



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **[Reconocimiento-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)**

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra, incluso con fines comerciales, siempre y cuando den crédito y licencia a las nuevas creaciones bajo los mismos términos. Esta licencia suele ser comparada con las licencias copyleft de software libre y de código abierto. Todas las nuevas obras basadas en la suya portarán la misma licencia, así que cualesquiera obras derivadas permitirán también uso comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



## CONSTANCIA

El que subscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título es:

**INFLUENCIA DE LA VARIACION DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CONCENTRACION Y CALIDAD DE LOS CAROTENOIDES DEL AGUAYMANTO PROCESADO**

Presentado por:

**RUMILDA CELESTINA ANDRES ANTONIO**

Autor de la tesis del nivel de **PREGRADO** de la Facultad de **INGENIERÍA QUÍMICA Y PETROQUÍMICA**. El Resultado obtenido es 16% (PORCENTAJE DE SIMILITUD) por lo cual se otorga el calificativo de:

**APROBADO**, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Observaciones:

El porcentaje de similitud es menor del 20%, establecido como máximo por Reglamento de Evaluación de originalidad.

Ica, 26 de julio del 2021

**SANTOS HUMBERTO OLIVERA MACHADO**

**DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y PETROQUÍMICA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**Influencia de la variación de la temperatura sobre la concentración  
y calidad de los carotenoides del aguaymanto procesado**

PRESENTADO POR

Bach.: VALENZUELA GARCÍA, Mariel Ivonne

Bach.: ANDRÉS ANTONIO, Rumilda Celestina

**ICA - PERÚ**

2019

## Índice

Índice.....	ii
Resumen.....	vi
Introducción .....	vii
Capítulo I: Fundamentos de la investigación.....	8
1.1. Definición del problema.....	8
1.2. Formulación del problema .....	8
1.3. Objetivos del proyecto .....	8
1.3.1. Objetivo General.....	8
1.3.2. Objetivos Específicos. ....	8
1.4. Hipótesis de trabajo.....	9
1.5. Variables.....	9
1.6. Justificación.....	9
Capítulo II: Marco Teórico .....	11
2.1. Aguaymanto .....	11
2.2. Carotenoides.....	13
2.2.1. Generalidades.....	13
2.2.2. Propiedades y funciones de los carotenoides.....	15
2.2.3. Factores que degradan los carotenos.....	19
2.3. Efecto del calor sobre los pigmentos.....	29

2.4. Dificultades para cuantificar el $\beta$ -caroteno .....	30
Capítulo III: Parte experimental.....	36
3.1. Recolección de muestras .....	36
3.2. Tratamiento de las muestras para el análisis .....	37
3.3. Determinación de la composición química .....	40
3.4. Extracción del caroteno .....	43
3.5. Análisis del colorante .....	50
Capítulo IV: Resultados .....	53
4.1. Resultados .....	53
4.1.1. Del análisis químico.....	53
4.1.2. De la extracción. ....	53
4.1.3. Purificación y determinación del $\beta$ -caroteno. ....	60
4.1.4. Del rendimiento total comparativo entre las dos muestras.....	62
4.1.5. De los análisis del colorante. ....	62
4.2. Discusión de los resultados .....	64
Conclusiones .....	66
Recomendaciones .....	67
Bibliografía .....	66

## Índice de tablas

Tabla 1. Composición química del aguaymanto .....	13
Tabla 2. Valores obtenidos del aguaymanto fresco (muestra fresca) .....	53
Tabla 3. Influencia del tamaño de la partícula (muestra: aguaymanto fresco) .....	53
Tabla 4. Influencia del tamaño de la partícula (muestra: aguaymanto procesado).....	54
Tabla 5. Influencia del volumen de éter de petróleo (muestra: aguaymanto fresco) .....	55
Tabla 6. Influencia del volumen de éter de petróleo (muestra: aguaymanto procesado).....	55
Tabla 7. Influencia de la temperatura en la maceración (muestra: aguaymanto fresco).....	56
Tabla 8. Influencia de la temperatura en la maceración (muestra: aguaymanto procesado) .....	56
Tabla 9. Influencia del tiempo de maceración (muestra: aguaymanto fresco) .....	57
Tabla 10. Influencia del tiempo de maceración (muestra: aguaymanto procesado).....	58
Tabla 11. Influencia del tiempo de ebullición (muestra: aguaymanto fresco).....	58
Tabla 12. Influencia del tiempo de ebullición (muestra: aguaymanto procesado) .....	59
Tabla 13. Relación sólidos solubles-cantidad de caroteno (muestra: aguaymanto fresco).....	60
Tabla 14. Relación sólidos solubles- cantidad de $\beta$ -caroteno (muestra: aguaymanto procesado) 60	
Tabla 15. Influencia del tiempo y temperatura de calentamiento sobre el índice de degradación 61	
Tabla 16. Rendimiento comparativo en caroteno .....	62
Tabla 17. Resultados de los análisis hechos al colorante.....	62
Tabla 18. Características físicas del caroteno obtenido .....	63

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de los principales carotenoides .....	15
Figura 2. Frutos de aguaymanto con su cubierta .....	36
Figura 3. Fruto de aguaymanto sin la cubierta encapsulante .....	37
Figura 4. Pelado del aguaymanto.....	38
Figura 5. Pesaje de las muestras .....	39
Figura 6. Determinación de proteínas.....	42
Figura 7. Preparación de la muestra para la maceración. ....	45
Figura 8. Extracción del caroteno (Recuperación del solvente) .....	46
Figura 9. Caroteno extraído del aguaymanto.....	52
Figura 10. Reconocimiento del caroteno con ácido.....	52



## Resumen

La presente tesis titulada “Influencia de la variación de la temperatura sobre la concentración y calidad de los carotenoides del aguaymanto procesado”, es un estudio experimental en el que se investiga la variación o degradación del  $\beta$ -caroteno en el aguaymanto procesado en comparación con los frutos frescos. Para comprobar la hipótesis planteada se ha empleado el método analítico de Fuleki y Francis, método espectrofotométrico, que permite determinar la variación del contenido de carotenoides en los productos naturales, midiendo su concentración en ppm. Los resultados experimentales muestran que, en todo alimento procesado, la concentración de carotenos disminuye significativamente debido a múltiples factores, entre los cuales el principal es el calor.

## **Introducción**

Los carotenos, entre ellos el beta caroteno son compuestos insaturados cuyos enlaces libres los hacen compuestos altamente reactivos, químicamente inestables que tienen la desventaja de reaccionar frente a cualquier sustancia o ante la variación del medio, como el aumento de la temperatura, la presencia de oxígeno en el aire, la luz, los ácidos y álcalis, iones de metales pesados, etc. Por lo que su extracción requiere de muchos cuidados, así como su tratamiento en frutas y verduras que los contienen, para evitar su degradación. En esta tesis se estudia el efecto del calor sobre los carotenos que contiene el aguaymanto.

## **Capítulo I: Fundamentos de la investigación**

### **1.1. Definición del problema**

El aguaymanto, (*Physalis peruviana*), que pertenece a la familia de las Solanáceas y al género *physalis*, cuenta con más de ochenta variedades que se encuentran en estado silvestre y que se caracterizan porque sus frutos están encerrados dentro de un cáliz o capacho. El aguaymanto, originario de los Andes sudamericanos, es la especie más conocida de este género y se caracteriza por tener un fruto azucarado y buen contenido de vitaminas A y C, además de hierro y fósforo.

La vitamina A se encuentra en esta especie como provitamina A o sea como beta caroteno, carotenoide muy susceptible a degradación por efectos del calor, por lo cual se hace necesario realizar investigaciones respecto a la variación de este componente al ser sometido a la variación de la temperatura, cuando se procesan jugos, compotas, mermeladas, etc., ya que este es uno de sus componentes de mayor importancia nutricional.

### **1.2. Formulación del problema**

¿En qué medida la variación de la temperatura influye sobre la concentración y calidad de los carotenoides del Aguaymanto procesado?

### **1.3. Objetivos del proyecto**

#### **1.3.1. Objetivo General.**

Determinar la Influencia de la variación de la temperatura sobre la concentración y calidad de los carotenoides del Aguaymanto procesado

#### **1.3.2. Objetivos Específicos.**

- Determinar el contenido de carotenos en la materia prima.
- Determinar el contenido de carotenos en la pulpa procesada.

- Determinar el pH del producto procesado.
- Establecer la temperatura del procesamiento.

#### **1.4. Hipótesis de trabajo**

La variación de la temperatura influye directa y significativamente sobre la concentración y calidad de los carotenoides del Aguaymanto procesado.

#### **1.5. Variables**

##### **Variable Independiente:**

Variación de la temperatura.

##### **Variable Dependiente:**

Concentración y calidad de los carotenoides del aguaymanto procesado.

#### **1.6. Justificación**

La presente investigación se justifica en tanto cuantitativamente se va demostrar que la cantidad de carotenoides que posee el aguaymanto fresco no son los mismos, después del procesamiento de su pulpa en la elaboración del producto procesado a consecuencias de las altas temperaturas y de las reacciones químicas adicionales, las cuales afectan su molécula y transforman los carotenoides en otras sustancias diferentes, que no poseen las mismas propiedades nutricionales.

Desde este punto de vista, el presente estudio, permitirá establecer las temperaturas adecuadas para un procesamiento adecuado del fruto de aguaymanto, si deteriorar sus componentes y sobre todo evitando un deterioro excesivo de los carotenos, que es uno de sus principales componentes, con valores nutricionales ya que aporta la provitamina A (el beta caroteno), que en el organismo humano se transforma en dos moléculas de vitamina A, así

mismo, empleando la temperatura adecuada no se deteriora el betacaroteno y sus propiedades de antioxidante natural se mantiene invariable.

Estableciendo las condiciones óptimas de procesamiento se puede masificar la producción de aguaymanto procesado, lo que permitiría generar ganancias a las empresas involucradas.

## Capítulo II

### Marco Teórico

#### 2.1. Aguaymanto

El género *Physalis* es uno de los géneros más grandes de las *Solanaceae* y comprende 75—90 especies; las especies se distribuyen en el Nuevo Mundo, con una excepción (*P. alkekengi* L.) y su centro de diversidad se encuentra en México, especies cultivadas y las que se comportan como malezas han sido introducidas en zonas cálidas de todo el mundo; la característica más importante del género es el cáliz, el que se desarrolla durante la fructificación, se elonga rodeando la baya completamente, y cuelga hacia abajo como una lámpara (Lock Sing, 2016).

Por ello, esta peculiaridad convierte a la *Physalis* en uno de los géneros que más fácilmente se reconoce en familia *Solanaceae*. Típicamente, las especies de *Physalis* son anuales o perennes de vida corta, con flores solitarias axilares y corola amarilla, la corola es normalmente indivisa, campanulada y, frecuentemente, presenta puntos oscuros en la base, es una hierba perenne, 45-90(-300) cm de alto, con un tallo erecto poco ramificado, cilíndrico y densamente pubescente (Lock Sing, 2016).

La raíz principal alcanza una profundidad de 50-80 cm. la mayoría de las raíces son fibrosas y se desarrollan a una profundidad de 10-15 cm, a grandes elevaciones el sistema radicular es superficial, el pecíolo es 2-6 cm de largo, la lámina foliar es anchamente obovada a obovada, 6-13,5 cm largo y 3,5-10 cm ancho; las hojas son alternas, densamente pubescentes, con base subcordadas, enteras o con pocos dientes inconspicuos, y cortamente apiculadas; el pedúnculo floral es de 10-13 mm de largo; el cáliz es anchamente campanulado, en floración 15-

18 mm de largo y pubescente en la cara exterior, en fructificación es acrescente, de color verde a beige, ovoide, con 5-10 nervios sobresalientes y algo rojizos, 8-10 mm de largo y 3 mm de ancho, laxamente pubescente en la cara exterior (Lock Sing, 2016).

