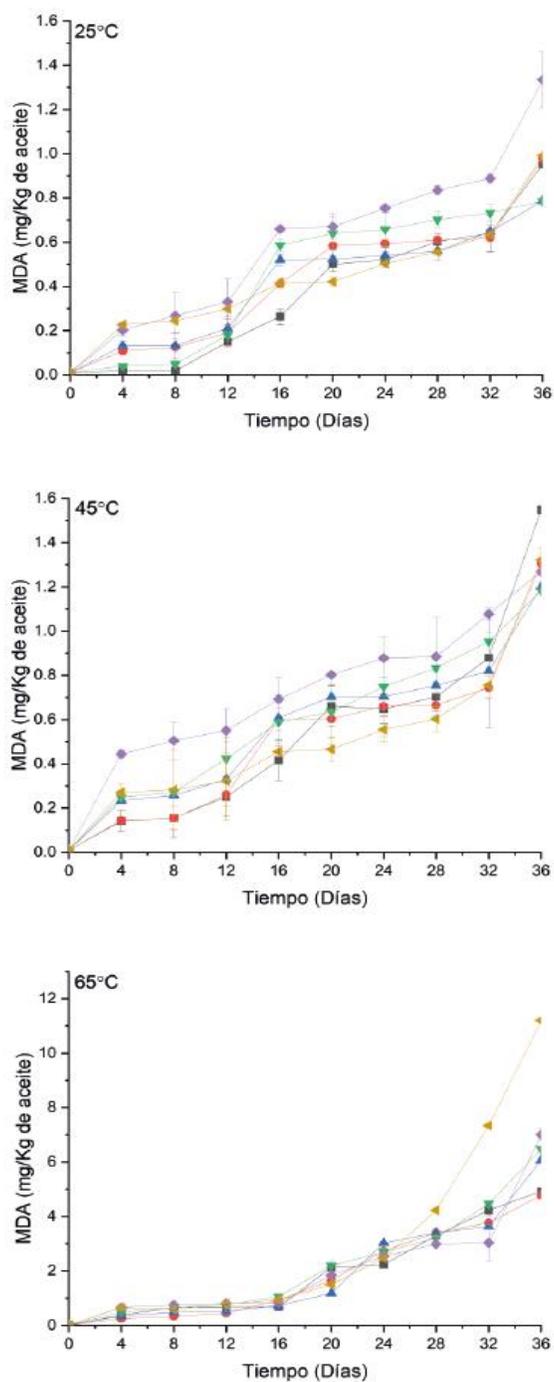


Figura 9. Oxidación avanzada del Malonaldehido (MDA) del aceite de aguacate con distintos antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + TBHQ ▲ Aceite de aguacate + 100 ppm ext. *H. pluvialis* ▼ Aceite de aguacate + 500 ppm ext. *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + 1000 ppm ext. *H. pluvialis* ◀ Aceite de aguacate + 400 ppm de astaxantina. Los valores obtenidos son promedios de tres repeticiones.

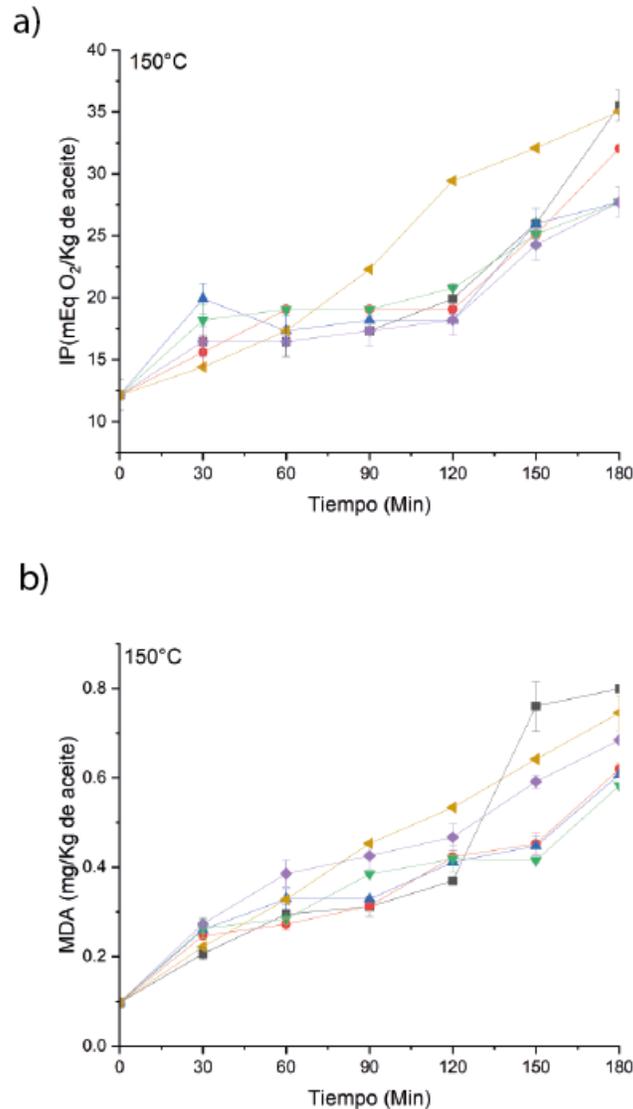


Figura 10. Comparación de la oxidación primaria y avanzada de (a) índice de peróxidos y (b) producción de malonaldehído (MDA) en el aceite de aguacate con distintos antioxidantes, a 150°C. ■Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + TBHQ ▲ Aceite de aguacate + 100 ppm ext. *H. pluvialis* ▼ Aceite de aguacate + 500 ppm ext. *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + 1000 ppm ext. *H. pluvialis* ◀ Aceite de aguacate + 400 ppm de astaxantina

Ceredero-Cruz, *et al.*, (2018), propusieron un modelo de orden uno para describir el proceso de oxidación del aceite de aguacate prensado en frío cuyos parámetros cinéticos coinciden con los resultados obtenidos. Así mismo, según lo presentado en la tabla 11, se observa que la velocidad de los procesos de oxidación aumenta su velocidad de reacción si no hay antioxidantes (Zhang, *et al.*, 2020).

La muestra de aceite A tiene la constante de velocidad más alta para la formación de peróxidos. Esto sugiere que los peróxidos se forman más rápidamente en este aceite en comparación con las otras muestras, lo cual podría ser debido a que el aceite no contiene antioxidantes. Es importante tener en cuenta que una alta velocidad de formación de peróxidos puede ser problemática, ya que los peróxidos son compuestos oxidantes que pueden afectar la calidad del aceite. El aceite AT tiene una constante de velocidad más baja en comparación con el aceite A. Esto indica que la formación de peróxidos es un proceso un poco más lento en este aceite. En aplicaciones donde se requiere una mayor estabilidad y una vida útil más larga, una velocidad de formación de peróxidos más baja puede ser beneficiosa. Para las muestras A100, A500 y A1000, presentan la misma constante de velocidad. Esto indica que la formación de peróxidos en estas muestras es lenta y se produce a la misma velocidad. El aceite AX tiene una constante de velocidad mayor en comparación con las muestras A100, A500 y A1000, pero menor que la muestra A. Esto sugiere que la formación de peróxidos es más rápida que en las muestras A100, A500 y A1000, pero aún más lenta que en la muestra A.

La E_a es la cantidad mínima de energía necesaria para que inicie el proceso de oxidación en aceites, se explica como la relación existente entre la velocidad de oxidación en función del cambio de temperatura (Singh, *et al.*, 2023). Lo anterior debido a que, a bajas temperaturas, los procesos de oxidación son más lentos y las moléculas necesitan más energía para iniciar la reacción de oxidación. Otro factor que influye directamente en la energía de activación es el grado de instauración de un aceite, donde a mayor grado de instauración, la E_a tiende a ser menor y por lo tanto un aceite más inestable (Villanueva, *et al.*, 2017). Ceredero-Cruz, *et al.*, (2018), añadieron una olerresina de chile chipotle al aceite de aguacate prensado en frío y para la formación de peróxidos obtuvieron una E_a de 34.6 kJ/mol. En los resultados presentados en la tabla 11 se observa que el aceite de aguacate obtenido presentó una energía de activación de 24 kJ/mol, la cual es menor a lo obtenido por Ceredero-Cruz y colaboradores, esto podría ser debido a que añadieron los carotenoides del chile chipotle y esto incrementa la energía de activación en el aceite de aguacate. En diversas investigaciones, al añadir antioxidantes en aceites se observa que se incrementa la E_a respecto al control (Villanueva, *et al.*, 2017). Al tener alta E_a , las moléculas necesitan más energía para iniciar la reacción de oxidación lo cual indica un tiempo de inducción más largo

y por ende mayor estabilidad frente a la oxidación. Piedrahita, *et al.*, (2015) añadieron extracto de romero en aceite de choibá y observaron que la energía de activación aumenta alrededor de un 60% con respecto al aceite control. Pu & Sathivel (2011) determinaron la E_a al aceite de linaza control y con astaxantina, donde obtuvieron E_a de 51.07 y 65.84 kJ/mol respectivamente.

Tabla 11. Productos de la oxidación primaria: Índice de peróxidos: parametros cineticos de la ecuacion de arrhenius del aceite de aguacate, con distintos tratamientos.

Método índice de peróxidos (meq O ₂ /Kg)						
Parámetros cinéticos	Muestras de aceites					
	A	AT	A100	A500	A1000	AX
E_a (Kj mol ⁻¹)	24.65	30.78	41.60	41.60	41.60	27.48
K ₀	0.00034	0.00027	0.00020	0.00020	0.00020	0.00030
R ²	0.8074	0.7179	0.8702	0.8702	0.8702	0.8235

Tabla 12. Productos de la oxidación avanzada (Malonaldehido): parametros cineticos de la ecuacion de arrhenius del aceite de aguacate, con distintos tratamientos.

