



UNIVERSIDAD DEL PAPALOPAN

CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIO DE POSGRADO

Obtención de β -Caroteno en zanahorias (*Daucus carota* L) utilizando ultrasonido y aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) como alternativa para el proceso de extracción

TESIS

**Para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

**Presenta:
Janis Axidi Espíritu Rojas**

**Director de Tesis
Dr. Andrés Aguirre cruz**

**Co-director de Tesis
Dr. Erasmo Herman y Lara**

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca. México, 2018.



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/020
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 9 de abril de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Biotecnología de la **C. Janis Axidi Espíritu Rojas**, matrícula **1514004**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Obtención de β -Caroteno en zanahorias (*Daucus carota L*) utilizando ultrasonido y aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) como alternativa para el proceso de extracción**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi jí jú



Dra. Sandra T. del Moral Ventura DIVISION DE
Jefe de la División de Estudios de Posgrado ESTUDIOS DE
POSGRADO

C.c.p. C. Janis Axidi Espíritu Rojas
C.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/038
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 14 de febrero de 2018

C. JANIS AXIDI ESPÍRITU ROJAS
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Alejandro Aparicio Saguilán	UNPA	Presidente
Dra. Betsabé Hernández Santos	ITTux	Vocal
Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	Secretario
Dr. Adolfo López Torres	UNPA	1er Suplente
Dr. Francisco Daniel Díaz Coutiño	UNPA	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



Dra. Sandra T. del Moral Ventura

Jefe de la División de Estudios

de Posgrado

DIVISION DE
ESTUDIOS DE
POSGRADO

C.c.p. Dr. Andrés Aguirre Cruz -- Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal -- Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

M. en C. Héctor López Arjona

Vice-rector Académico

Vo. Bo.



VICE-RECTORIA
ACADEMICA

CAMPUS TUXTEPEC

C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA

Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

Esta tesis fue realizada en el **Taller de Alimentos** en la **Universidad del Papaloapan**,
Campus Tuxtepec bajo la dirección del **Dr. Andrés Aguirre Cruz** y el **Dr. Erasmo
Herman y Lara**.

La investigación fue realizada bajo el financiamiento de los proyectos:

CONACYT-CIENCIAS BASICAS 2012-2017 con No. 182222

y

CONACYT No. 252013 e INFRA 255514.



Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein

DEDICATORIAS

A Dios, por estar conmigo en todo momento, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente para poder concluir una meta más y por haberme puesto en el camino grandes maestros y amigos que han sido una gran compañía

A mis padres por ser tan especiales conmigo que, a pesar de las dificultades, siempre me han brindado su apoyo en todo momento y me han regalado sabios consejos y grandes valores, por darme su motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por darme su gran amor. Ustedes son mi motor a seguir adelante día a día, los amo con todo mi corazón.

A mi esposo y gran amigo **Tito**, por estar conmigo en todo momento y apoyarme en las buenas y en las malas, por su paciencia y comprensión. También le dedico este proyecto a mi hija **Dedmi** que vino a dar luz en mi vida, que me ilusiona día a día, los amo con todo mi corazón.

A mi gran hermano **Jesús** por brindarme su apoyo y estar siempre conmigo, por enseñarme cosas nuevas y compartir tus grandes ideas, gracias hermanito te amo.

AGRADECIMIENTOS Y RECONOCIMIENTOS

Al **Dr. Andrés Aguirre Cruz** por haberme asesorado en todo momento en este trabajo, por su confianza brindada, paciencia, y dedicación, por sus conocimientos brindados y compartir sus conocimientos que me ayudaron a concluir este trabajo.

Al **Dr. Erasmo Herman y Lara**, por sus asesorías y por su colaboración en la revisión de la tesis, por brindarme su apoyo y su amistad.

A mi comité revisor integrado por el **Dr. Francisco Daniel Diaz Coutiño, Dr. Adolfo López Torres, Dr. Andrés Aguirre Cruz, Dra. Betzabé Hernández Santos**, y al **Dr. Alejandro Aparicio Saguilán** por su valiosa colaboración en la revisión para el mejoramiento de la presente tesis.