La disposición de las flores es vertical y algo inclinadas o erectas y se observa que la corola es de color amarillo, tiene máculas púrpuras en un número de cinco, en el tubo de la corola (garganta), que tiene unas dimensiones de 1.2-2 cm de ancho y 1-1.8 cm de largo, y debajo de las máculas tiene un anillo denso de tricomas. Las anteras y filamentos son de color azul púrpura y además la dimensión de las anteras es de 2.5-3 mm de largo. El ovario tiene un color verde y presenta un anillo (disco) en la base, el estilo es púrpura con un estigma más bien claviforme.

Las bayas maduras son de color amarillo a anaranjado, 1-2 cm de largo y entre 1-1,5 cm de ancho (o diámetro) y tienen un peso entre 4-10 g; los frutos tienen de 100-200(-300) semillas de color amarillo, de 1,25-2,5 mm de diámetro. La filogenia y la taxonomía del grupo son problemáticas y no están completamente resueltas; tanto la delimitación entre especies como la del género son aún materia de discusión, la identificación de especies es hasta cierto punto compleja, ya que los caracteres diagnósticos son difíciles de reconocer en material de herbario, lo que hace necesario el conocimiento de las especies en estado viviente; los estudios actuales asumen que el género es parafilético (Lock Sing, 2016).

**Tabla 1**

*Composición química del aguaymanto (Lock Sing, 2016).*

<b>Valor nutricional por cada 100 g</b>	
<b>Energía 26 kcal 110 Kj</b>	
Carbohidratos	11.20 g
Grasas	0.70 g
Proteínas	1.90 g
Agua	85.40 g
Retinol (vit. A)	36 µg (4%)
Tiamina (vit. B <sub>1</sub> )	0.110 mg (8%)
Riboflavina (vit. B <sub>2</sub> )	0.040 mg (3%)
Niacina (vit. B <sub>3</sub> )	2.800 mg (19%)
Vitamina C	11.0 mg (18%)
Calcio	9 mg (1%)
Hierro	1.00 mg (8%)
Fósforo	40 g (6%)

(Lock Sing, 2016)

## 2.2. Carotenoides

### 2.2.1. Generalidades.

Los carotenoides han atraído por más de un siglo el interés de investigadores de diferentes áreas del conocimiento incluyendo la química, bioquímica, biología, ciencia y tecnología de los alimentos, medicina, farmacia y nutrición, estos fascinantes compuestos continúan siendo investigados profusamente; los carotenoides son pigmentos naturales ampliamente distribuidos, responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas, raíces, flores, pescados, invertebrados y pájaros (Amós, 1969).

Los carotenoides ocurren invariablemente en los cloroplastos de las plantas superiores, aunque en este tejido fotosintético su color está enmascarado por el de la clorofila; también se encuentran en las algas, bacterias, hongos y levaduras; se estima que la naturaleza produce aproximadamente 100 millones de toneladas de carotenoides al año (Amós, 1969).



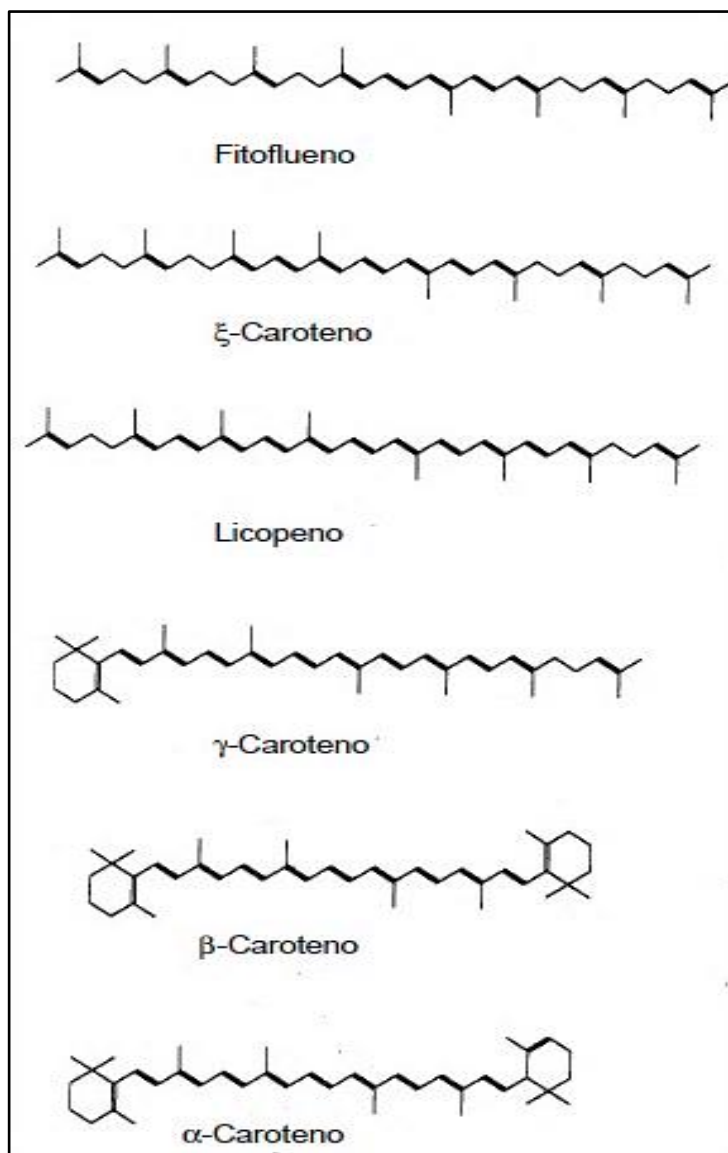
La conformación esencial de los carotenoides es la forma de un tetraterpeno de 40 carbonos simétricos y lineales, forjado partiendo de 8 unidades isoprenoides de 5 carbonos, unidos de tal manera que se invierte el orden al centro. Este esqueleto básico puede modificarse de varias maneras como por ejemplo por hidrogenación, dehidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras; se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides que ocurren naturalmente, el número de carotenoides hasta ahora encontrados en los alimentos es mucho menor; sin embargo, la composición de los carotenoides de un alimento dado puede ser bastante compleja (Amós, 1969).

Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos (Tabla 1); aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (Tabla 2). Las funciones oxigenadas más comunes son los grupos hidroxilo (OH) y epoxi (epóxidos 5,6- o 5,8-); también se encuentran los grupos aldehído (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO<sub>2</sub>H), carbometoxi (CO<sub>2</sub>Me) y metoxi (OMe).

Los carotenoides, ya sea carotenos o xantofilas, pueden ser acíclicos (ej. fitoflueno,  $\xi$ -caroteno, licopeno), monocíclicos o bicíclicos; la ciclación ocurre en uno o ambos extremos de la molécula, formando uno o dos anillos  $\beta$  de seis miembros (a veces denominados  $\beta$ -ionona) o anillos  $\epsilon$  (algunas veces denominados  $\alpha$ -ionona); así, el monocíclico  $\gamma$ -caroteno tiene un anillo  $\beta$  mientras los bicíclicos  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina y astaxantina tienen dos de estos anillos; los bicíclicos  $\alpha$ -caroteno y luteína tienen cada uno un anillo  $\beta$  y un anillo  $\epsilon$  (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

**Figura 1**

*Estructura de los principales carotenoides (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989)*

**2.2.2. Propiedades y funciones de los carotenoides.**

El distintivo o atributo estructural de los carotenoides es que son gran sistema de enlaces dobles conjugados, que consiste en turnar enlaces simples y dobles carbono-carbón. Por lo general se denomina cadena poliénica; esta parte de la molécula conocida como el cromóforo, es

responsable de la capacidad de los carotenoides de absorber luz en la región visible y en consecuencia su gran capacidad de coloración; se requieren al menos siete enlaces dobles conjugados para que un carotenoide produzca color como en el  $\zeta$ -caroteno, el cual es amarillo suave; el fitoflueno con cinco de tales enlaces es incoloro (Amós, 1969).

Se acentúa el color a medida que el sistema conjugado se extiende, de esta manera el color del licopeno es rojo. La ciclación causa algún impedimento, por tanto, el  $\beta$ -caroteno y el  $\gamma$ -caroteno son de color naranja y rojo-naranja respectivamente, aunque tienen el mismo número de enlaces dobles conjugados que el licopeno (once); la intensidad y matiz de los colores en los alimentos dependen de cuales carotenoides están presentes, sus concentraciones y estado físico (Braverman & Zeki, 1980).

Los carotenoides son sustancias hidrofóbicas, lipofílicas y son virtualmente insolubles en agua, se disuelven en solventes grasos como acetona, alcohol, éter etílico, tetrahidrofurano y cloroformo; los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano, las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol; en plantas y animales, los carotenoides ocurren como cristales o sólidos amorfos, en solución en medios lipídicos, en dispersión coloidal o en combinación con proteínas en fase acuosa; aparte de permitir el acceso a los medios acuosos, la asociación de los carotenoides con las proteínas estabiliza el pigmento y cambia su color; por ejemplo, en invertebrados tales como camarón, cangrejo y langosta, el carotenoide astaxantina aparece como complejos carotenoproteicos azules, verdes o púrpuras; en la cocción, la denaturalización de la proteína libera la astaxantina y aparece el color rojo (Amós, 1969).

El valor de los carotenoides en la industria alimentaria está por encima del papel que juega como pigmento natural. En forma creciente se han atribuido a estos compuestos funciones y acciones biológicas, de hecho, por mucho tiempo se ha sabido de la actividad de provitamina A

de los carotenoides; la dieta proporciona la vitamina A en forma de vitamina A preformada (retinil ester, retinol, retinal, 3-dehidroretinol y ácido retinoico) a partir de alimentos de origen animal como por ejemplo hígado, leche y productos lácteos, pescado y carne, o como carotenoides que se pueden transformar biológicamente a vitamina A (provitaminas A) generalmente a partir de alimentos de origen vegetal; sobre una base mundial, se estima que aproximadamente el 60% de la vitamina A dietaria proviene de las provitaminas A; debido al costo generalmente prohibitivo de los alimentos animales, la contribución dietaria de la provitamina A aumenta a un 82% en los países en desarrollo; también, la provitamina A tiene la ventaja de convertirse a vitamina A solo cuando el cuerpo lo requiere; evitando así, la toxicidad potencial de una sobredosis de vitamina A (Rodríguez-Amaya, 1996).

Por otra parte, muchos factores influyen en la absorción y utilización de provitamina A como por ejemplo la cantidad, tipo y forma física de los carotenoides en la dieta; la ingesta de grasa, vitamina E y fibra; el estado nutricional en relación a las proteínas y zinc; la existencia de ciertas enfermedades e infecciones por parásitos; así, la biodisponibilidad de carotenoides es variable y difícil de evaluar (Amós, 1969).

Aproximadamente 50, de los más de 600 carotenoides que se conocen, pueden ser precursores de la vitamina A afirmación basada en estimaciones estructurales. Según Amós “Se ha podido estimar las biopotencias relativas de sólo unas pocas de estas provitaminas mediante ensayos en ratas. La provitamina A más importante es el  $\beta$ -caroteno tanto en términos de bioactividad como de amplia ocurrencia” (Amós, 1969).