Método TBARS (Eq. Malonaldehido)						
Parámetros cinéticos	Muestras de aceite					
	A	AT	A100	A500	A1000	AX
E_a (Kj mol ⁻¹)	23.32	28.73	31.28	23.77	17.85	16.82
K ₀	0.00036	0.00029	0.00027	0.00035	0.00047	0.00049
R ²	0.8749	0.9699	0.9982	0.7766	0.7844	0.7692

7.7 Actividad antioxidante de aceites con *H. pluvialis*

En cuanto a los resultados obtenidos para la actividad antioxidante observados en la figura 11, por medio de los métodos de ABTS y DPPH, para el método de ABTS, se puede observar como el aceite con astaxantina disminuye drásticamente su contenido antioxidante al incrementar la temperatura, en cambio en los aceites con extracto de *H. pluvialis*, se observa mayor estabilidad en el almacenamiento, esto debido a que en *H. pluvialis*, la astaxantina presente se encuentra esterificada, lo cual le brinda mayor estabilidad. Wang, *et al.*, (2012), añadió extracto de *H. pluvialis* en distintas concentraciones al aceite de girasol y observo que

no existía diferencia significativa de la degradación de la actividad antioxidante, respecto al tiempo. En el método de DPPH, se observan menores valores de TEAC debido a que este método tiene mayor afinidad a compuestos polares, y los principales constituyentes de los aceites evaluados son no polares, afines al aceite, por ende, en ABTS, que es un método que abarca un espectro más amplio de compuestos tanto polares y no polares, nos da un valor más alto (Bibi, *et al.*, 2020).

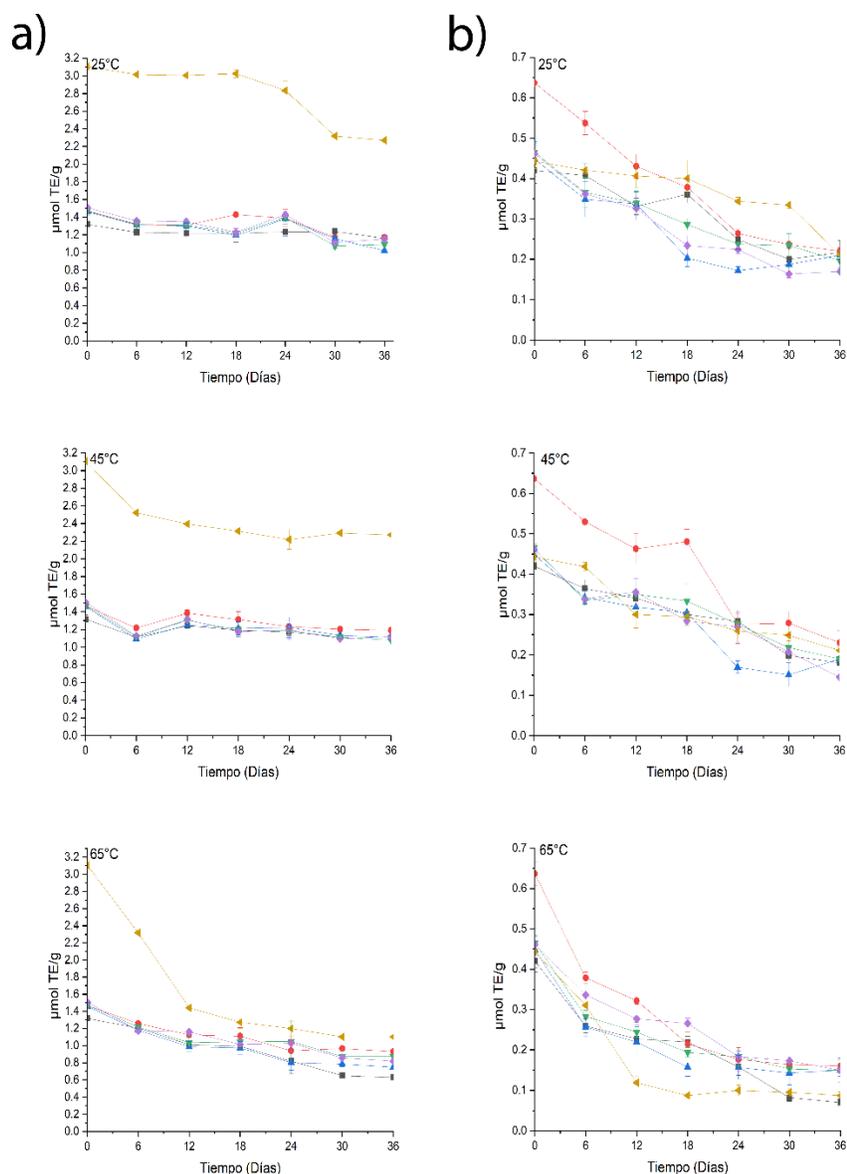


Figura 11. Actividad antioxidante ABTS (a) y DPPH (b) del aceite de aguacate con distintos antioxidantes, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + TBHQ ▲ Aceite de aguacate + 100 ppm ext. *H. pluvialis* ▼ Aceite de aguacate + 500 ppm ext. *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + 1000 ppm ext. *H. pluvialis* ◀ Aceite de aguacate + 400 ppm de astaxantina.

7.8 Caracterización de la emulsión: estabilidad física

En la figura 12, se puede apreciar las emulsiones al paso del tiempo a las distintas temperaturas, a partir del día 9 en todas las temperaturas evaluadas se observa un ligero sedimento, sobre todo en la emulsión EAHC, esto debido a que es una emulsión altamente concentrada en su fase dispersa, sin embargo, al realizar una ligera agitación manual, la emulsión se vuelve a resuspender y homogenizarse sin problema. Otro dato destacable es la emulsión EAT, la cual contiene TBHQ y se observa como a 45°C a partir del día 27, una coloración amarilla y a 65°C a partir del día 9 dicha coloración, esto podría ser debido a que el exceso de TBHQ resulta prooxidante en la emulsión, lo cual podría acelerar el proceso de oxidación.

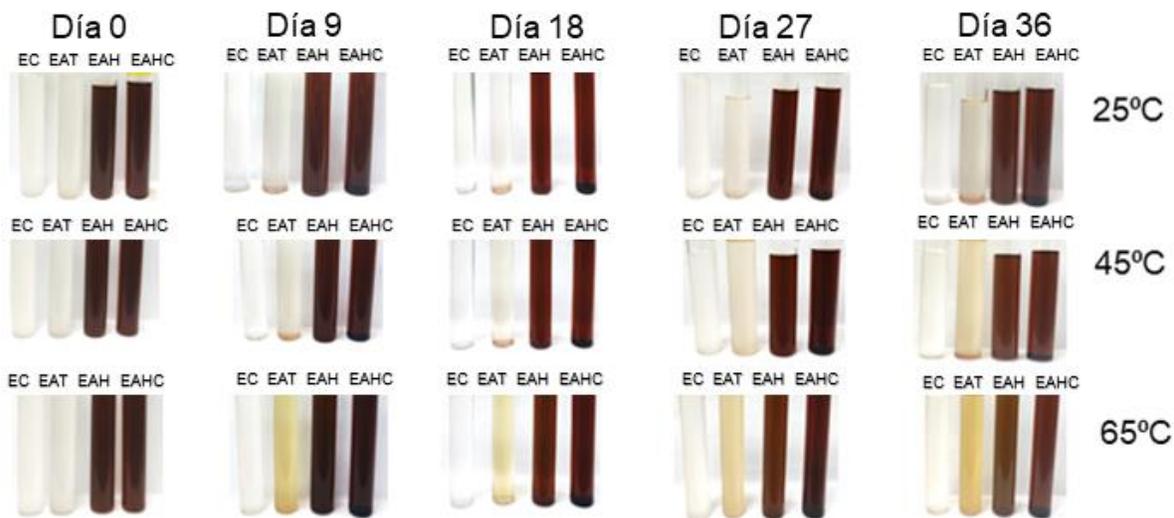


Figura 12. Emulsiones a distintas temperaturas 25, 45 y 65°C monitoreadas durante 36 días.

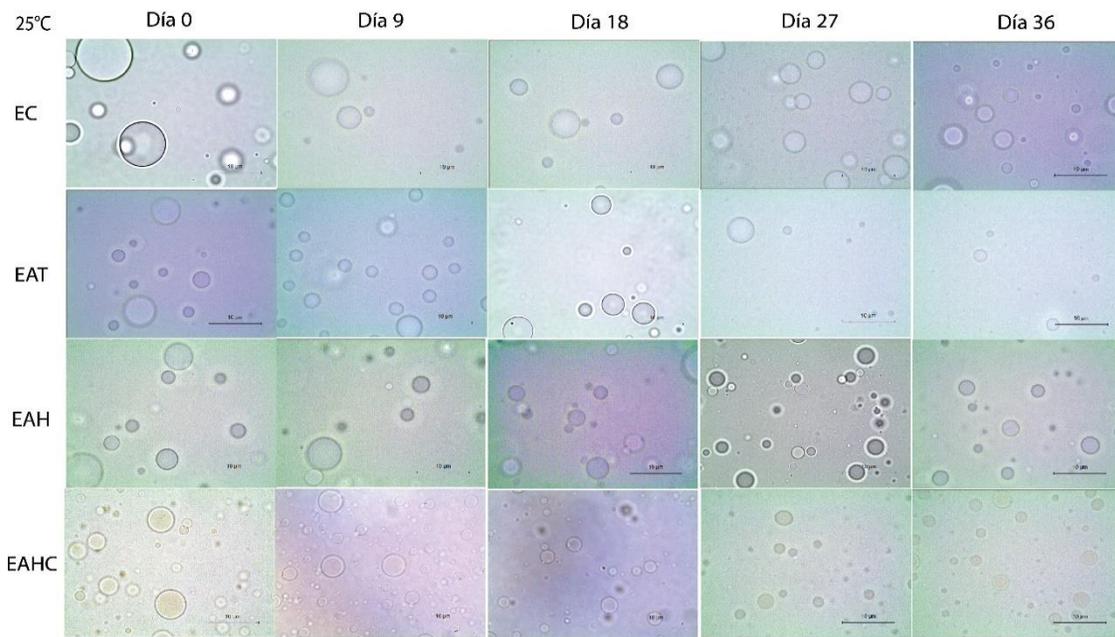


Figura 13. Micrografías 100x de las emulsiones a 25°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.