Posiblemente casi todas las muestras de alimentos carotenogénicos analizados hasta hoy en día tienen el  $\beta$ -caroteno como principal componente o menos. La vitamina A, estructuralmente, primordialmente es la mitad de la molécula de  $\beta$ -caroteno y una molécula de

agua al final de la cadena lateral, de esta manera, el  $\beta$ -caroteno es una provitamina A potente, a la que se le atribuye el 100% de la actividad. Un anillo  $\beta$  no sustituido con una cadena poliénica de 11 carbonos es el requerimiento mínimo para la actividad de la vitamina A, por lo tanto, no son provitaminas A el fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno y licopeno, los cuales carecen de anillos  $\beta$ ; y zeaxantina, luteína, violaxantina y astaxantina en los cuales ambos anillos  $\beta$  tienen sustituyentes hidroxilo, epoxi o ceto; sin embargo, el  $\gamma$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y  $\alpha$ -criptoxantina, los cuales tienen un anillo  $\beta$  no sustituido, tienen actividad de vitamina A y poseen aproximadamente la mitad de la bioactividad del  $\beta$ -caroteno (Rodríguez-Amaya, 1996).

No obstante, su menor biopotencia en comparación con el  $\beta$ -caroteno, la  $\beta$ -criptoxantina también merece atención dado que es el principal carotenoide de muchas frutas como duraznos, nectarines, papayas con pulpa naranja, caqui, mombin, y la fruta del árbol del tomate; algunas frutas y vegetales tienen cantidades importantes de  $\alpha$ -caroteno como por ejemplo la zanahoria, algunas variedades de calabaza y zapallo, palma roja y el dátil buriti de la palma brasileña (*Mauritia vinifera*); el buriti y las frutas brasileñas palma de durazno (*Bactris gasipaes*), piqui (*Cariocar villosium*) y pitanga (*Eugenia uniflora*) contienen altas cantidades de  $\gamma$ -caroteno. La provitamina  $\alpha$ -criptoxantina se encuentra ampliamente distribuida en frutas y verduras brasileñas, pero sólo en niveles bajos (Rodríguez-Amaya, 1996).

Los carotenoides también se han relacionado con un aumento del sistema inmune y una disminución del riesgo de enfermedades degenerativas tales como cáncer, enfermedad cardiovascular, degeneración macular relacionada a la edad y formación de cataratas; estos efectos biológicos son independientes de la actividad de provitamina A y se han atribuido a una propiedad antioxidante de los carotenoides a través de la desactivación de los radicales libres (átomos o grupos de átomos que poseen un electrón no compartido) y la captura del oxígeno

singlete (Rodriguez-Amaya, 1996). La capacidad de los carotenoides para capturar el oxígeno singlete se relaciona con el sistema de enlace doble conjugado y los que tienen nueve o más enlaces dobles otorgan la máxima protección (Foote et al., 1970). Se observó que el licopeno acíclico era más efectivo que el  $\beta$ -caroteno bicíclico (Di Mascio et al., 1989). Los resultados obtenidos con un sistema iniciado de radicales libres también sugirieron que la cantaxantina y astaxantina, ambas con grupos ceto conjugados eran mejores antioxidantes que el  $\beta$ -caroteno y zeaxantina (Terao, 1989).

Debido a que la deficiencia de vitamina A sigue siendo un problema serio de salud pública en los países en desarrollo, las fuentes dietarias y adecuación de las provitaminas A continúan siendo la principal preocupación; por otra parte, el enfoque en el mundo desarrollado ha girado a los otros efectos de promoción de la salud de los carotenoides (Braverman & Zeki, 1980).

### **2.2.3. Factores que degradan los carotenos.**

#### ***2.2.3.1. Efecto de la oxidación***

La degradación de los carotenoides se debe fundamentalmente a reacciones de oxidación, ya sean no enzimáticas o debidas a enzimas como las lipoxigenasas, y se presenta generalmente durante el secado de frutas y vegetales; los primeros datos que existen sobre oxidación de carotenoides son los de Cole y Kapur, quienes conjugan las variables oxígeno y temperatura en la degradación del licopeno; la interacción de los carotenoides con algunos constituyentes de los alimentos ejerce un efecto protector contra dichas reacciones, de tal forma que se oxidan más rápidamente cuando se extraen del fruto o se purifican; es decir, la intensidad de la oxidación de los carotenoides depende de si el pigmento se encuentra *in vivo* o *in vitro* y de las condiciones ambientales, por ejemplo, el licopeno, pigmento responsable de la coloración de los tomates, es

muy estable en ese fruto, pero extraído y purificado es muy lábil (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

La oxidación de los carotenoides, como ocurre con los lípidos, aumenta en función de la temperatura, también por la presencia de luz, metales y enzimas y es reducida cuando se adicionan antioxidantes. Los alimentos con contenido de antioxidantes, tales como la vitamina C o los tocoferoles, preservan mejor a los carotenoides y, por lo tanto, preservan su color.

En los alimentos procesados, el mecanismo de oxidación es complejo y depende de muchos factores; los pigmentos pueden autooxidarse por reacción con oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, el calor y la presencia de pro- y antioxidantes, como ya se ha comentado; el mecanismo de oxidación de los carotenoides, a diferencia del de los lípidos, no está totalmente claro; al parecer estos procesos oxidativos implican reacciones de apoxidación, formación de apocarotenoides (carotenoides de menos de 40 átomos de carbono) e hidroxilación, obteniéndose finalmente compuestos de bajo peso molecular similares a los que aparecen como consecuencia de la oxidación de ácidos grasos; debido a estos procesos, los carotenoides, tras perder su color y sus propiedades beneficiosas para la salud, dan lugar a compuestos aromáticos que en algunos casos son agradables (té, vino) y en otros no (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Se ha mostrado hasta este punto la acción del gas oxígeno, no obstante, el ozono ( $O_3$ ) también causa efectos en la estabilidad del carotenoide. En un interesante ensayo se comprobó el efecto que una corriente continua de agua saturada de oxígeno y ozono a 30 °C ejercía sobre una serie de carotenoides (todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y licopeno) adsorbidos en fase sólida ( $C_{18}$ ); se comprobó que aproximadamente el 90% de todo-*trans*- $\beta$ -caroteno, 9-*cis*- $\beta$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina se perdía después de 7 horas de exposición al ozono, una pérdida de licopeno cuantitativamente similar se producía en sólo 1 hora; cuando los

citados carotenoides fueron sometidos a la acción del oxígeno, todos, a excepción de la  $\beta$ -criptoxantina, se degradaban a menor velocidad; en este estudio la mayor velocidad de degradación corresponde al licopeno, y la menor al 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (licopeno >  $\beta$ -criptoxantina > todo-*trans*- $\beta$ -caroteno > 9-*cis*- $\beta$ -caroteno) (Braverman & Zeki, 1980).

En los últimos años se han realizado una serie de estudios que confirman que la encapsulación de carotenoides los hace más manejables y estables frente a la oxidación; los carotenoides pueden actuar como pro- o antioxidantes dependiendo del potencial redox de la molécula y del entorno, entre otros factores, la propia inestabilidad de los carotenoides en procesos oxidativos se corresponde con una alta protección para otros compuestos frente a agentes oxidantes; los carotenoides que contienen 9 o más dobles enlaces conjugados pueden inactivar ciertas formas reactivas de oxígeno, como el oxígeno excitado (predispuesto a la reacción); en este sentido, el  $\beta$ -caroteno posee como característica importante, que lo diferencia del resto de antioxidantes solubles en grasas (como la vitamina E), la de ser más efectivo a bajas presiones de oxígeno (Braverman & Zeki, 1980).

### ***2.2.3.2. Efecto de la composición lipídica***

En presencia de lípidos, los carotenoides sufren una oxidación unida a velocidades dependientes del sistema. Ha sido objeto de varios estudios, el efecto de la composición lipídica, en productos derivados del pimiento rojo, sobre todo, donde se pudo demostrar que cambiar el perfil lipídico de un medio poliinsaturado a otro monoinsaturado mejora la estabilidad de los carotenoides. El análisis de la velocidad y rapidez de la degradación de los carotenoides esterificados y no esterificados del pimiento rojo mostró que el que el compuesto que se degrada a menor velocidad es la capsorrubina, seguido de la zeaxantina, la capsantina y el  $\beta$ -caroteno.



Asimismo, se comprobó que capsantina y capsorrubina y sus ésteres se degradaban a la misma velocidad, mientras que los ésteres de zeaxantina se degradaban más rápido que el pigmento libre, presumiblemente debido a que dicho pigmento está esterificado principalmente por el ácido graso poliinsaturado linolénico (Rodríguez-Amaya, 1996).

### ***2.2.3.3. Efecto de la estructura***

En los distintos carotenoides hay una diferencia de estabilidad y está afectada a causa de su estructura individual. La reactividad de estos pigmentos en reacciones de captación ("*scavenging*") de radicales, en general, disminuye al disminuir el número de dobles enlaces coplanares y debido a la presencia de grupos hidroxilos y carbonilos; la reactividad, por tanto, disminuye de los carotenos a los hidroxicarotenoides y de estos a los cetocarotenoides, el licopeno es el mejor captador de radicales libre, debido a sus 11 dobles enlaces conjugados; en el caso del  $\beta$ -caroteno, dos de sus dobles enlaces conjugados no son coplanares con la cadena poliénica, de ahí que presente una menor reactividad que el licopeno; la diferencia existente entre la  $\beta$ -criptoxantina y el  $\beta$ -caroteno es la presencia de un grupo hidroxilo en el C<sub>3</sub> de aquella, cambio que no implica una importante variación de reactividad con respecto al  $\beta$ -caroteno (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Se ha comprobado, en cambio, que cuando cada anillo de  $\beta$ -ionona contiene un grupo hidroxilo (como ocurre en la zeaxantina), dicha variación sí es patente; en otro estudio también se comprobó, teniendo en cuenta tres sistemas oxidantes distintos, que el licopeno era más reactivo que el  $\beta$ -caroteno, siéndolo los dicetocarotenoides astaxantina y cantaxantina mucho menos, atribuyendo la escasa reactividad de los cetocarotenoides, a pesar de la presencia de dobles enlaces conjugados adicionales debidos a los grupos ceto, a la existencia de sustituyentes en las posiciones C-4 y C-4' (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Los carotenoides tienen una configuración geométrica que involucra diferencias, en lo que concierne a estabilidad. En un sistema modelo acuoso el todo-*trans*- $\beta$ -caroteno es ligeramente más sensible al ozono que el 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, sin embargo, en presencia de oxígeno, éste último isómero es bastante menos sensible a la oxidación; por otro lado, la estabilidad de los dos isómeros anteriormente citados no difería significativamente en un medio lipídico en caliente; en contraste, en otro trabajo llevado a cabo en una microalga se observó que el 9-*cis*-  $\beta$ -caroteno se degradaba con mayor rapidez que el todo-*trans*-  $\beta$ -caroteno en presencia de agentes oxidantes (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Parece ser que sistemas con 9-*cis*-  $\beta$ -caroteno presentan una menor acumulación de hidroperóxidos y que el isómero 9-*cis* posee una mayor potencia antioxidante que el todo-*trans*- $\beta$ -caroteno; se ha sugerido que la mayor reactividad de la molécula *cis* en relación con los radicales libres es debida a una mayor interferencia estérica entre las dos partes al otro lado del doble enlace *cis*, aunque en la actualidad, no existe una explicación aparente de estas discrepancias (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

#### ***2.2.3.4. Efecto de la temperatura***

La influencia de la temperatura en la estabilidad de los pigmentos es clara; tanto para reacciones anhidras como hidratadas, siempre actúa como acelerador de la reacción de degradación; por lo general, los carotenos con mayor actividad biológica son aquellos que tienen todos sus dobles enlaces en forma del isómero *trans*, que se transforman parcialmente en la forma *cis* durante tratamientos térmicos en ausencia de oxígeno; esta reacción de isomerización se puede efectuar durante el proceso de esterilización de productos enlatados, con lo que se pierde parte del poder vitamínico de los carotenos; estudios recientes revelan que la degradación del  $\beta$ -caroteno y licopeno debida a diferentes condiciones de calentamiento sigue una cinética de

primer orden (Rodríguez-Amaya, 1996). En uno de estos estudios se evaluó el efecto del calentamiento de una disolución de  $\beta$ -caroteno-*todo-trans* en horno (50 °C, 100 °C, 125 °C y 150 °C) y a reflujo (70 °C), comprobándose que, en el caso del tratamiento térmico en horno, los isómeros formados mayoritarios fueron 13-*cis*-  $\beta$ -caroteno y 13,15-di-*cis*-  $\beta$ -caroteno, mientras que, como consecuencia del calentamiento a reflujo, se favorecía la formación de 13-*cis*-  $\beta$ -caroteno (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989). Asimismo, se ha comprobado que el calentamiento del  $\beta$ -caroteno a temperaturas diferentes (de 60 y 120 °C) en sistemas de lípidos con otro grado de insaturación, lleva al surgimiento de 4 isómeros *cis* (9-*cis*-, 13-*cis*-, 15-*cis*- y 13,15-di-*cis*-  $\beta$ -caroteno); con respecto al  $\beta$ -caroteno, su degradación parece ser resultado de la acción del calor o la luz, se conduce también por una cinética de primer orden. El calentamiento del *todo-trans*- $\beta$ -caroteno a 50°C o 100°C durante media hora no produce grandes pérdidas, si bien cuando la temperatura es de 150°C las pérdidas si son notorias, habiéndose comprobado que los fenómenos de termoisomerización y fotoisomerización son más acusados en el  $\beta$ -caroteno que en el  $\beta$ -caroteno; con respecto al licopeno, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que como consecuencia del calentamiento de disoluciones modelo de este pigmento a 50°C, 100°C y 150°C se forman hasta seis isómeros distintos; dos di-*cis*-isómeros, 5-*cis*, 9- *cis*, 13- *cis* y 15- *cis*-licopeno (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Por la importancia nutricional que tienen como origen de carotenos, varios de las investigaciones sobre la estabilidad de estos compuestos se han llevado a cabo en zanahorias y productos similares. En algunos de estos estudios se ha evaluado el impacto del escaldado, empleado para inactivar la lipoxigenasa, en el contenido de los carotenoides; la influencia de este tratamiento en los niveles de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en la pulpa y en el zumo de zanahorias ha sido objeto de estudio por parte de Bao y Chang (Rodríguez-Amaya, 1996).

Se realiza un escaldado previamente a obtener la pulpa o el zumo, en una solución de ácido acético y en agua hirviendo durante 5 minutos, se produce la retención de estos compuestos en el orden del 35,4% y el 31,7% en la pulpa respectivamente. Con respecto al contenido de estos pigmentos en las zanahorias frescas, mientras que en la pulpa no escaldada, la retención fue sólo del 18%; en cuanto a los zumos, tanto escaldados como frescos, una vez obtenidos se calentaron a 82°C antes de ser transferidos a latas de metal, siendo sometidos a continuación a distintos tratamientos: esterilización a 115,6°C durante 25 minutos, esterilización a 121,1°C durante 10 minutos, concentración en rotavapor a 40-50°C y liofilización (Rodríguez-Amaya, 1996). Se comprobó que, dentro de cada grupo de zumos, el escaldado reducía la retención de carotenos, exceptuando el zumo fresco, los zumos no escaldados tratados a 115,6 °C y los zumos no escaldados concentrados, fueron los que retuvieron un mayor porcentaje de los carotenos estudiados, es decir 51,3% y 51,2% respectivamente (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

El efecto en el escaldado de zanahorias, también ha sido estudiado en la variedad Kintoki para los niveles de licopeno, que en esta variedad es el carotenoide de mayor presencia, y  $\beta$ -caroteno; el escaldado en agua a diferentes temperaturas de 50°C, 70°C y 90 °C, durante 15 minutos mantiene los niveles de licopeno bastante estables independientemente de las temperaturas ensayadas, si bien el contenido de  $\beta$ -caroteno disminuye ligeramente como consecuencia del escaldado a 90 °C (Rodríguez-Amaya, 1996).

Howard *et al.* estudiaron el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de esterilización 118,3°C durante 34,2 min, 121,1°C durante 29,2 min y 123,9 °C durante 27°C; en el contenido total de carotenoides de zanahorias, comprobando que no difería mucho en función de los distintos métodos de esterilización ensayados; el efecto de diferentes formas de cocinar

zanahorias en los niveles de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno ha sido evaluado recientemente, comprobándose que, a menor tiempo y temperatura de cocinado y contacto con agua, mayor es la retención de carotenoides; de entre las distintas formas de cocinado evaluadas como son al vapor, cocidas a presión, trituradas, etc, la cocción de las zanahorias en agua y sin presión resultó ser la que producía una mayor retención de los carotenoides estudiados; por su parte, Sulaeman estudió los cambios en el contenido de carotenoides en zanahorias escaldadas y posteriormente fritas en diferentes aceites de canola, palma y soja parcialmente hidrogenada, y a diferentes temperaturas de 165°C, 175°C y 185°C, comprobándose que, los niveles de carotenoides diferían significativamente en función de la temperatura, pero no en función del aceite empleado para una misma temperatura (Rodríguez-Amaya, 1996).

La temperatura, que tiene efecto sobre los contenidos de carotenoides en otros alimentos es siendo materia de estudio actualmente. Abushita *et al.* estudiaron el efecto de las altas temperaturas a las que es sometido el tomate durante su procesado industrial en el contenido de estos pigmentos, llegando a la conclusión de que la distribución cualitativa de carotenoides en el tomate no procesado y en el producto final, pasta de tomate, era idéntica; el contenido total de todo-*trans*-licopeno en la pasta aumentó considerablemente con respecto a fruto fresco debido, probablemente, a la eliminación de la piel y las semillas y a la evaporación de agua, si bien el contenido de todo-*trans*-  $\beta$ -caroteno en la pasta descendió considerablemente y aumentó el nivel del isómero *cis*, porque el tratamiento térmico favorece los procesos de isomerización, en el caso del licopeno, los niveles del isómero *cis*- apenas variaron como consecuencia del procesado (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

En cuanto al efecto de la pasteurización, 90 °C en 30 s, en zumos de naranja de la variedad Valencia, se ha comprobado que la variación en el contenido total de carotenoides es

significativa; los cambios cualitativos en el perfil de carotenoides fueron notorios, de forma que los niveles de los carotenoides 5,6-epóxido *cis*-violaxantina y anteraxantina, pigmentos mayoritarios en el zumo fresco, descendieron como consecuencia del tratamiento térmico, siendo los carotenoides más importantes en términos cuantitativos en el zumo procesado luteína y zeaxantina; en los carotenoides provitamínicos,  $\beta$ -criptoxantina y  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, no se observaron pérdidas significativas (Rodríguez-Amaya, 1996).

#### ***2.2.3.5. Efecto de la luz***

La fuerte acción de la luz solar sobre los carotenos produce la ruptura y consecuentemente se forman compuestos incoloros que tienen poco peso molecular. Estas reacciones tienen mucha importancia en la industria alimentaria ya que los carotenos pierden, además de su función biológica de provitamina A, su color característico; existen investigaciones en las que se estudia la relación existente entre la pérdida de pigmentos, la exposición a la luz y la presencia de ácidos grasos, encontrándose que la insaturación de los ácidos grasos protege en estas condiciones a los pigmentos; también hay estudios que demuestran que la degradación del  $\beta$ -caroteno debida a la iluminación con luz fluorescente sigue un modelo de primer orden, favoreciendo dicha iluminación la formación de 13,15-di-*cis*-  $\beta$ -caroteno (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

En cuanto al  $\beta$ -caroteno, como ya se ha comentado con anterioridad, la reacción también sigue una cinética de primer orden, siendo la fotoisomerización mayor que en el caso del  $\beta$ -caroteno; el principal isómero que aparece como consecuencia de la iluminación con luz fluorescente es el 13-*cis*-  $\beta$ -caroteno; en cuanto al licopeno, se ha puesto de manifiesto que la iluminación de disoluciones modelo con luz fluorescente provoca la formación de 5 isómeros diferentes: di-*cis*, 5-*cis*, 9- *cis*, 13- *cis* y 15- *cis*-licopeno (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

### ***2.2.3.6. Efecto del pH***

Aunque los carotenoides extraídos o no son relativamente resistente a valores de pH extremos, los ácidos y álcalis pueden provocar isomerizaciones *cis/trans* de ciertos dobles enlaces, reagrupamientos y desesterificaciones, lo cual debe ser tenido en cuenta a la hora de manipularlos en laboratorio con fines analíticos; así, por ejemplo, algunas xantofilas como fucoxantina y astaxantina, son excepcionalmente lábiles al medio alcalino, de ahí que a la hora de analizar fuentes naturales de estos carotenoides se recomiende no saponificar el extracto de pigmentos; no obstante, volviendo a la estabilidad de los carotenoides en los alimentos, hay que tener en cuenta que los epoxycarotenoides son muy inestables en medio ácido, lo cual tiene una gran importancia debido a la acidez inherente de algunos alimentos en particular (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

Este hecho es conocido tanto en la elaboración de zumos como en vegetales fermentados, donde las condiciones ácidas del proceso promueven algunas conversiones espontáneas de los grupos 5,6 y 5',6'-epóxidos a 5,8 y 5',8'-furanoides (Figura 3); en un reciente estudio se ha sugerido que el importante cambio en el perfil de carotenoides del mango como consecuencia del procesado, puede ser debido a estas reacciones (Rodríguez-Amaya, 1996).

En este estudio se observó que mientras que en la fruta fresca el principal carotenoide era violaxantina, en el producto procesado como zumo dicho carotenoide no se detectaba, aunque sí era apreciable la cantidad de auroxantina, no presente en la fruta fresca; este hecho podría explicarse como consecuencia de la conversión de los grupos 5,6-epóxido de la violaxantina en 5,8-furanoides de la auroxantina, posiblemente debido a la liberación de ácidos orgánicos del mango durante el procesado industrial (Di Mascio, Kaiser, & Sies, 1989).

### **2.3. Efecto del calor sobre los pigmentos.**

El color de un alimento viene determinado por el estado y la estabilidad de algunos pigmentos naturales o añadidos y por el desarrollo de algún tipo de coloración durante el procesado y almacenamiento.

Los pigmentos naturales son generalmente compuestos inestables que se descomponen por el calor y durante el almacenamiento, aunque su estabilidad depende de muchos factores.

Los carotenos son compuestos bastante termoestables, aunque intervienen en diversas reacciones, por ejemplo, con el ácido ascórbico, con productos de la descomposición del azúcar tales como hidroximetil furfural y con otros compuestos fenólicos reactivos que determinan su descomposición. Los factores que aceleran su degradación incluyen niveles altos de oxígeno en los productos y la temperatura de almacenamiento de frutas rojas tales como fresas, es resultado de la descomposición por influencia directa de la temperatura de almacenamiento.

Los carotenoides son sumamente liposolubles y determinan la coloración amarilla, naranja y roja. Son compuestos insaturados y, por consiguiente, susceptibles de experimentar dos tipos de isomerización, es decir, cis trans isomerización y epóxido isomerización, que pueden provocar aclarado de la coloración. Se considera que la temperatura de almacenamiento influye más sobre la isomerización que el proceso térmico por sí mismo.