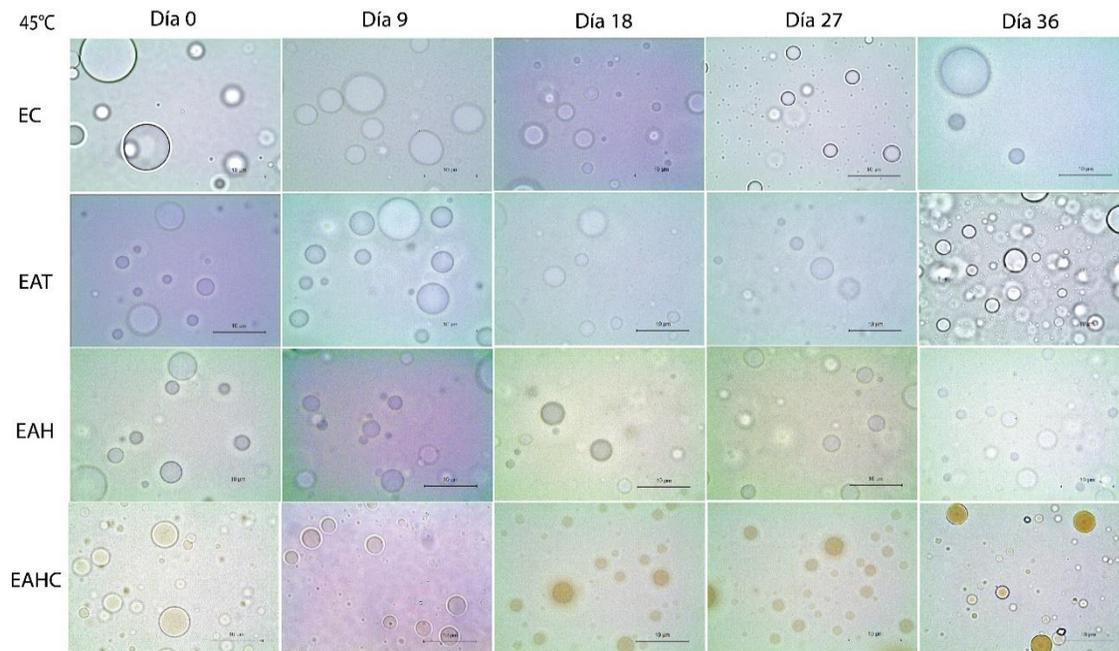


Figura 14. Micrografías 100x de las emulsiones a 45°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.

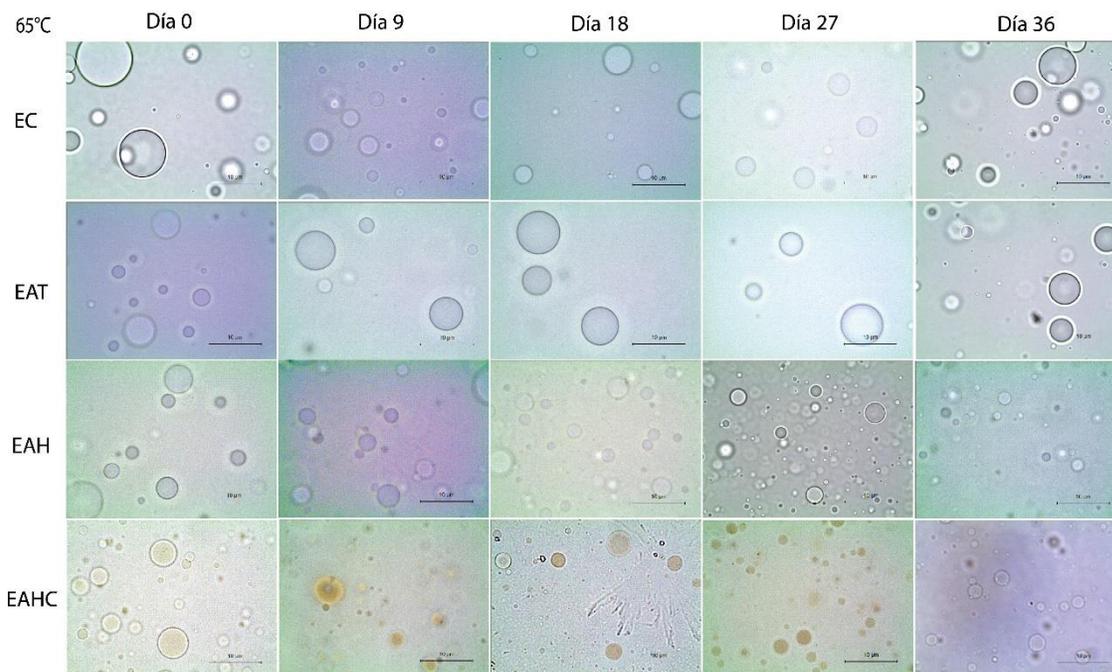


Figura 15. Micrografías 100x de las emulsiones a 65°C monitoreadas durante 36 días, realizadas por triplicado.

Las formulaciones de emulsiones desarrolladas tienen un 8% de fase dispersa, 83% aceite y 9% polirricinoleato de poliglicerol. Se optó por un alto % de emulsificante considerando que se están desarrollando emulsiones altamente concentradas en ambas fases, Vladislavljević, *et al.*, (2000), desarrollaron emulsiones w/o utilizando polirricinoleato de poliglicerol como emulsionante y observaron que al aumentar el contenido de emulsificante a 10% obtuvieron tamaño de partícula menores. Se evaluaron distintas formulaciones variando el contenido de la fase acuosa interna y la fase oleosa (Tabla 4). En la figura 16 se puede observar cómo varía el tamaño de partícula d_{32} a las distintas temperaturas de almacenamiento. Se obtuvieron tamaños de partícula entre 3 y 4.5 µm, la emulsión control (EC) presentó el tamaño de partícula inicial más alto, seguido de la emulsión con TBHQ (EAT), después EAH y el tamaño más pequeño para EAHC, lo cual coincide con lo observado en las micrografías en las figuras 13, 14 y 15. En ninguna de las temperaturas evaluadas se observa diferencia significativa en el tiempo para la emulsión EAHC. Para la emulsión EC y EAT se observa como el tamaño de partícula aumenta y posteriormente disminuye esto podría ser debido al

fenómeno de coalescencia, el cual posteriormente origina el rompimiento de las partículas, perdiendo su contenido encapsulado y por ende el tamaño de partícula disminuirá. (Kosegarten-Conde, C y Jiménez-Munguía, 2012),

Al-Sabagh, *et al.*, (2011) desarrollaron emulsiones w/o donde observaron el efecto de la cantidad de fase dispersa en el tamaño de partícula, evaluaron el tamaño de partícula usando 5, 10 y 14% de agua en las emulsiones, y observaron que al incrementar el % de agua el tamaño aumentaba. Si se disminuye la cantidad de fase dispersa, el tamaño de partícula podría ser menor, pero la cantidad de fase dispersa utilizada se eligió porque era la cantidad necesaria para solubilizar correctamente las catequinas. Así mismo, al utilizar altos porcentajes de fase oleosa w/o, se ha observado que el tamaño de partícula tiene a ser mayor a diferencia de emulsiones o/w, esto debido a que la viscosidad de la fase oleosa influye en el tamaño de partícula (Sugiura, *et al.*, 2001), otro factor que influye en la viscosidad es la cantidad de emulsificante empleada, Nour & Yunus, 2006, mencionan que dicha concentración y el volumen de la fase dispersa influyen altamente en el tamaño de partícula y la estabilidad de una emulsión. Al disminuir la cantidad de fase dispersa, la separación de fases respecto al tiempo también disminuye. El aumento de concentración de emulsificante modifica la viscosidad de la emulsión. Los resultados obtenidos son similares a Zembyla, *et al.*, (2019), realizaron emulsiones w/o con curcumina, y observaron que al aumentar el % de agua de la fase dispersa, de 5 a 20%, el tamaño de partícula aumento de 20 a 25 μm .

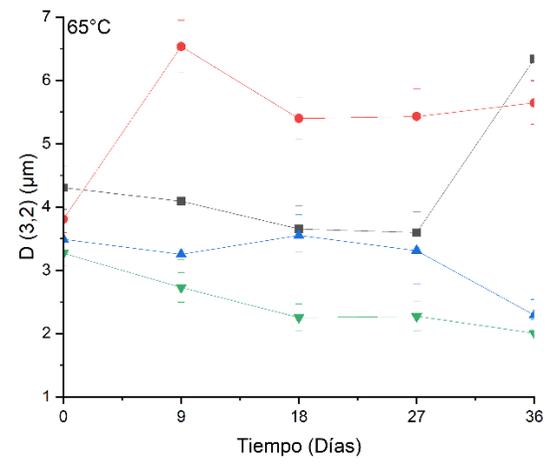
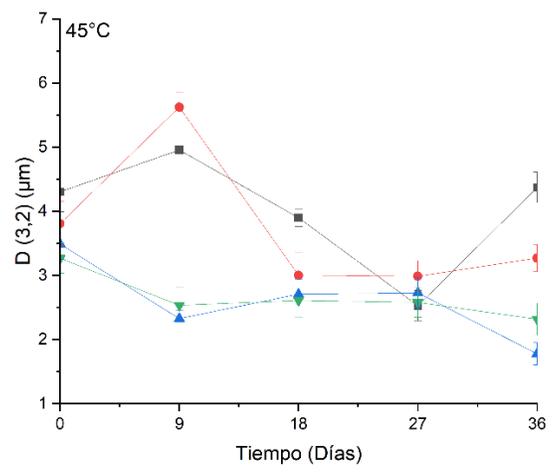
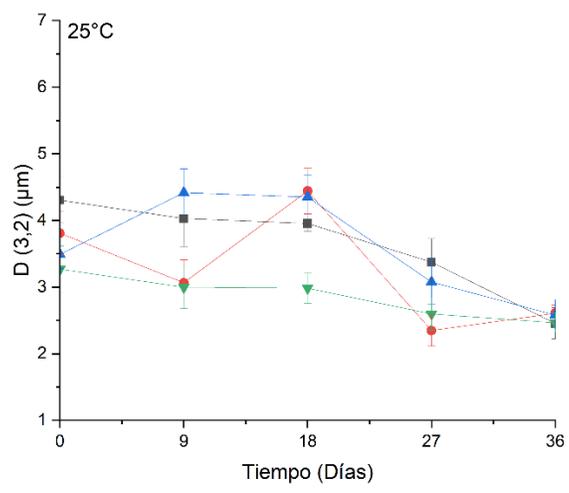


Figura 16. Gráfico del tamaño de partícula ($d_{3,2}$) al paso del tiempo de las emulsiones.

■ EC ■ EAT ■ EAH ■ EAHC

7.9 Aceites con emulsiones

En la figura 17 se puede observar los aceites con la emulsión añadida, se observan homogéneos y no se presentó una sedimentación que pudo haber sucedido por añadir una emulsión. La cantidad de emulsión que se añadió al aceite fueron 5.5 g por cada 100 g de aceite de aguacate, considerando la cantidad de emulsificante (PGPR) añadida, esto para cumplir con la NMX-F-016-SCFI-2007 que establece un máximo permisible de 0.5 % de esteres de poliglicerol y ácidos grasos.

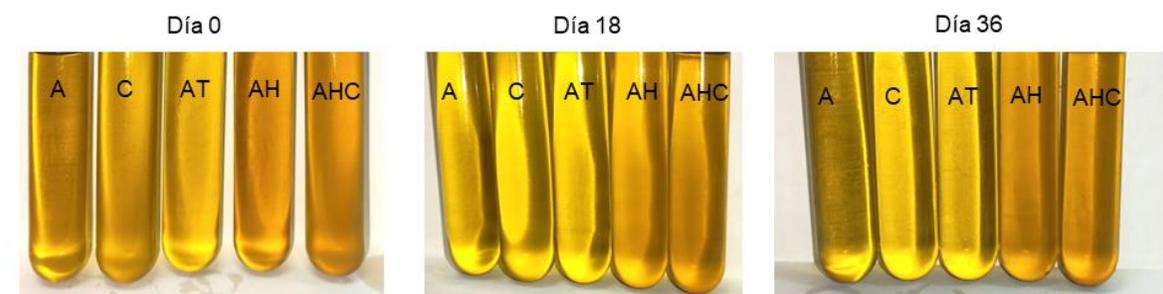


Figura 17. Fotografías tomadas a los aceites con emulsión, almacenados a 25°C en presencia de luz.

7.10 Estabilidad oxidativa de aceites con emulsiones

En la figura 18 se observa la evolución del índice de peróxidos del aceite de aguacate con emulsión al transcurso del tiempo a las distintas temperaturas evaluada, a 25, 45 y 65°C se puede observar como el aceite de aguacate control se oxida más rápido. En las temperaturas evaluadas, no hay diferencia significativa entre el aceite de aguacate con la emulsión AT y el aceite de aguacate con la emulsión AHC. Se ha reportado que las catequinas pueden disminuir la velocidad de formación de peróxidos en aceites, tal como menciona Nain, *et al.*, (2022), añadieron catequinas a un aceite con alto contenido de omega 3 (DHA) y observaron que ralentizo la formación de peróxidos. Sin embargo, es importante destacar que estos compuestos fenólicos son inestables en temperaturas altas, ya que suelen degradarse drásticamente respecto al tiempo, y aún más a altas temperaturas (Guzmán-Díaz, *et al.*, 2019). El aceite de aguacate con la emulsión AH presenta diferencia significativa respecto al aceite con AHC a 25 y 45°C. Se observó un menor valor de oxidación tanto en peróxidos como en malondaldehído (figura 19) al comparar el aceite de aguacate con AH, respecto al que tiene AHC, esto coincide con lo reportado por Gülmez & Şahin, (2019), donde determinaron la estabilidad oxidativa en aceite de avellana, observando el efecto del ácido gálico y β -caroteno como antioxidantes, obtuvieron resultados, en donde el aceite de avellana

control presenta una mayor tendencia a la oxidación, y que el añadir ácido gálico y β -caroteno redujo el valor de peróxidos, a temperatura ambiente el aceite de avellana a los 36 días obtuvo 52 meq O_2/Kg , el aceite de avellana con ácido gálico 51.17 O_2/Kg , aceite de avellana con β - caroteno 50.04 O_2/Kg , aceite de avellana con ácido gálico y β -caroteno 44.13 O_2/Kg y el aceite de avellana con TBHQ 38.29 O_2/Kg , lo cual es similar a los datos obtenidos en las figura 19 esto podría ser debido a que las catequinas estén actuando regenerando los carotenoides presentes en la fase oleosa. Un efecto parecido se observó en la investigación de Zhou, *et al.*, (2021), quienes observaron el efecto protector proporcionado por el aceite de clavo, el cual contiene eugenol, sobre el β -caroteno y obtuvieron que el aceite de clavo protege contra la foto degradación al β - caroteno. Yin, *et al.*, (2012) evaluaron el efecto sinérgico entre catequinas y α -tocoferol en aceite de girasol, primeramente, observaron que, al incrementar la concentración de catequinas añadidas en el aceite, obtenían tiempos de inducción más altos, por ende, un aceite más estable frente a la oxidación. Respecto al efecto sinérgico, obtuvieron que las catequinas en relación 1:1 con el α - tocoferol mostraban un efecto sinérgico.

Se podría atribuir al efecto sinérgico mencionado anteriormente, las catequinas son inestables a temperatura mayor de 60°C, incrementando la formación de peróxidos, en el cual se observa el efecto prooxidante. El exceso de antioxidante no necesariamente reduce la formación de peróxidos. No obstante, faltan estudios para confirmar esto el efecto sinérgico y prooxidante.

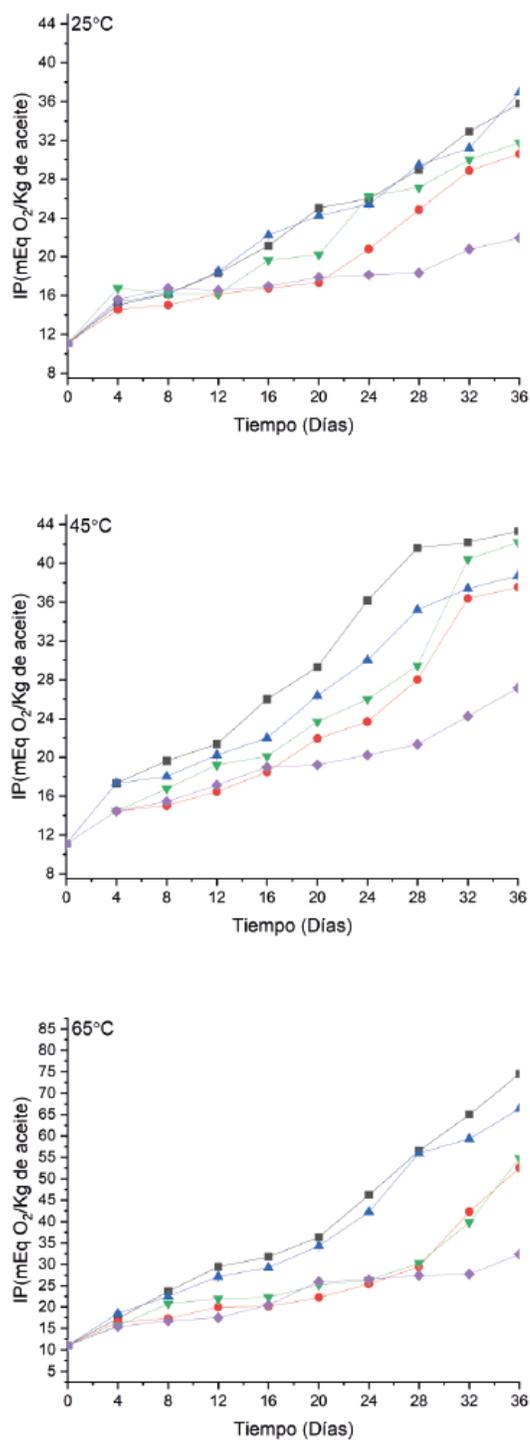


Figura 18. Oxidación primaria: Índice de peróxidos en aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + emulsión con TBHQ ▲ Aceite de aguacate + emulsión control ▼ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* y catequina.

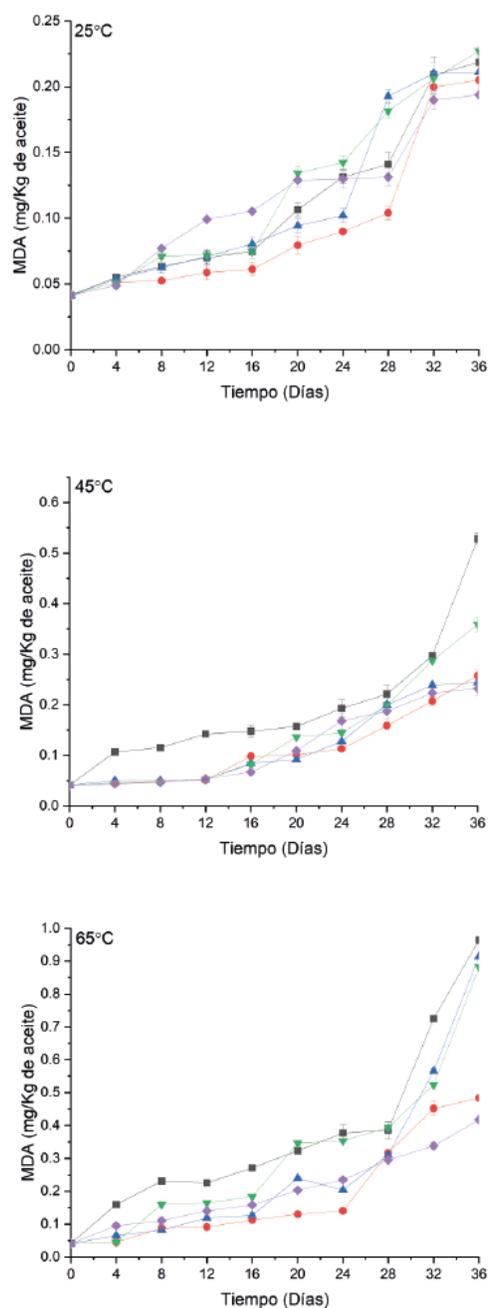


Figura 19. Oxidación avanzada: producción de Malonaldehído (MDA) del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + emulsión con TBHQ ▲ Aceite de aguacate + emulsión control ▼ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* y catequina.