Las clorofilas y los compuestos hemo, ambos muy sensibles al calor, son los dos principales grupos de pigmentos basados en la porfirina. Durante el tratamiento térmico, la clorofila se transforma en feofitina con una pérdida asociada de color verde. Se ha realizado varios intentos para reducir la pérdida de color tales como ajustar el pH.

Las betalinas son pigmentos hidrosolubles susceptibles de oxidación con pérdida de color rojo. La aparición de un color castaño en remolacha de mesa conservada mediante calor es un



ejemplo en el que el oxígeno residual presente en el producto o en el espacio libre superior de los envases determina la aparición de un color castaño chocolate.

Al igual que la descomposición de los pigmentos, según se ha indicado anteriormente, la oxidación y la reacción de Maillard puede provocar la aparición de coloraciones durante el tratamiento y almacenamiento.

El tratamiento térmico por sí mismo en presencia de oxígeno ejerce un efecto importante sobre la calidad del producto final y esto se ha demostrado mediante la comparación de productos envasados en recipientes de hojalata sin lacar con productos idénticos tratados en latas lacadas o en recipientes de vidrio. En el recipiente de hojalata sin lacar la disolución del estaño durante el tratamiento térmico elimina una elevada proporción del oxígeno presente en el interior del envase, quedando poco para reaccionar con el alimento.

Algunos productos como frutas pálidas, tomates y recetas en las que participa el tomate, setas y productos lácteos son particularmente susceptibles a estos cambios oxidativos inducidos por el calor. Rose y Blundstone demostraron que la principal causa de cambio de color en judías con salsa de tomate era la formación de melonoidinas a partir de productos derivados de la reacción de Maillard descrita anteriormente.

El ácido ascórbico se emplea con frecuencia como antioxidante y puede ser eficaz en la mejora de la coloración en determinados productos, por ejemplo, en las setas. Sin embargo, puede ser degradado hasta productos reactivos capaces de reaccionar posteriormente para formar pigmentos de color castaño.

#### **2.4. Dificultades para cuantificar el $\beta$ -caroteno**

Dado que se ha reconocido ampliamente la importancia de determinar el contenido de provitamina A en los alimentos, se han hecho mayores esfuerzos para mejorar la validez/confiabilidad de los datos. Debido a las dificultades inherentes a los análisis de los carotenoides, las cuales a veces no son percibidas por los mismos analistas, todavía aparece como cuestionable la confiabilidad de una parte sustancial de la información existente.

Una buena comprensión de la naturaleza de los carotenoides es ciertamente un pre requisito para una buena realización del análisis y ayuda al investigador a evitar las discrepancias en los resultados y la desinformación que persisten en la literatura.

La magnitud del desafío analítico se puede comprender mejor si se consideran los siguientes factores (Amaya-Farfán, 1992):

- Existen muchos carotenoides naturales
- La composición de los carotenoides en los alimentos varía tanto cualitativa como cuantitativamente
- Las concentraciones de carotenoides en un alimento dado cubren un amplio rango.
- Sólo unos pocos carotenoides son provitaminas A y aquellos que lo son varían en su bioactividad.
- Los carotenoides tienen una predisposición a la isomerización y oxidación.

Por lo tanto, es probable que ocurran problemas al separar, identificar y cuantificar las provitaminas junto con su degradación durante el análisis. Además, está bien documentado que la composición de los carotenoides varía en función de factores tales como variedad o cultivar, estado de maduración, clima o ubicación geográfica, parte analizada, manipulación post-cosecha y almacenamiento (Rodríguez-Amaya, 1993). No se puede dejar de mencionar la importancia de un muestreo adecuado y se debe acompañar a los resultados información pertinente que indique

la variedad, estado de maduración, estación y origen geográfico, y parte analizada. Los errores incurridos al muestrear pueden superar fácilmente a los del análisis mismo.

Cualquiera sea el método escogido, es esencial que se tomen las precauciones necesarias para evitar transformaciones y pérdidas cuantitativas de los carotenoides durante el análisis.

Estas incluyen principalmente (Davies, 1976):

- Completar el análisis dentro del plazo más breve posible.
- Usar solventes de grado reactivo o destilados libres de impurezas nocivas, tales como éter etílico libre de peróxidos y tetrahidrofurano, o cloroformo libre de ácido.
- Proteger de la luz
- Excluir oxígeno, por ejemplo, utilizando una atmósfera al vacío, de nitrógeno o de argón.
- Evitar altas temperaturas

También, se puede requerir de antioxidantes y agentes neutralizantes especialmente cuando el análisis es prolongado. Las muestras después de cortarse o desmenuzarse se deben extraer inmediatamente para evitar la oxidación enzimática. De hecho, la desintegración de la muestra y la extracción con un solvente orgánico se realizan generalmente en forma simultánea. Una buena medida es comenzar el análisis tan pronto como se recolecten las muestras debido a que es difícil preservar las muestras sin alterar su composición.

El procedimiento analítico general para el análisis de carotenoides consiste en:

- Muestreo y preparación de la muestra
- Extracción
- Transferencia (partición) a éter de petróleo, hexano o éter etílico
- Saponificación y lavado

- Concentración en evaporador rotatorio (< 35 °C)
- Separación cromatográfica
- Identificación y cuantificación

La partición se puede omitir cuando se realizan métodos por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). La saponificación es considerada el mejor medio para remover las clorofilas y lípidos no deseados y para hidrolizar los ésteres de carotenoides. Sin embargo, lo anterior aumenta el tiempo requerido para el análisis y puede formar artefactos y degradar los carotenoides; la extensión de que esto ocurra depende de las condiciones utilizadas (Kimura et al. 1990). Por lo tanto, cuando sea posible se debería eliminar la saponificación del procedimiento; se ha demostrado por ejemplo que es innecesario para los vegetales con hojas y tomates (Mercadante y Rodríguez-Amaya 1989; Rodríguez-Amaya y Tavares 1992).

Las fuentes típicas de errores en el análisis de carotenoides son:

- muestras que no representan los lotes de alimentos bajo investigación
- Extracción incompleta
- Pérdidas en la partición, saponificación y lavado
- Separación incompleta
- Mala identificación
- Fallas en la cuantificación y cálculo
- Isomerización y oxidación de los carotenoides durante el análisis.

Con una atención a menudo sólo superficial, las etapas precromatográficas pueden introducir errores significativos, los cuales no se pueden compensar en la etapa de la medición no importa cuán sofisticado sea el instrumento analítico. Los resultados obtenidos son sólo buenos en la medida que lo sea el extracto sometido a cromatografía.

El análisis de las provitaminas A es evidentemente más sencillo que la determinación del espectro total de los carotenoides. Sin embargo, es necesario separar las provitaminas A de los carotenoides inactivos y entre ellas, de tal modo que se puedan cuantificar separadamente. La separación cromatográfica de los carotenoides se puede realizar mediante la clásica cromatografía de columna abierta (CCA) o por HPLC. Aunque útil para identificar los carotenoides, no se recomienda la cromatografía de capa fina (TLC) para el análisis cuantitativo, debido a las dificultades en recuperar los carotenoides separados de las placas y la posibilidad de isomerización y oxidación en la superficie altamente expuesta.

Tampoco es apropiada la cromatografía de gases (CG) debido a la termolabilidad y baja volatilidad de los carotenoides.

Se ha señalado muy a menudo que la determinación de provitamina A se debería realizar mediante HPLC, siendo considerada inadecuada la CCA. Sin embargo, tres investigaciones

han demostrado que cualquiera de estos métodos cromatográficos se puede usar en forma confiable (Carvalho et al. 1992), siempre que el análisis se realice bajo condiciones óptimas. La exactitud y reproducibilidad de los resultados utilizando CCA depende de la habilidad del analista en empacar la columna y en ajustar los volúmenes y proporciones de los solventes utilizados para la elución (remoción desde el adsorbente) así como también la agudeza para visualizar la separación. La separación cromatográfica debería realizarse hasta que se separen las provitaminas A, y no hasta que se recolecte una parte de una mezcla de carotenoides como lo señalan los métodos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y los de la European Cooperation for Scientific and Technological Research (COST).

Los principales problemas en HPLC son obtener y mantener estándares de carotenoides para su cuantificación, el gasto financiero extremadamente alto y los costos de mantención y

operación. Los proyectos que utilizan HPLC en los países en desarrollo cuentan por lo general con financiamiento externo y no se puede ignorar el tema de la sustentabilidad.

En la CCA, los carotenoides se colocan en una columna de vidrio empacada con un adsorbente (por lo general MgO: Hyflosupercel o alúmina neutra desactivada). La separación y elución se realizan mediante el aumento de la polaridad del solvente (por lo general éter de petróleo o hexano con cantidades crecientes de éter etílico o acetona). Las provitaminas A separadas (identificadas completamente) se reúnen y se cuantifican espectrofotométricamente. La HPLC por lo general se realiza utilizando una columna C18 con mezclas de acetonitrilo, metanol, acetato de etilo, cloroformo o tetrahidrofurano como fases móviles.

Debido a que los carotenoides absorben en forma máxima a diferentes longitudes de onda y tienen diferentes coeficientes de absorción, los resultados obtenidos de la normalización (porcentajes de área) sólo se pueden considerar como proporciones relativas aproximadas.

Sin embargo, para la ciencia de alimentos y para propósitos nutricionales, los resultados son sólo útiles si se presentan en términos de concentración, es decir, peso de la provitamina por unidad de peso de la muestra. Esto se puede realizar en HPLC mediante curvas de calibración interna o externa, para lo cual se deben determinar también espectrofotométricamente las concentraciones de los estándares.

Por lo tanto, se requiere de una fuente constante y confiable de estándares puros de provitamina A especialmente para la estandarización externa. La exactitud de los resultados está directamente relacionada a saber cuan exactamente se conocen las concentraciones de las soluciones estándares. Desafortunadamente, sólo estándares de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno están disponibles en forma comercial. Más aún, los estándares comerciales de  $\beta$ -caroteno han demostrado tener una pureza variable, lo cual quiere decir que se debe verificar la pureza del estándar comercial

del carotenoide antes de usarlo y se podría requerir de su purificación. Otras provitaminas tales como  $\beta$ -criptoxantina deben ser aisladas por el analista a partir de fuentes naturales.

### Capítulo III: Parte experimental

#### 3.1. Recolección de muestras

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional “San Luís Gonzaga” de Ica. Las muestras empleadas han sido el aguaymanto fresco y el aguaymanto sometido a calor para hacer un jugo libre de microorganismos, las muestras se compraron en el mercado de frutas de Ica, con un peso total de 5 kg. La fruta recolectada se llevó al laboratorio para los análisis respectivos y los ensayos sobre degradación de carotenos.



*Figura 2.* Frutos de aguaymanto con su cubierta



*Figura 3.* Fruto de aguaymanto sin la cubierta encapsulante

### **3.2. Tratamiento de las muestras para el análisis**

Las muestras de aguaymanto fresco recolectadas, primeramente, fueron sometidas a selección con el fin de eliminar todas aquellas partes que estaban en mal estado, los residuos vegetales ajenos a las muestras, las hojas y/o los tallos adheridos, etc. Esta selección fue manual y se hizo en una mesa de trabajo de laboratorio.

Una vez seleccionada la muestra, se procedió a lavarla con agua corriente a fin de eliminar de su superficie la tierra, el polvo y la suciedad adheridas. Se empleó abundante agua y agitación manual. Después de lo cual, se dejó escurrir.