La energía de oxidación en aceites es un factor crítico que determina su estabilidad y vida útil. La muestra de aceite de aguacate (A) tiene una E_a relativamente baja. Esto significa que la oxidación de este aceite ocurre más fácilmente y a temperaturas más bajas en comparación

con otras muestras. Es importante tener en cuenta que la baja E_a podría ser beneficiosa en aplicaciones donde se busca una rápida oxidación, como en la producción de biodiesel. Se observa una tendencia similar en la muestra de aceite C, la cual tiene una E_a baja, similar a la del aceite A. Esto debido a que la muestra C, es aceite de aguacate con una emulsión control, es decir no contiene antioxidantes, debido a esto podría presentar una E_a muy parecida a la muestra A. El aceite AT tiene una E_a significativamente mayor en comparación con el aceite A., debido a la adición de TBHQ. Esto sugiere que la oxidación de este aceite es un proceso más lento y requiere una temperatura más alta para activarse. Este tipo de aceite podría ser preferible en aplicaciones donde se busca una mayor estabilidad y una vida útil prolongada, con las limitantes atribuidas al TBHQ y su impacto en la salud del consumidor. El aceite AH tiene una E_a similar al aceite AT, lo que indica que la oxidación de ambos aceites es igualmente lenta y requiere temperaturas altas. Sin embargo, el aceite AH podría tener otras propiedades que lo diferencian del aceite AT, como el uso de antioxidantes obtenidos de fuentes naturales, en este caso del alga *H. pluvialis*. El aceite AHC tiene la E_a más alta de todas las muestras. Esto significa que es el aceite más resistente a la oxidación y requiere condiciones de temperatura más altas para iniciar el proceso de oxidación. Este tipo de aceite es ideal en aplicaciones donde se busca una alta estabilidad y una vida útil prolongada.

Tabla 13. Productos de la oxidación primaria: Índice de peróxidos; parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsión.

Método índice de peróxidos (meq O ₂ /Kg)					
Parámetros cinéticos	Muestras de aceites con emulsión				
	A	AT	C	AH	AHC
E_a (Kj mol ⁻¹)	20.10	75.25	17.84	76.46	83.19
K0	0.00041	0.00011	0.00047	0.00011	0.00010
R ²	0.9552	0.7693	0.8472	0.7884	0.8494

Tabla 14. Productos de la oxidación secundaria (Malonaldehído): parámetros cinéticos de la ecuación de Arrhenius del aceite de aguacate (control) y adicionado con emulsión.

Método TBARS (Eq. Malonaldehído)					
Parámetros cinéticos	Muestras de aceites con emulsión				
	A	AT	C	AH	AHC
Ea (Kj mol ⁻¹)	31.40	22.84	31.15	31.40	29.84
K0	0.00026	0.00036	0.00027	0.00026	0.00028
R ²	0.9934	0.9657	0.9147	0.9934	0.635

7.11 Actividad antioxidante de aceites adicionados con emulsiones

Los resultados de la actividad antioxidante revelan que la muestra de aceite de aguacate con extracto de *H. pluvialis* y catequina (AHC) muestra una actividad antioxidante significativamente más alta en comparación con la muestra de aceite de aguacate con extracto de *H. pluvialis* (AH). Se observa diferencia estadísticamente significativa entre el aceite con AHC respecto a los demás aceites, en ambas metodologías (ABTS y DPPH) (figura 20).

Este aumento en la actividad antioxidante en AHC es notable y sugiere la posible existencia de un efecto sinérgico entre los carotenoides presentes en *H. pluvialis* y la catequina. La hipótesis de este efecto sinérgico es que la combinación de carotenoides y catequina puede interactuar de forma cooperativa para proporcionar una mayor protección antioxidante que la que daría cualquiera de estos componentes por separado. Aunque no se evaluó directamente la actividad antioxidante de la muestra de aceite de aguacate con catequina, se podría argumentar que la presencia de este flavonol en AHC y su capacidad para mejorar la actividad antioxidante en comparación con AH respaldan la idea de un efecto sinérgico. Es importante reconocer las limitaciones del estudio, en particular, la evaluación directa del aceite de aguacate con catequina. Para confirmar la sinergia y entender la contribución de los polifenoles, futuros estudios incluirían la evaluación del aceite de aguacate con catequina y estudios adicionales para caracterizar las interacciones entre carotenoides y polifenoles a nivel molecular. Este sistema emulsionado con carotenoides y catequina es útil para la incorporación de antioxidantes con distintas polaridades, para usarlos en aceites.

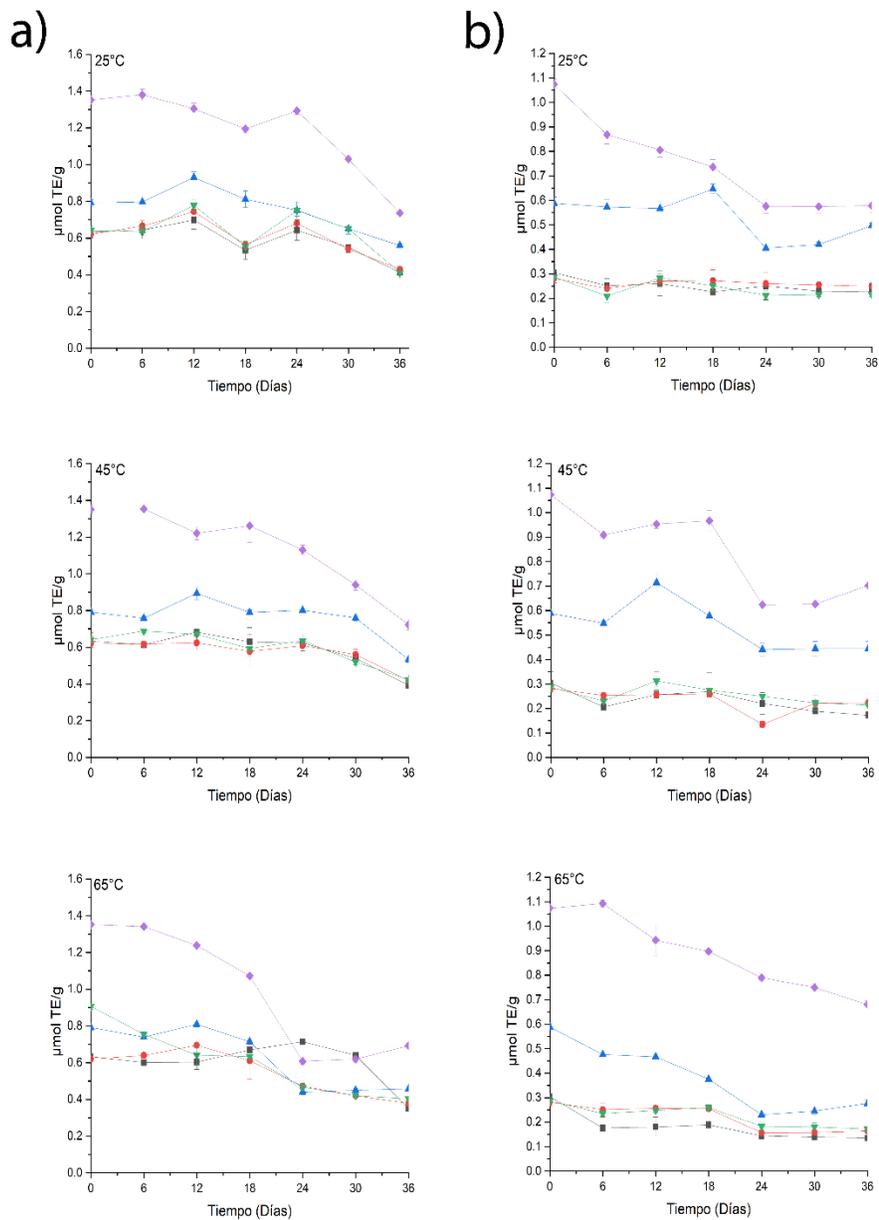


Figura 20. Actividad antioxidante ABTS (a) y DPPH (b) del aceite de aguacate con emulsiones, a diferentes temperaturas de almacenamiento a 25°C, 45°C y 65°C. ■ Aceite de aguacate ● Aceite de aguacate + emulsión con TBHQ ▲ Aceite de aguacate + emulsión control ▼ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* ◆ Aceite de aguacate + emulsión con *H. pluvialis* y catequina.

8. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un aceite fisicoquímicamente que cumple con la normativa mexicana.
- Se determinó que al emplear 20.2 watts de energía sónica en la obtención de un extracto de *H. pluvialis*, se logró una concentración de astaxantina (8.26 mg/Kg) y actividad antioxidante (7.3 μ mol eq. Trolox/g) más elevadas en comparación con el uso de 2.8 W y 15.3 W.
- La adición de 500 ppm de extracto de *H. pluvialis* al aceite de aguacate demostró una disminución en el proceso de oxidación, aunque no alcanzó niveles de eficacia superiores a los observados con el uso de TBHQ.
- La adición del 9% de PGPR resultó en una emulsión estable con un tamaño de partícula promedio de 3 μ m.
- Las emulsiones AH Y AHC presentaron una ligera sedimentación, por el exceso de carotenoides y catequina, no obstante, al añadirlas al aceite de aguacate se observó una completa disolución, obteniendo aceites homogéneos.
- La emulsión con extracto de alga (AH) demuestra una reducción del 26% en la formación de peróxidos en el aceite de aguacate, mientras que la emulsión con TBHQ (AT) alcanza una disminución del 29%. Estos resultados destacan la eficacia del TBHQ en comparación con el AH. Por otro lado, la emulsión AHC, enriquecida con carotenoides y catequina, sobresale como un aditivo antioxidante natural al reducir la formación de peróxidos en un 57% en comparación con el control. Esta notable disminución posiciona a la emulsión AHC como una opción altamente efectiva para reemplazar el uso de antioxidantes sintéticos en la industria alimentaria, ofreciendo una alternativa más saludable y natural.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la citotoxicidad del extracto de *H. pluvialis*.
- Explorar un rango más extenso de concentraciones de *H. pluvialis* para determinar si mayores concentraciones mejoran la protección contra la oxidación.
- Purificar la astaxantina esterificada del extracto de *H. pluvialis*.
- Evaluar distintas proporciones de fase dispersa en las emulsiones y observar su impacto en el tamaño de partícula y separación de fases.
- Evaluar distintas concentraciones de catequina en la emulsión para comprobar el efecto sinérgico.
- Realizar una emulsión con catequina sin *H. pluvialis* y ver su efecto en la oxidación del aceite de aguacate.
- Evaluar la efectividad de la emulsión con *H. pluvialis* y catequinas en otros aceites con distintos contenidos y proporciones de ácidos grasos insaturados.
- Realizar una prueba sensorial y/o organoléptica del aceite con *H. pluvialis*.