*Figura 4. Pelado del aguaymanto.*

Luego se cortaron los frutos en cuatro partes cada uno y se colocó en la estufa de secado a una temperatura de 40 °C durante 24 horas, a fin de eliminar la humedad y conseguir un producto que se quiebre fácilmente. En la estufa se acomodaron los materiales en camas de 2 cm de alto, de tal forma que su deshidratación fuera fácil y uniforme.

Una vez seca, se retiró de la estufa y se pulverizó en el molino de martillo obteniéndose un material heterogéneo de diversa granulometría. Debido a esto se procedió al tamizaje para seleccionar diversas muestras de acuerdo al tamaño del grano. Se emplearon tamices de malla de 4 mm, 2 mm, 1 mm y 0.8 mm, obteniéndose una mayor cantidad de muestra de 0.8 mm, con apariencia de polvo fino. El material pulverizado se envasó en bolsas de papel.



*Figura 5. Pesaje de las muestras*

### 3.3. Determinación de la composición química

Las muestras fueron analizadas para determinar su composición química proximal: humedad, fibra, cenizas, proteínas, grasas y carbohidratos, empleando para ello los métodos generales de análisis.

#### A. Humedad.

**(Método gravimétrico - AOAC - 1984).**

Se pesó 10 g de muestra pulverizada, en luna de reloj tarada y se llevó a estufa a 110 °C por 3 horas, luego se enfrió en desecador y se pesó. Se repitió el proceso hasta peso constante. El cálculo de la humedad se expresa en %.

$$\% H = \frac{P_{\text{inicial}} - P_{\text{final}}}{P_{\text{de la muestra}}} \times 100$$

#### B. Grasas.

**(Método Soxhlet - AOAC - 1984).**

En un cartucho de papel filtro se coloca 10 g de muestra seca y pulverizada, en la cámara ex-tractora del equipo Soxhlet, se echa hexano hasta que tape el cartucho dejando macerar por 12 horas, después de las cuales se agrega un poco de solvente y se inicia el calentamiento para que este recircule durante 3 o 4 horas hasta que el solvente en la cámara de extracción se vea transparente. Luego por destilación se recupera el Hexano, dejando libre la grasa que se lleva a estufa a 100 °C, se enfría y pesa, hasta peso constante. El resultado se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ grasa} = \frac{(W \text{ balón} + \text{grasa}) - (W \text{ balón vacío})}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

### C. Cenizas.

#### (Método de la Incineración Directa - AOAC - 1984).

En un crisol de porcelana seco y tarado, se echan 2 g de muestra pulverizada, seca y desgrasada. Se calienta hasta 200 °C hasta completa carbonización luego se lleva a mufla a 600 °C por 12 horas.

Se enfría en desecador y se pesa. Se vuelve a colocar en una mufla a 600 °C por media hora, se enfría y pesa. Se repiten las tres últimas operaciones hasta conseguir peso constante. El cálculo se realiza con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{W de las cenizas}}{\text{W de la muestra}} \times 100$$

### D. Proteínas.

#### (Método de micro Kjeldahl - AOAC - 1984).

0,3 g de muestra pulverizada, seca y desgrasada, se echa en el balón Kjeldahl, adicionando 1 g de catalizador (Mezcla de  $\text{CuSO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$ ) y 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se calienta primero a temperatura moderada, luego hasta ebullición y se mantiene a esa temperatura hasta que el líquido se torne transparente o de un color verde esmeralda.

Terminada la digestión y fría la muestra se añaden 100 ml de agua destilada y se trasvasa a un balón de 500 ml, se agrega 100 de NaOH al 40% y se destila, recibiendo el destilado en un Erlenmeyer con 50 ml de ácido bórico al 2%, y gotas de indicador rojo de metilo. La destilación se prolonga hasta la total destilación del amoníaco.

El exceso de amoníaco que no ha reaccionado con el ácido bórico se titula con ácido sulfúrico 0.1 N. El porcentaje se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ Proteínas} = \frac{\text{Gasto} \times 0,014 \times F \times 100}{\text{Peso de la muestra}}$$

Dónde:

F - es el factor de la sustancia a analizar.



*Figura 6.* Determinación de proteínas.

### **E. Fibras.**

**(Método de digestión con ácido y álcalis diluidos - AOAC - 1984).**

Un gramo de muestra pulverizada, seca y desengrasada se colocan en un vaso de precipitados y se agrega 200 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1,25%, se hierve a reflujo durante 30 minutos, luego se filtra al vacío, lavando con agua caliente hasta total eliminación del ácido.

El residuo lavado se coloca en un vaso de precipitados, con 200 ml de NaOH al 1,25%, dejándolo hervir durante 30 minutos más. Luego se deja reposar una hora, se filtra, se lava y se seca. El residuo insoluble se seca a 100 °C hasta peso constante. Luego se incinera en mufla a 600 °C se enfría y pesa. El % de fibras se calcula:

$$\% F = \frac{\text{Material insoluble-peso de las cenizas}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

#### **F. Carbohidratos.**

**(Por diferencia - AOAC - 1984).**

El porcentaje de carbohidratos, se determinó por diferencia de pesos sumando las determinaciones anteriores y restando de 100.

$$\% \text{Carb.} = 100 - (\%H + \%G + \%P + \%F + \%C)$$

### **3.4. Extracción del caroteno**

#### **a. Selección del método.**

Para la obtención del caroteno, preliminarmente se ensayaron los diversos métodos, optándose por el método de ebullición con éter de petróleo, previa maceración, ya que este en todos los ensayos, nos proporcionó un mayor rendimiento. Además, se sabe que la velocidad de degradación de los carotenos aumenta al elevar la temperatura. Existe una relación logarítmica entre la retención del color y la temperatura de los procesos de esterilización o almacenamiento. Por eso para mejorar la retención de los pigmentos, se aconseja la aplicación de tratamientos a altas temperaturas, en corto tiempo y el almacenamiento a bajas temperaturas. A título de

ejemplo, podría citarse el hecho de que el tiempo de calentamiento a 100 °C, para la destrucción del 50% del pigmento (vida media) es del orden de 1 hora, cosa que hemos querido evitar manteniendo en ebullición sólo por media hora para ambas materias primas, durante la extracción.

**b. Obtención experimental del caroteno.**

La obtención experimental del colorante a partir de las dos materias primas (aguaymanto fresco y aguaymanto procesado) requiere del desarrollo de las siguientes operaciones:

**Selección.**

Las materias primas recolectadas, se seleccionan manualmente eliminando todo lo que está en mal estado, los tallos y hojas, dejándolas exentas de elementos ajenos.

**Lavado.**

Las muestras seleccionadas son lavadas con abundante agua a fin de eliminar de su superficie la tierra, el polvo y las sustancias que quedan retenidas sobre ellas. El lavado se hace manualmente, con agua corriente y luego se deja secar a temperatura ambiente.

**Secado.**

El secado se hace en estufa a 40 °C durante 12 horas para eliminar totalmente toda el agua residual que queda.

**Pulverizado.**

Las muestras secas se pulverizan en molino de martillo. El material pulverizado se obtuvo en gran cantidad en forma de polvo y en pequeña cantidad en granos grandes.



*Figura 7.* Preparación de la muestra para la maceración.

### **Extracción.**

Las muestras pulverizadas se maceran durante 12 horas en éter a temperatura ambiente, manteniéndolas en constante agitación y luego se calientan durante 30 minutos a reflujo, hasta ebullición (40 °C). El líquido adopta un color rojo oscuro. Luego se deja enfriar.





*Figura 8.* Extracción del caroteno (Recuperación del solvente)

### **Filtración.**

Una vez frío los extractos, estos se filtran empleando papel filtro basto, para separar la parte sólida del líquido siruposo que contiene el colorante. La filtración se realiza a presión reducida para lograr una mayor rapidez.

### **Purificación.**

Los extractos obtenidos poseen materiales extraños como: otras sustancias fenólicas, pectinas, gomas, etc. que pueden influenciar en la estabilidad y/o análisis de los carotenos.

La purificación se realizó por cromatografía de intercambio iónico. Se empleó para ello la resina amberlita CG-50.

Las resinas fueron suspendidas en agua destilada y dejadas en reposo durante 1 hora; el sobrenadante obtenido, conteniendo partículas finas fue eliminado. Esta operación se repitió tres veces, luego se procedió a llenar la columna (1.5 x 15 cm). Teniendo cuidado de eliminar las partículas de aire retenidas. Finalmente se hizo pasar tres volúmenes de agua destilada a través de la resina quedando lista para ser utilizada.

El extracto etéreo de caroteno (3.5 ml) fue depositado en la parte superior de la columna, el cual se dejó pasar e inmediatamente se dio inicio a la elución con agua destilada (aproximadamente 18 ml) y luego con una solución de metanol: HCl (85:15).

### **Análisis.**

Durante la elución se recolectaron fracciones de 4,5 ml. En las cuales se determinó el contenido de sólidos solubles, contenido de caroteno e índice de degradación.

Para determinar sólidos solubles se tomaron 50 ml de la muestra y se filtró en papel fino, del filtrado se tomó 25 ml en cápsula de evaporación tarada y se llevó a evaporación en baño maría hasta sequedad aparente, luego se lleva a estufa a 100 °C, se enfría en desecador y se pesa. La operación se repite hasta peso constante. El resultado obtenido se refiere a 100 g de muestra.

Para determinar el contenido de caroteno (carotenos totales), se utilizó el método de pH diferencial de Fuleki y Francis. El principio del método consiste en la determinación de la densidad óptica de la muestra a diferente pH a una misma longitud de onda, a fin de establecer la diferencia de color que experimenta el colorante a pH 1 (en el que es rojo debido a la formación de sal favilium) y a pH 4.5 (en el que es menos coloreada debido a la transformación de la sal flavilium a la base carbinol). Luego por cálculo se determina la concentración de caroteno.

Para ello se prepararon soluciones buffers de pH 1 y 4.5, en las cuales se diluye las muestras, que se dejaron reposar en un lugar oscuro, a temperatura ambiente, por dos horas y se determinó la densidad óptica a 510 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Las fórmulas utilizadas para determinar el contenido de caroteno son:

**I) Cálculo de la densidad óptica total para 100 ml de extracto:**

$$DOT = DO \times V_{dil} \times F_{dil}$$

En donde:

DOT Densidad óptica total.

$V_{dil}$  Volumen en ml, en el cual es diluido el extracto para medir la DO.

$F_{dil}$  Factor de dilución del extracto en buffer a pH 1,0 o buffer a pH 4,5.

**II) Diferencia entre la densidad óptica total determinada a pH 1,0 y a pH 4,5.**

$$\Delta DO = DOT_{pH1,0} - DOT_{pH4,5}$$

**III) Contenido de caroteno (mg/100 mL de extracto).**

$$CA = (\Delta DO) / (E^{1\%}_{1cm}/10) = (\Delta DO) / (77,5)$$

Dónde:

$E^{1\%}_{1cm}$  775 coeficiente de extinción molecular promedio de los carotenoides, calculado por Fuleki y Francis.

**IV) Índice de degradación.**

Se empleó el método de pH diferencial de Fuleki y Francis. El índice de degradación indica el grado de deterioro de caroteno en las muestras.

Primero se determinó el contenido de carotenos totales en el extracto fresco o en aquel que no haya sufrido deterioro alguno. Para ello se mide la DO a 510 nm de una muestra diluida en buffer de pH 1,0. Se calcula la DOT y luego el contenido total de carotenos con la fórmula:

$$\text{CAR (mg/100 ml)} = (\text{DOT}_{\text{pH1,0}}) / (E^{1\%}_{1\text{cm}} / 10)$$

Donde:

$E^{1\%}_{1\text{cm}}$  873, coeficiente de extinción molecular promedio de los carotenoides a pH 1,0, reportado por Fuleki y Francis.