10. BIBLIOGRAFÍA

Al-Sabagh, A. M., Emara, M. M., El-Din, M. N., & Aly, W. R. (2011). Formation of water-in-diesel oil nano-emulsions using high energy method and studying some of their surface active properties. *Egyptian Journal of Petroleum*, 20(2), 17-23.

AOCS Cc 7-25. 1998. Sampling and analysis of commercial fats and oils, Refractive Index. 5th Edition. Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society. Champaign

Benner, J. J., Sadeghi, F., Hoeprich, M. R., & Frank, M. C. (2006). Lubricating properties of water in oil emulsions.

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.

Bibi Sadeer, N., Montesano, D., Albrizio, S., Zengin, G., & Mahomoodally, M. F. (2020). The versatility of antioxidant assays in food science and safety—Chemistry, applications, strengths, and limitations. *Antioxidants*, 9(8), 709.

Bizimana, V., Breene, W. M., & Csallany, A. S. (1993). Avocado oil extraction with appropriate technology for developing countries. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 821-822.

Camacho Kurmen, J. E., González, G., & Klotz, B. (2013). Astaxanthin Production in *Haematococcus pluvialis* under different stress conditions. *Nova*, 11(19), 94-104.

Capelli, Bob; Bagchi, Debasis; Cysewski, Gerald R. (2013). Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*, 12(4), 145–152. doi:10.1007/s13749-013-0051-5

Castillo, A., Pereira, S., Otero, A., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2022). Multicomponent bioactive extract from red stage *Haematococcus pluvialis* wet paste: avoiding the drying step and toxic solvents. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1537-1553.

CEDRSSA. (2019). Almacenamiento Rural y Desperdicio de Alimentos en México. 01/05/2022, de Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria Sitio web: <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2018/CD005726.pdf>

Cerecedo-Cruz, L., Azuara-Nieto, E., Hernández-Álvarez, A. J., González-González, C. R., & Melgar-Lalanne, G. (2018). Evaluation of the oxidative stability of chipotle chili (*Capsicum annuum* L.) oleoresins in avocado oil. *Grasas y Aceites*, 69(1). <https://doi.org/10.3989/gya.0884171>

Chandra, S., Kumar, M., Dwivedi, P., & Shinde, L.P. (2020). Functional and nutritional health benefit of cold-pressed oils: a review.

CODEX STAN 33-1981 CODEX STANDARD FOR OLIVE OILS AND OLIVE POMACE OILS

Collera-Zúñiga, O., Jiménez, F. G., & Gordillo, R. M. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry*, 90(1-2), 109-114.

Crowe, T. D., & White, P. J. Adaptation of the AOCS official method for measuring hydroperoxides from small-scale oil samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(12), 1267-1269, 2001.

CXS 197-1995 - CODEX ALIMENTARIUS - NORMA PARA EL AGUACATE Adoptada en 1995. Enmendada en 2005. Revisada en 2013.

Du, Z., & Bramlage, W. J. (1993). Malondialdehyde Oxidation by Hydrogen Peroxide and by Light-Excited Riboflavin in Model Systems. *Journal of Food Science*, 58(4), 925–928. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb09392.

Durán, S. A., García, J. T., & Catalán, J. S. (2015). Aceites vegetales de uso frecuente en Sudamérica: características y propiedades. *Nutricion Hospitalaria*, 32(1), 11–19. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8874>

Elena Jiménez, M., Del, M., Aguilar, R., de La, M., Zambrano, L., & Kolar, E. (2001). Propiedades físicas y químicas del aceite de aguacate obtenido de puré deshidratado por microondas. In *Revista de la Sociedad Química de México* (Vol. 45, Issue 2).

Esch, G.J. (1986). Toxicology of tert-butylhydroquinone (TBHQ). *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1063-1065.

Eskandani, M., Hamishehkar, H., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2014). Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. *Food chemistry*, 153, 315-20 .

Espinaco, B. Y., Niizawa, I., Marino, F., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). Storage stability of chia (*Salvia hispanica* L.) oil incorporated with astaxanthin. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(2), e15184.

Fernández-Lozano, J., Guillén-Oterino, A., Gutiérrez-Alonso, G., Abel-Flores, J., & Pérez-Turrado, J. (2015). Presencia de *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) en la provincia de Zamora (*Haematococcaceae*). *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol*, 109, 103-109.

Flores, M., Saravia, C., Vergara, C. E., Avila, F., Valdés, H., & Ortiz-Viedma, J. (2019). Avocado oil: Characteristics, properties, and applications. In *Molecules* (Vol. 24, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules24112172>

Gharavi, N., Haggarty, S., & El-Kadi, A.O. (2007). Chemoprotective and carcinogenic effects of tert-butylhydroquinone and its metabolites. *Current drug metabolism*, 8 1, 1-7 .

Gobierno de México. (2017). México: Primer productor mundial de aguacate. 01/05/2022, de Gobierno de México Sitio web: <https://www.gob.mx/senasica/articulos/mexico-primer-productor-mundial-de-aguacate?idiom=es>

Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of applied phycology*, 24, 1477-1486. 2012.

Gülmez, Ö., & Şahin, S. (2019). Evaluation of oxidative stability in hazelnut oil treated with several antioxidants: Kinetics and thermodynamics studies. *Lwt*, *111*, 478-483.

Guzmán-Díaz DA, Treviño-Garza MZ, Rodríguez-Romero BA, Gallardo-Rivera CT, Amaya-Guerra CA, Báez-González JG. Development and Characterization of Gelled Double Emulsions Based on Chia (*Salvia hispanica* L.) Mucilage Mixed with Different Biopolymers and Loaded with Green Tea Extract (*Camellia sinensis*). *Foods*. 2019 Dec 13;8(12):677. doi: 10.3390/foods8120677. PMID: 31847092; PMCID: PMC6963928

Hamuro, Y., Ihara, H., & Naka, A. (1975). Water-in-oil emulsion fuel. *Chemistry, Engineering, Materials Science*

Hornero-Méndez, D., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2001). Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(8), 3584-3588.

Jacobsen, C. (2010). Challenges when developing omega-3 enriched foods. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, *17*(4), 251-258.

Jaimez-Ordaz, J., PÉREZ-FLORES, J. G., Castaneda-Ovando, A., GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G., Anorve-Morga, J., & Contreras-Lopez, E. (2019). Kinetic parameters of lipid oxidation in third generation (3G) snacks and its influence on shelf-life. *Food Science and Technology*, *39*, 136-140.

Jaiswal, M., Dudhe, R., & Sharma, P. K. (2015). Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech*, *5*(2), 123-127.

Jiménez-Colmenero, F. (2013). Emulsiones múltiples: compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutrición Hospitalaria.*, *28*(5), 1413–1421.

Kilic-Buyukkurt, O. (2021). Characterization of aroma compounds of cold-pressed avocado oil using solid-phase microextraction techniques with gas chromatography–mass spectrometry. *The Journal of Raw Materials to Processed Foods*, *2*(1), 1-7.

Kimble, J. (2022, 14 octubre). Importing Avocados: Regulations and Sourcing Alternatives. USA Customs Clearance. <https://usacustomsclearance.com/process/importing-avocados/>

Kiokias, S., & Varzakas, T. (2014). Activity of flavonoids and β -carotene during the auto-oxidative deterioration of model food oil-in water emulsions. *Food Chemistry*, 150, 280–286. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.11

Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 48, Issue 1, pp. 78–93). <https://doi.org/10.1080/10408390601079975>

Kosegarten-Conde, C. E., y Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Factores principales que intervienen en la estabilidad de una emulsión doble. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*. Puebla, México. 6-2: 1-18

Li, Y., Miao, F., Geng, Y., Lu, D., Zhang, C., & Zeng, M. (2012). Accurate quantification of astaxanthin from *Haematococcus* crude extract spectrophotometrically. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 30(4), 627-637.

Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1(1), F4-3

Lingzhao Wang; Bao Yang; Binlun Yan; Xingcun Yao (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. , 13(none), 0–127. doi:10.1016/j.ifset.2011.09.004

Línzembold, I., Czett, D., Böddi, K., Kurtán, T., Király, S. B., Gulyás-Fekete, G., Takátsy, A., Lóránd, T., Deli, J., Agócs, A., & Nagy, V. (2020). Study on the synthesis, antioxidant properties, and self-assembly of carotenoid–flavonoid conjugates. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030636>

Liu, F., Wang, D., Sun, C., & Gao, Y. (2016). Influence of polysaccharides on the physicochemical properties of lactoferrin-polyphenol conjugates coated β -carotene emulsions. *Food Hydrocolloids*, 52, 661–669. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.08.007>

- Makala, H. (2015). Cold-pressed oils as functional food. *Plant Lipids Science, Technology, Nutritional Value and Benefits to Human Health*, 185-200.
- Martysiak-Żurowska, D., & Wenta, W. (2012). A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta scientiarum polonorum technologia alimentaria*, 11(1), 83-89.
- McClements, D. J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. In *Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* (Vol. 57).
- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Sociedad LATinoamericana de Nutrición*, 54(2).
- Meng, Q., Long, P., Zhou, J., Ho, C. T., Zou, X., Chen, B., & Zhang, L. (2019). Improved absorption of β -carotene by encapsulation in an oil-in-water nanoemulsion containing tea polyphenols in the aqueous phase. *Food Research International*, 116, 731–736. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.004>
- Mezzomo, N., & Ferreira, S. R. (2016). Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology: a review. *Journal of Chemistry*, 2016.
- Mularczyk, Malwina; Michalak, Izabela; Marycz, Krzysztof (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis* multifunctional Applications. *Marine Drugs*, 18(9), 459–. doi:10.3390/md18090459
- Muñoz, J., Alfaro, M., & Zapata, I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y Aceites*, 58(1), 64–73.
- Nain, C. W., Mignolet, E., Herent, M. F., Quetin-Leclercq, J., Debier, C., Page, M. M., & Larondelle, Y. (2022). The catechins profile of green tea extracts affects the antioxidant activity and degradation of catechins in DHA-rich oil. *Antioxidants*, 11(9), 1844.