El índice de degradación se calculó con la fórmula:

$$\text{ID} = \frac{(\text{DOT}_{\text{pH1,0}})(87,3) / (\Delta\text{DO})(77,5)}{(\text{DOT}_{\text{pH1,0}} \times 0,8809) / \Delta\text{DO}}$$

### **Secado.**

Los extractos primero se concentran por evaporación en baño maría a 40 °C, luego se lleva a la estufa a la misma temperatura, durante 6 horas para su desecación. Terminado el secado se obtiene una sustancia roja grumosa que se termina de secar al aire, para luego pulverizar.

### **Pulverizado.**

Las masas grumosas obtenidas se pulverizan en un mortero para obtener finalmente un polvo fino que es el caroteno.

### **Envasado.**

El colorante obtenido se envasa en bolsas de papel graff y se almacena en un ambiente seco y ventilado.

### **c. Estudio de los parámetros de trabajo.**

En la obtención del caroteno, se estudiaron: la granulometría del material molido, cantidad de éter, temperatura de extracción y tiempo de maceración.

#### **Influencia del grano en el rendimiento en colorante.**

Se hicieron pruebas con granos de 4 mm, 2 mm, 1 mm, y 0.8 mm, bajo las mismas condiciones obteniéndose resultados en los cuales queda claramente establecido que el material pulverizado, tiene un mayor rendimiento en colorante.

#### **Relación cantidad de éter - material.**

En el estudio experimental se varió la cantidad de éter para extraer, considerando un mismo peso de materia prima para cada una de las pruebas.

#### **Influencia de la temperatura y del tiempo de maceración.**

Durante los ensayos se evaluó la influencia de la temperatura de maceración y del tiempo de maceración con respecto al rendimiento en colorante.

### **3.5. Análisis del colorante**

#### **Identificación del extracto colorante.**

Se trató una solución al 5% del colorante obtenido con ácido y álcalis para ver la variación de color. Cuando se le agrega ácido sulfúrico, el color de la solución vira a rojo intenso y en presencia de álcalis (NaOH) se vuelve azul.

#### **Determinación de humedad.**

En un vidrio de reloj se calienta 5 g de extracto seco a 110 °C durante 3 horas, luego se pesa hasta peso constante.

#### **Determinación de cenizas.**

Se pesaron 5 g de extracto en una cápsula de platino y se evaporó a sequedad, el calentamiento fue gradual. Luego se quemó a la llama hasta carbonización completa después de lo cual se incineró en la mufla. Luego por diferencia de pesos se determinaron las cenizas.

#### **Determinación de glucosa.**

Se tomó 1 g de colorante con 5 ml de agua y 5 ml de licor de Felhing, se calentó y observó si hay o no formación de precipitado rojo ladrillo.

#### **Determinación de cloruros y sulfatos.**

La muestra se lleva a cenizas, se diluye en agua y se filtra dividiendo el filtrado en dos tubos de ensayo; uno de ellos se trató con nitrato de plata y el otro con cloruro de bario observándose si hay formación de precipitados. Los cloruros y sulfatos se ensayan para determinar si hay o no contaminación por estas sustancias, en el colorante.

#### **Ensayo de solubilidad.**

En un vidrio de reloj las muestras se trataron con ácidos inorgánicos y solventes orgánicos para comprobar su solubilidad.



*Figura 9.* Caroteno extraído del aguaymanto.



*Figura 10.* Reconocimiento del caroteno con ácido

## Capítulo IV: Resultados

### 4.1. Resultados

#### 4.1.1. Del análisis químico.

Tabla 2. *Valores obtenidos del aguaymanto fresco (muestra fresca)*

PARÁMETROS	RESULTADOS
Humedad, %	94.25
Grasa, %	0.34
Proteínas, % (F = 6.25)	0.62
Fibra, %	1.52
Cenizas, %	1.04
Carbohidratos, %	2.23
B-caroteno, mg/100 g	457

FUENTE: Datos experimentales.

#### INTERPRETACIÓN:

La tabla 2 muestra los resultados del análisis del aguaymanto fresco, el cual posee un gran porcentaje de agua elevado de 94,25%, otro constituyente que tiene alto porcentaje son los carbohidratos (2.23%) y las fibras (1.52%). las cenizas están en un porcentaje de 1.04%. La cantidad de caroteno encontrado fue de 457 mg/100 g.

#### 4.1.2. De la extracción.

Estudio de los parámetros de extracción.

Tabla 3. *Influencia del tamaño de la partícula (muestra: aguaymanto fresco)*

TAMAÑO, mm	mg Caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
------------	-------------------	----------------



4	411	90.53
2	437	95.62
0.8	454	99.34

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 3 muestra los resultados de los ensayos realizados con mallas de 4, 2 y 0.8 mm. para tamizar la muestra fresca. Como se observa, cuanto mayor es el tamaño de la partícula, menor es el rendimiento. Con malla 4 mm, el rendimiento es de 90.53%; mientras que con malla 0.8 mm el rendimiento es de 99.34%.

Tabla 4. *Influencia del tamaño de la partícula (muestra: aguaymanto procesado)*

TAMAÑO. mm	mg Caroteno/100 g	RENDIMIENTO. %
4	341	74.62
2	349	76.37
0.8	382	83.59

FUENTE: Datos experimentales.

Cantidad de caroteno inicial en el aguaymanto 457 mg/100 g

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 4 muestra los resultados de los ensayos realizados con mallas de 4, 2 y 0.8 mm. para tamizar la muestra de aguaymanto. Como se observa, cuanto mayor es el tamaño de la

partícula. menor es el rendimiento. Los resultados son similares al caso anterior. Con malla 4 mm. el rendimiento es de 74.62%; mientras que con malla 0.8 mm el rendimiento es de 83.59%.

Tabla 5. *Influencia del volumen de éter de petróleo (muestra: aguaymanto fresco)*

VOL. ÉTER. mL	mg Caroteno/100 mL	RENDIMIENTO. %
100	374	81.83
200	402	87.96
300	431	94.31
400	454	99.34
500	454	99.34

FUENTE: Datos experimentales.

#### **INTERPRETACIÓN:**

La tabla 5. muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la cantidad requerida de éter de petróleo para extraer los carotenos de la muestra de aguaymanto fresco. Los ensayos indican que se precisa 400 ml de éter para obtener el máximo de caroteno de la muestra tomada que fue de 100 g, lo que quiere decir que la relación es de 1:4.

Tabla 6. *Influencia del volumen de éter de petróleo (muestra: aguaymanto procesado)*

VOL. ÉTER, ml	mg Caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
100	290	63.46
200	322	70.46
300	356	77.90
400	382	83.59

500

382

83.59

---

FUENTE: Datos experimentales.

**INTERPRETACIÓN:**

La tabla 6 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la cantidad requerida de éter con la muestra de aguaymanto procesado. Los ensayos indican que se precisa 400 ml de éter de petróleo para obtener el máximo de caroteno de la muestra tomada (382 mg), en este caso también la relación es de 1:4.

Tabla 7. *Influencia de la temperatura en la maceración (muestra: aguaymanto fresco)*

TEMPERATURA, °C	mg Caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
10	405	88.62
20	432	94.53
30	454	99.34

FUENTE: Datos experimentales.

**INTERPRETACIÓN:**

La tabla 7 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la temperatura de maceración óptima para la muestra de aguaymanto fresco. Según los ensayos la temperatura requerida debe ser de 30 °C ya que el rendimiento es de 99.34%.

Tabla 8. *Influencia de la temperatura en la maceración (muestra: aguaymanto procesado)*

---



---

TEMPERATURA. °C	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO. %
10	322	70.46
20	366	80.09
30	382	83.58

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 8 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la relación entre la temperatura de maceración y el rendimiento en caroteno en la muestra de aguaymanto procesado. Los resultados indican que la mayor temperatura (30 °C) produce un mayor rendimiento (83.58%) durante la maceración.

Tabla 9. Influencia del tiempo de maceración (muestra: aguaymanto fresco)

TIEMPO, Horas	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
4	268	58.64
6	293	64.11
8	356	77.90
10	395	86.43
12	454	99.34
14	454	99,34

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 9 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la influencia del tiempo en el rendimiento de la maceración de la muestra de aguaymanto fresco. Los resultados

indican que el tiempo requerido es de 12 horas para extraer un máximo de caroteno (454 mg) con un rendimiento de 99.34%.

Tabla 10. *Influencia del tiempo de maceración (muestra: aguaymanto procesado)*

TIEMPO, Horas	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
4	275	60.18
6	311	68.05
8	356	77.89
10	370	80.96
12	382	83.59
14	382	83.59

FUENTE: Datos experimentales

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 10 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la influencia del tiempo en el rendimiento de la maceración de la muestra de aguaymanto procesado. Los resultados indican que el tiempo requerido es de 12 horas para extraer un máximo de caroteno (382 mg) con un rendimiento de 83.59%.

Tabla 11. *Influencia del tiempo de ebullición (muestra: aguaymanto fresco)*

TIEMPO, min	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
-------------	-------------------	----------------

10	376	82.28
15	384	84.03
20	399	87.31
25	420	91.90
30	439	96.06
35	454	99.34

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 11 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la influencia del tiempo en la ebullición de la muestra de aguaymanto fresco. Los resultados indican que el tiempo requerido es de 35 minutos para extraer un máximo de caroteno (454 mg) con un rendimiento de 99.34%.

Tabla 12. *Influencia del tiempo de ebullición (muestra: aguaymanto procesado)*

TIEMPO, min	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
10	304	66.52
15	326	71.33
20	351	76.80
25	369	80.74
30	382	83.59
35	382	83.59

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 12 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la influencia del tiempo de ebullición de la muestra de aguaymanto procesado en la extracción de carotenos.

Los resultados indican que el tiempo requerido es de 30 minutos para extraer un máximo de caroteno (382 mg) con un rendimiento de 83.59%.

#### 4.1.3. Purificación y determinación del $\beta$ -caroteno.

Tabla 13. *Relación sólidos solubles-cantidad de caroteno (muestra: aguaymanto fresco)*

SÓLIDOS SOLUBLES, %	CAROTENO, mg/100 g
0,2	454
0,4	450
0,6	438
0,8	420
1,0	401
1,2	386
1,4	364

Fuente: Datos experimentales.

#### INTERPRETACIÓN:

La tabla 13 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la relación sólidos solubles – cantidad de caroteno en la muestra de aguaymanto fresco. Los resultados indican conforme aumenta la cantidad de sólidos solubles, disminuye la cantidad de caroteno.

Tabla 14. *Relación sólidos solubles- cantidad de  $\beta$ -caroteno (muestra: aguaymanto procesado)*

SÓLIDOS SOLUBLES, %	CAROTENO, mg/100 g
---------------------	--------------------

---

0,2	382
0,4	376
0,6	363
0,8	335
1,0	312
1,2	295
1,4	268
1,6	

---

Fuente: Datos experimentales.

### **INTERPRETACIÓN:**

La tabla 14 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la relación sólidos solubles – cantidad de caroteno en la muestra de aguaymanto procesado. Los resultados son similares a los del caso anterior (para el aguaymanto fresco), e indican que conforme aumenta la cantidad de sólidos solubles, disminuye la cantidad de caroteno.

Tabla 15. *Influencia del tiempo y temperatura de calentamiento sobre el índice de degradación*

---

MUESTRA	T, °C	TIEMPO	Caroteno	ID
		Minutos	mg/100 g	
Aguaymanto fresco	40	30	454	0,34
Aguaymanto procesado	40	30	382	1,42

---

Fuente: Datos experimentales.