Nenseter, M. S., Halvorsen, B., Rosvold, Ø., Rustan, A. C., & Drevon, C. A. (1995). Paracetamol inhibits copper ion-induced, azo compound-initiated, and mononuclear cell-mediated oxidative modification of LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(9), 1338-1344.

NMX-F-016-SCFI-2007 ALIMENTOS – MARGARINA PARA MESA – ESPECIFICACIONES (CANCELA A LA NMX-F-016-S-1979)

NMX-F-811-SCFI-2021 ACEITES Y GRASAS -ACEITE DE AGUACATE- ESPECIFICACIONES (CANCELA AL PROYECTO PUBLICADO EL 11 DE ABRIL 2018 EN EL DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN Y CANCELA A LA NMX-F-052-SCFI-2008)

Nogala-Kałucka, M., Dwiecki, K., Siger, A., Górnaś, P., Polewski, K., & Ciosek, S. (2013). Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin in model system. *Acta Alimentaria*, 42(3), 360-370.

NOM-128-SCFI-1998. NORMA OFICIAL MEXICANA, INFORMACION COMERCIAL-ETIQUETADO DE PRODUCTOS AGRICOLAS-AGUACATE.

Ohkatsu, Y., & Suzuki, F. (2011). Synergism between phenolic antioxidants in autoxidation. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 54(1), 22-29.

Organization International of Normalization. 2009. ISO 660:2009 Animal and vegetable fats and oils: Determination of acid value and acidity. 3rd Ed. 9 pp.

Orosa M.; Franqueira D.; Cid A.; Abalde J. (2005). Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. 96(3), 373–378. doi:10.1016/j.biortech.2004.04.006

Peredo-Luna, H. A., & Jiménez-Munguía, M. T. (2012). Mecanismos de inestabilidad y métodos de estabilización de emulsiones múltiples. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 120–130.

Pérez-Rosales R, Villanueva-Rodríguez, S., & Y Cosío-Ramírez, R. (2005). EL ACEITE DE AGUACATE Y SUS PROPIEDADES NUTRICIONALES AVOCADO

OIL AND ITS NUTRITIONAL PROPERTIES. www.e-gnosis.udg.mx/vol3/art10www.ciatej.net.mxwww.ciatej.net.mx

Piedrahita, A. M., Peñaloza, J., Cogollo, Á., & Rojano, B. A. (2015). Kinetic study of the oxidative degradation of choibá oil (*Dipteryx oleifera* Benth.) with addition of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food and Nutrition Sciences*, 6(05), 466.

Poyato, C., Navarro-blasco, I., Isabel, M., Yolanda, R., Astiasarán, I., & Ansorena, D. (2013). Oxidative stability of O / W and W / O / W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *FRIN*, 51(1), 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.032>

Prescha, A., Grajzer, M., Dedyk, M., & Grajeta, H. (2014). The antioxidant activity and oxidative stability of cold-pressed oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(8), 1291-1301.

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.

PROCOLOMBIA. (2018). El mercado del aguacate en Estados Unidos 2017. 7–8.

Pu, J., & Sathivel, S. (2011). Kinetics of lipid oxidation and degradation of flaxseed oil containing crawfish (*Procambarus clarkii*) astaxanthin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 595-601

Ramírez, A. E., Ovando, A. C., & Godínez, J. R. (2014). Cambios químicos de los aceites comestibles durante el proceso de fritura. Riesgos en la salud. *Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingeniería*, (3).

Rao, A. R., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2007). Stabilization of astaxanthin in edible oils and its use as an antioxidant. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(6), 957-965.

Redagricola. (2021). México: Producción de aguacate descendería hasta 2,33 millones de toneladas en la temporada 2021/2022. 01/05/2022, de Redagricola Sitio web:

<https://www.redagricola.com/cl/mexico-produccion-de-aguacate-descenderia-hasta-233-millones-de-toneladas-en-la-temporada-2021-2022/>

Rodrigues, J. S., do Valle, C. P., Uchoa, A. F. J., Ramos, D. M., da Ponte, F. A. F., Rios, M. A. de S., ... Pontes Silva Ricardo, N. M. (2020). Comparative study of synthetic and natural antioxidants on the oxidative stability of biodiesel from Tilapia oil. *Renewable Energy*, 156, 1100–1106. doi:10.1016/j.renene.2020.04.153

Rodríguez-Moreno, E. J. (2019). Mercado de aceite de aguacate Hass en México.

Rosales, R. P., Rodríguez, S. V., & Ramírez, R. C. (2005). El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *e-Gnosis*, (3),

Ruen-ngam, D., Shotipruk, A., & Pavasant, P. (2011). Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Separation Science and Technology*, 46(1), 64–70. <https://doi.org/10.1080/01496395.2010.493546>

Ruiz-Domínguez, M. C., Espinosa, C., Paredes, A., Palma, J., Jaime, C., Vílchez, C., & Cerezal, P. (2019). Determining the potential of *Haematococcus pluvialis* oleoresin as a rich source of antioxidants. *Molecules*, 24(22), 4073.

Santana, I., Castelo-Branco, V. N., Guimarães, B. M., de Oliveira Silva, L., Peixoto, V. O. D. S., Cabral, L. M. C., ... & Torres, A. G. (2019). Hass avocado (*Persea americana* Mill.) oil enriched in phenolic compounds and tocopherols by expeller-pressing the unpeeled microwave dried fruit. *Food chemistry*, 286, 354-361.

Santana, I., dos Reis, L. M., Torres, A. G., Cabral, L. M., & Freitas, S. P. (2015). Avocado (*Persea americana* Mill.) oil produced by microwave drying and expeller pressing exhibits low acidity and high oxidative stability. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(7), 999-1007.

Shah, M., Mahfuzur, R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531.

- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Singh, P. K., Chopra, R., & Garg, M. (2023). Comparative study on the use of rosemary bioactive for enhancing the oxidative stability of blended perilla seed oil: A multivariant kinetic approach. *Food Chemistry Advances*, 100447.
- Sjöblom, J., Aske, N., Auflem, I. H., Brandal, Ø., Havre, T. E., Sæther, Ø., ... & Kallevik, H. (2003). Our current understanding of water-in-crude oil emulsions.: Recent characterization techniques and high pressure performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 100, 399-473.
- Skibsted, L. H. (2012). Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2409-2417.
- Skibsted, L. H. (2018). Anthocyanidins regenerating xanthophylls: a quantum mechanical approach to eye health. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 20, pp. 24–29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.02.014>
- Sotomayor-Gerding, D., Oomah, B. D., Acevedo, F., Morales, E., Bustamante, M., Shene, C., & Rubilar, M. (2016). High carotenoid bioaccessibility through linseed oil nanoemulsions with enhanced physical and oxidative stability. *Food Chemistry*, 199, 463–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.004>
- Sugiura, S., Nakajima, M., Ushijima, H., Yamamoto, K., & Seki, M. (2001). Preparation characteristics of monodispersed water-in-oil emulsions using microchannel emulsification. *Journal of chemical engineering of Japan*, 34(6), 757-765.
- Todorović, B., Grujić, V. J., Krajnc, A. U., Kranvogel, R., & Ambrožič-Dolinšek, J. (2021). Identification and content of astaxanthin and its esters from microalgae *Haematococcus pluvialis* by HPLC-DAD and LC-QTOF-MS after extraction with various solvents. *Plants*, 10(11), 2413.
- USDA. (2021). Report Avocado Annual. United States Department of Agriculture.

- Vargas, M., Gutarra, H., Soriano, V. D., Avendaño, P. C., & Peñafiel, C. E. (2020). Ácidos grasos y criterios de calidad del aceite de palta obtenido mediante tres sistemas de extracción libres de solvente. *Agroindustrial Science*, 10(1), 71-77.
- Villanueva, E., Rodríguez, G., Aguirre, E., & Castro, V. (2017). Influencia de antioxidantes en la estabilidad oxidativa del aceite de chia (*Salvia hispanica* L.) por rancimat. *Scientia agropecuaria*, 8(1), 19-27.
- Vladisavljević, G., Brösel, S., & Schubert, H. (2000). Preparation of water-in-oil emulsions using microporous polypropylene hollow fibres: conditions for producing small uniform droplets. *Chem. Papers*, 54(6a), 383-388.
- Wang, L., Yang, B., Yan, B., & Yao, X. (2012). Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 120-127.
- Wang, M., Yu, P., Chittiboyina, A. G., Chen, D., Zhao, J., Avula, B. & Khan, I. A. (2020). Characterization, quantification and quality assessment of avocado (*Persea americana* Mill.) oils. *Molecules*, 25(6), 1453.
- Werman, M. J., & Neeman, I. (1987). Avocado oil production and chemical characteristics. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64(2), 229-232.
- White, A., A. Woolf, P. Hofman, M. Arpia (2009). Manual internacional de la calidad del aguacate. *Plant & food research*, Nueva Zelanda.
- Xi, Y., Zou, Y., Luo, Z., Qi, L., & Lu, X. (2019). pH-Responsive Emulsions with β -Cyclodextrin/Vitamin E Assembled Shells for Controlled Delivery of Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(43), 11931-11941.
- Xu, J., Gao, H., Zhang, L., Chen, C., Yang, W., Deng, Q., ... & Huang, F. (2014). A combination of flaxseed oil and astaxanthin alleviates atherosclerosis risk factors in high fat diet fed rats. *Lipids in Health and Disease*, 13(1), 1-7.
- Yazdani-Nasab, Z., & Piravi-Vanak, Z. (2015). A Study on the Specifications of Cold Pressed Colza Oil. *Recent patents on food, nutrition & agriculture*, 7 1, 47-52 .