### **INTERPRETACIÓN:**

La tabla 15 muestra los resultados de los ensayos realizados para establecer la influencia del tiempo y de la temperatura de calentamiento sobre el índice de degradación de los carotenos.



Los resultados indican para el caso del aguaymanto fresco el índice de degradación es de 0.34 y para el aguaymanto procesado de 1.42.

#### 4.1.4. Del rendimiento total comparativo entre las dos muestras.

Tabla 16. *Rendimiento comparativo en caroteno*

MATERIA PRIMA	mg caroteno/100 g	RENDIMIENTO, %
Aguaymanto fresco	454	99.34
Aguaymanto procesado	382	83.59

FUENTE: Elaboración propia a partir de datos experimentales.

#### INTERPRETACIÓN:

La tabla 16 muestra los resultados comparativos del rendimiento en caroteno para el caso del aguaymanto fresco y el aguaymanto procesado. Los resultados indican que el aguaymanto fresco tiene un mayor rendimiento (99.34%). mientras que el aguaymanto procesado tiene un rendimiento de 83.59%.

$$\%R = (\text{Peso del caroteno obtenido} / \text{Peso caroteno Analizado}) \times 100$$

$$\%R = (454 / 457) \times 100 = 99.34\%$$

$$\%R = (382 / 457) \times 100 = 83.59\%$$

#### 4.1.5. De los análisis del colorante.

Tabla 17. *Resultados de los análisis hechos al colorante*

ENSAYO	MATERIA PRIMA
--------	---------------

	Aguaymanto fresco	Aguaymanto procesado
Identificación		
- H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rojo intenso	Rojo
- NaOH	azul	azul
Humedad, %	3.20 %	3.61 %
Cenizas	1,01	1,45
Glucosa	--	--
Cloruros	--	--
Sulfatos	--	--

FUENTE: Datos experimentales.

### INTERPRETACIÓN:

La tabla 17 muestra los resultados de los análisis cualitativos hechos a los carotenos extraídos de ambas muestras de aguaymanto. Los resultados indican que las características fisicoquímicas y la composición química, corresponden al  $\beta$ -caroteno.

Tabla 18. *Características físicas del caroteno obtenido*

CARACTERISTICA	MATERIA PRIMA	
	Aguaymanto Fresco	Aguaymanto procesado
Color	Rojo intenso	Morado
Consistencia	viscosa	Viscosa
Solubilidad:		
- En etanol	Soluble	Soluble
- En acetona	Soluble	Soluble

- En bencina	soluble	soluble
- En éter	Soluble	Soluble
- En agua	Soluble	Soluble

FUENTE: Elaboración propia a partir de datos experimentales.

### **INTERPRETACIÓN:**

La tabla 18 muestra los resultados de los ensayos cualitativos realizados para establecer las características de los carotenos obtenidos. Como se observa, las características de ellos son similares a los del caroteno de uso comercial.

### **4.2. Discusión de los resultados**

Las tablas 4.1 muestra los resultados de los análisis proximales del aguaymanto fresco, en la que es evidente un mayor contenido de humedad y de carbohidratos. En las tablas 4.3 y 4.4., se observa que cuanto más fino es el grano o el tamaño de la partícula, el rendimiento en caroteno es mayor., esto se debe que se aumenta la superficie de contacto y se logra una mejor extracción.

En lo que respecta a la cantidad de éter requerido para la extracción, se puede observar que cuando se aumenta la cantidad de solvente hasta cierto punto, la cantidad de éter que se obtiene es mayor, ya que no se satura este con el caroteno y puede extraer un poco más.

Durante la maceración un aumento de temperatura influye positivamente en la extracción del caroteno, a una temperatura de 30 grados la extracción tiene un rendimiento de 99.34%. Se extraen hasta 454 mg de caroteno para el caso del aguaymanto fresco y de 3812 para el caso del aguaymanto procesado.

Al igual que la temperatura, el tiempo de maceración es un factor directamente proporcional a la cantidad de caroteno extraído, a mayor tiempo mayor cantidad de caroteno. Durante la maceración se requieren de 12 horas para extraer el caroteno que a esa temperatura se puede obtener. Se obtiene hasta 454 mg de caroteno en 12 horas para el caso del aguaymanto fresco y 382 mg para el caso del aguaymanto procesado.

Durante la extracción a temperatura de ebullición, se estudió el tiempo mínimo que se requiere para extraer el máximo de caroteno. Según los ensayos se ha comprobado que en un tiempo mínimo de 30 minutos se extrae un total de 454 mg del colorante, lo que equivale a un 99,34% de rendimiento. Para el caso de la zanahoria procesada el rendimiento fue de 83%, es decir se obtuvo 382 mg de caroteno.

En la tabla 4.13 se muestra la relación entre sólidos solubles – cantidad de caroteno, el comportamiento de estas variables es similar para ambas muestras, el aumento de sólidos totales, trae consigo la disminución de caroteno en el extracto. La tabla 4.15 muestra los resultados de la influencia del tiempo y la temperatura sobre la degradación del caroteno. En el caso del aguaymanto fresco el índice de degradación es menor, mientras que para el procesado el índice de degradación es mayor, lo que quiere decir que la zanahoria procesada esta, más propensa a la degradación.

## Conclusiones

Al término de nuestra investigación se concluye que:

- El rendimiento en caroteno en el aguaymanto fresco es mayor que en el aguaymanto procesado, debido a la degradación que sufre por efecto del calor y del ácido agregado en los productos procesados.
- El calor afecta la cantidad de carotenos y la calidad también disminuye debido a que se degradan durante el procesamiento.
- El método empleado, combina la maceración a temperatura moderada con la ebullición en un corto tiempo, con lo cual se logra extracción máxima y mínima degradación del caroteno.
- La maceración debe de llevarse a cabo a temperatura ambiente y por un tiempo de 12 a 14 horas, en un ambiente cerrado donde no llegue luz solar.
- Las pruebas indican que una partícula más pequeña permite extraer con mayor eficacia el colorante de ambas muestras.
- Los parámetros óptimos para la extracción de caroteno a partir del aguaymanto son los siguientes:

Relación éter-material sólido: 4:1

Temperatura de maceración: 30 °C

Tiempo de maceración: 12 horas.

Temperatura de ebullición: 40 °C

Tiempo de ebullición: 30 minutos.

### **Recomendaciones**

1. El producto de estos métodos de extracción se puede utilizar para realizar posteriormente un análisis completo de carotenos, que incluiría la separación e identificación de los pigmentos por los diferentes métodos cromatográficos y espectrográficos.

2. Se recomienda tener en cuenta las precauciones para el manejo de carotenos y así minimizar los errores en los resultados, ya que estos requieren ser protegidos de la luz, oxígeno, calor, y ácidos.

3. Para la extracción de los carotenos con fines de análisis, es necesario tener en cuenta que estos son muy sensibles a diversos factores físicos y químicos que le afectan tales como: la luz, el pH, la temperatura, la acidez, presencia de oxígeno, etc., por lo que de preferencia se debe emplear el caroteno a bajas temperaturas y atmosfera modificada con nitrógeno, para que los carotenos no se degraden durante la extracción.

## Bibliografía

- Amós, A. (1969). *Manual de Industrias de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Braverman, J., & Zeki, B. (1980). *Introducción a la bioquímica de los alimentos*. Barcelona: Omega.
- Di Mascio, P., Kaiser, S., & Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem*, 535-538.
- Lock Sing, O. (2016). *Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales*. Lima: PUCP.
- Rodriguez-Amaya, D. (1996). Assessment of the Provitamin A Contents of Foods— The Brazilian Experience. *Journal of Food Composition and Analysis*, 196-230.
- AOAC. (1984). *Métodos Oficiales de Análisis*. Washington, DC.
- Amaya-Farfan J. (2008). Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 445-463.
- Amos, A. (1968). *Manual de la industria de los alimentos*. España: Editorial Acribia S.A.
- Burton, W. (1992). *The potato: A survey of its history and of factors, influencing its yield nutritive value, quality and storage*. 2da ed. Wageningen: Veenman and Zonen.
- Braverman, J. (1993). *Introducción a la Bioquímica de Alimentos*. México D.F: Editorial el Manual Moderno, S.A.
- Claus, E., y Tyler, V. (1989). *Farmacognosia*. Cuba. Edición Revolucionaria.
- Collazos, C. (1993). *La Composición de Alimentos de Mayor Consumo en el Perú*. 6ta ed. Lima, Instituto Nacional de Nutrición.
- Chiriboga, C. y Francis, F. (1988). *Ion exchange purified anthocyanin pigments as a colorant for cran-berry juice cocktail*. *Journal of Food Science*.

- Deubert, K. (1978). *A rapid method for the extraccion and quantitation of total anthocyanin of cranberry fruit*. Journal of Food Science and food chemistry.
- Davies, B.H. (1979). *Carotenoids*. In: Goodwin, T.W., ed. Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. 2da ed. London, Academic Press.
- DI Mascio, P., Kaiser, S. y Sies, H. (1989). Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Bioph.* 274, 535-538.
- Fieseer, L y Fieseer, M. (1996). *Química Orgánica Superior*. México: Ediciones Grijalbo.
- Finar, I. (1980). *Química Orgánica, Estereoquímica y Química de los Productos Naturales*. España: Editorial Alhambra S.A.
- Fuleki, T. y Francis, F. (1968). *Quantitative Methods for anthocyanins, extraccion and determination of Total Anthocyanin in cranberries*. Journal of Food Science.
- Oviedo, S. (1977) *Guía para el análisis de los compuestos del carbono*. Lima: UNMSM, Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones.
- Grant, W. 1999. An ecologic study of dietary links to prostate cancer. *Alter Medicine Rev.* 4, 162-169
- Goodwing, T. (1976). *Química y Bioquímica de Pigmentos de plantas*. Inglaterra: Departamento de Bioquímica Universidad de Liverpool
- Grobman, A. (1961). Races of maize in Peru; their origins, evolution and classification. *Natural Revarech Council Publication* 915 - 1961.
- Gros, E. (1985). *Introducción al Estudio de los Productos Naturales*. Washington DC. Editora Eva V. Chesneau.
- Hart, L y Fisher, H. (1984). *Análisis Moderno de los Alimentos*. España: Editorial Acribia.



- Hawley, G. (1975). *Diccionario de Química y Productos Químicos*. España: Ediciones Omega S.A.
- Kimura, M. (1990). *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. Washington, DC and Cali, Colombia.
- Lees, R. (1982). *Análisis de los Alimentos*. España: Editorial Acribia.
- Lock, O. (1988). *Investigación Fitoquímica*. Lima, Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Fondo Editorial.
- Lock, O. (1997). *Colorantes Naturales*. Lima, Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Fondo Editorial.
- Mayer, F. (1943). *The Chemistry of Natural Coloring Matter*. EE.UU: Reinhold Publishing Corporation.
- Reina, L. (1984). *Colorantes Naturales*. Tesis de Ingeniería Química.
- Rodríguez-Amaya D. (1996). Assessment of the provitamin A contents of foods - the Brazilian experience. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9, 196-230.
- Shalilov, I. - "La vid, Características botánicas y agronómicas" - Editorial Kalac - Moscú - 1979.
- Universidad De Lima. (1960). *Industrialización de plantas medicinales*. Tomo I- Facultad de Ingeniería Industrial, Centro de Investigación de la Producción Industrial. CIPI.
- Wallis, T. (1966). *Manual de Farmacognosia*. México: Compañía Editorial Continental S.A.