- Ye, A., Hemar, Y., & Singh, H. (2004). Influence of polysaccharides on the rate of coalescence in oil-in-water emulsions formed with highly hydrolyzed whey proteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(17), 5491-5498.
- Yeşilsu, A. F., & Özyurt, G. (2019). Oxidative stability of microencapsulated fish oil with rosemary, thyme and laurel extracts: A kinetic assessment. *Journal of Food Engineering*, 240, 171-182.
- Yin, J. I. E., Becker, E. M., Andersen, M. L., & Skibsted, L. H. (2012). Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems. *Food chemistry*, 135(4), 2195-2202.
- Zeb, A., & Murkovic, M. (2011). Carotenoids and triacylglycerols interactions during thermal oxidation of refined olive oil. *Food chemistry*, 127(4), 1584-1593.
- Zembyla, M., Murray, B. S., Radford, S. J., & Sarkar, A. (2019). Water-in-oil Pickering emulsions stabilized by an interfacial complex of water-insoluble polyphenol crystals and protein. *Journal of Colloid and Interface Science*, 548, 88-99.
- Zhang, Y., Li, T., Xu, Z., Liu, R., Zhang, H., Wang, X., ... & Jin, Q. (2020). Comparison of the characteristics and oxidation kinetic parameters of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil products with different refining degree. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44(10), e14753.
- Zhao, X., Zhang, X., Fu, L., Zhu, H., & Zhang, B. (2016). Effect of extraction and drying methods on antioxidant activity of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Food and Bioproducts Processing*, 99, 197-203.
- Zhou, T., Wang, X., Ju, Y., Shi, C., & Kan, G. (2018). Stability application and research of astaxanthin integrated into food. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 394(2). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/394/2/022007>
- Zhou, Y. M., Chang, H. T., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2021). Clove Oil Protects β -Carotene in Oil-in-Water Emulsion against Photodegradation. *Applied Sciences*, 11(6), 2667.

11. ANEXOS

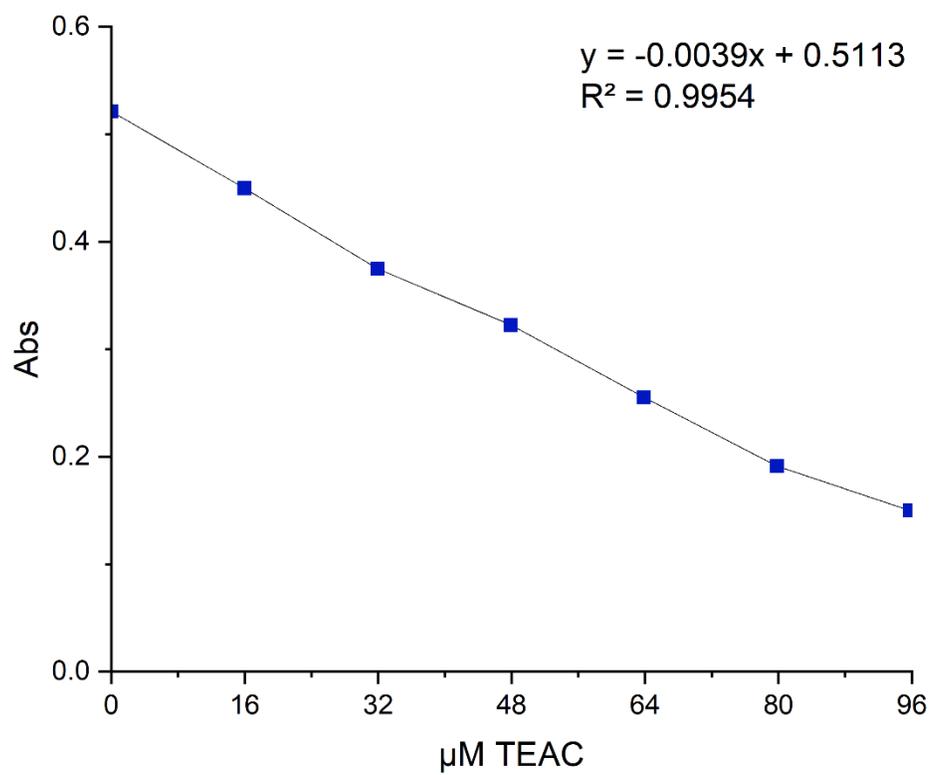


Figura 21. Curva de calibración para el método ABTS.

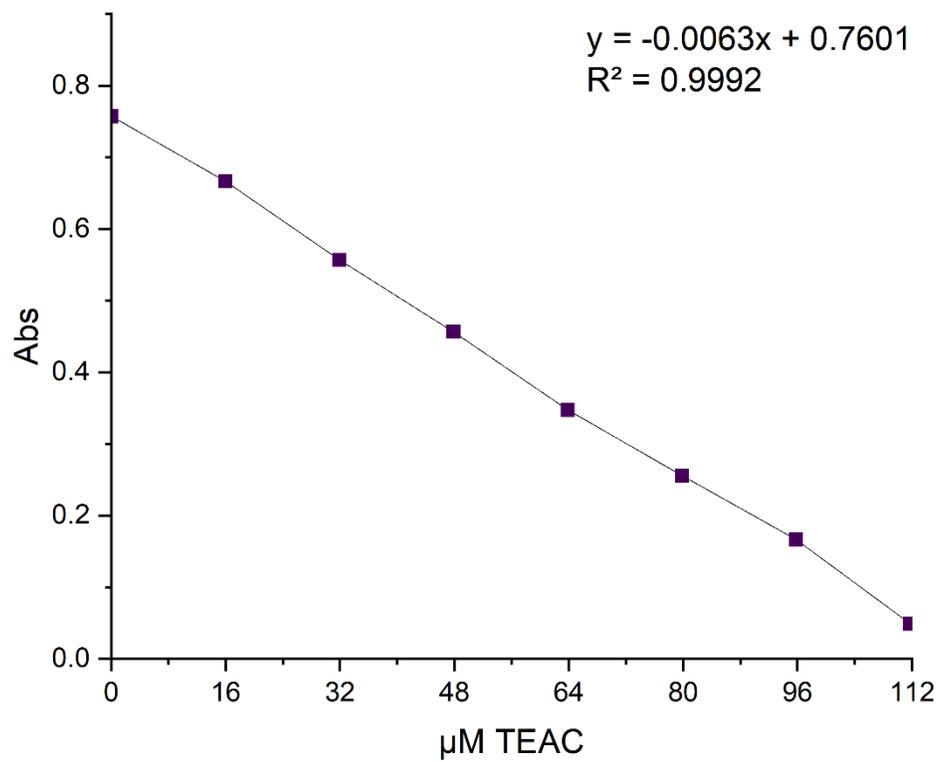


Figura 22. Curva de calibración para el método DPPH.

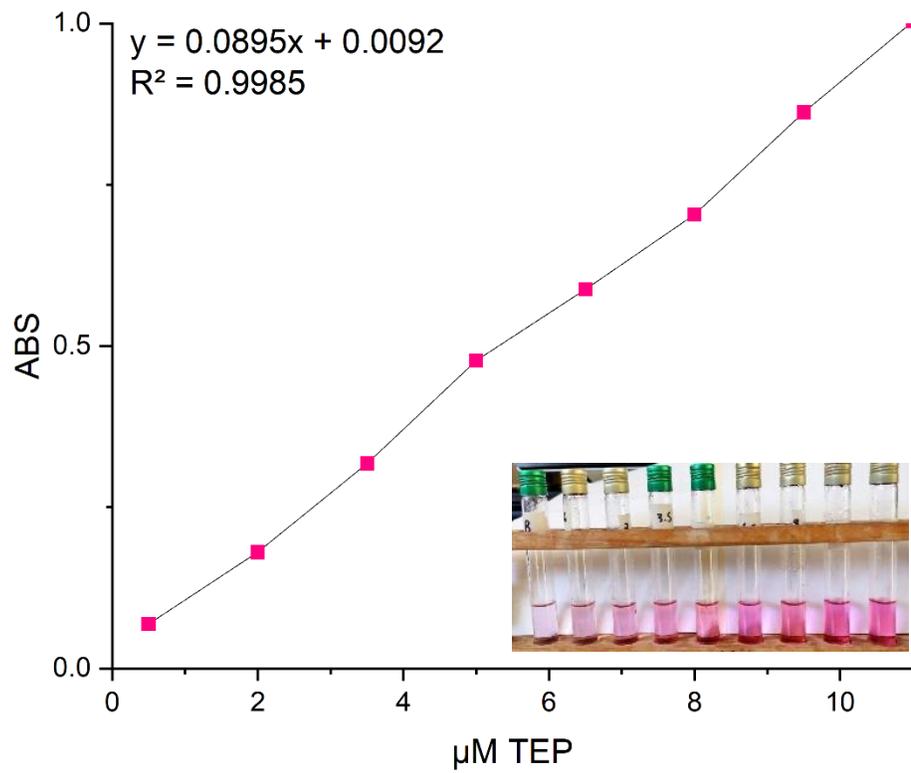


Figura 23. Curva de calibración para el método TBARS expresado como μM eq TEP (Tetraetoxipropano).

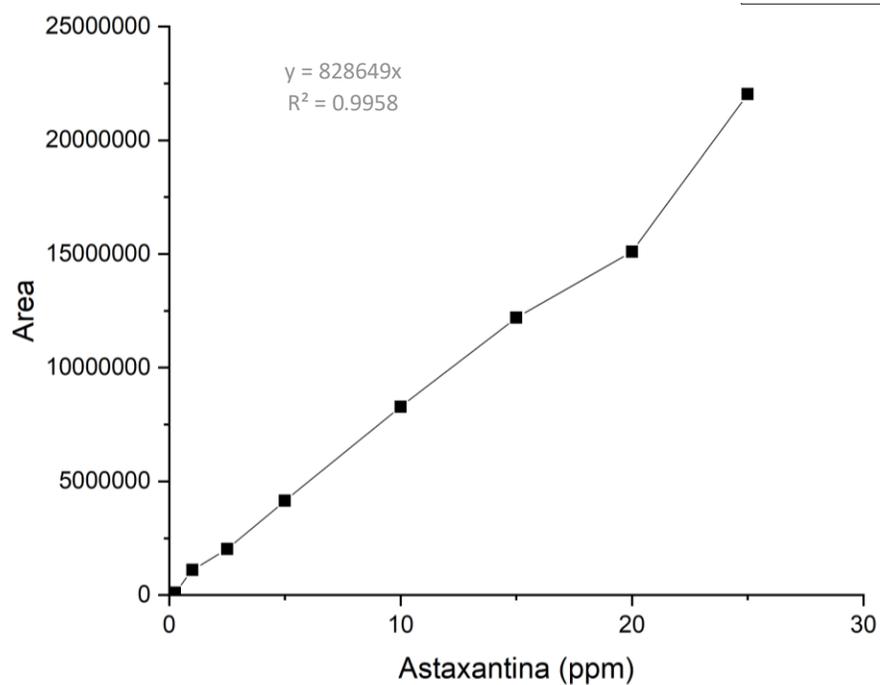


Figura 24. Curva de calibración astaxantina por el método HPLC.