Al **Dr. Adolfo López Torres** por dedicación e interés en la elaboración de esta tesis, también por su disponibilidad de tiempo y brindarme su amistad.

Al **Instituto Tecnológico de Tuxtepec**, por facilitar sus instalaciones y apoyar en el desarrollo experimental del presente proyecto.

Al Dr. Mario Alberto de Jesús Domínguez Magaña (QEPD), por darme sabios consejos y brindarme su apoyo, y su valiosa amistad. Gracias Dr. por haber sido una gran persona y amigo, amigo solo te nos adelantaste.

A mis amigos **Jonathan, Johana, Rocio, Tito, Sadia** por los grandes momentos que pasamos juntos durante la realización de esta tesis, los aprecio mucho.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	16
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1. Zanahorias	18
2.2. Carotenoides	18
2.3. Fuentes, estructura y características químicas.....	19
2.4. β -Caroteno	20
2.5. Extracción de carotenoides con métodos convencionales y no convencionales	21
2.5.1. Métodos convencionales.....	21
2.5.2. Métodos no convencionales.....	21
2.5.3. Aceite esencial de naranja.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS	26
5.1. Objetivo general	26
5.2. Objetivos particulares.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. MATERIALES.....	27
7. Análisis físico y fisicoquímico de la materia prima.....	27
7.3. Secado en charolas	29
7.4. Análisis químico proximal en zanahorias.....	30
7.4.1. Humedad.....	31
7.4.2. Proteína	31
7.4.3. Lípidos	32
7.4.4. Cenizas.....	32
7.4.5. Fibra dietética total	33
8. Curva de calibración por espectrofotometría UV-vis	33
9. Extracción de β -caroteno.....	34
9.1. Extracción con hexano de β -caroteno.....	34
9.2. Extracción asistida con ultrasonido	34
11. Cuantificación de carotenoides totales	36
11.1. Análisis por espectroscopia ultravioleta (UV-vis) en los polvos de zanahoria	36
12. Determinación de color	37
13. Rendimiento total del extracto.....	38

14.	Cuantificación del contenido de β -caroteno por UHPLC fase reversa.....	38
15.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
15.1.	Obtención y acondicionamiento de las muestras.....	40
15.2.	Análisis fisicoquímico.....	41
15.3.	Análisis químico proximal de zanahoria liofilizada y secada en charola.....	41
15.4.	Análisis de color en polvos de zanahoria.....	42
15.5.	Cuantificación de carotenoides totales en ambos polvos de zanahoria.....	43
15.6.	Rendimiento del proceso de obtención en polvos de zanahoria.....	44
15.7.	Polvos obtenidos en el secado por liofilización y secado en charolas.....	45
15.8.	Análisis estadístico de las extracciones de β -caroteno a altas potencias.....	46
15.9.	Análisis estadístico de las extracciones de β -caroteno a bajas potencias.....	48
15.10.	Análisis de carotenos por UPLC-DAD-TOFMS.....	51
16.	REFERENCIAS.....	54
17.	ANEXOS.....	57
17.1.1.	Curva de calibración por espectrofotometría.....	57
17.1.2.	Curva de calibración realizada en HPLC.....	58
17.1.3.	Extracción de β -caroteno usando aceite de naranja.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Funciones saludables atribuidas a los carotenoides.....	19
Figura 2.	Principales carotenoides encontrados en las zanahorias.....	20
Figura 3.	Determinación de pH.....	27
Figura 4.	Determinación de concentración de sólidos totales ($^{\circ}$ Brix).....	28
Figura 5.	Diagrama de flujo del procesamiento de las zanahorias liofilizada.....	29
Figura 6.	Diagrama de flujo del procesamiento de las zanahorias secada en horno por convección.....	30
Figura 7.	Extracción de β -caroteno con hexano.....	34
Figura 8.	Zanahoria fresca.....	37
Figura 9.	A) Materia prima procesada (zanahorias), B) interior de las zanahorias.....	40
Figura 10.	Polvos de zanahoria A) Secado convectivo. B) Secado por liofilización.....	45

Figura 11. Cromatogramas de HPLC de la extracción β -caroteno a partir de zanahoria utilizando aceite de naranja y ultrasonido con diferentes condiciones. (T2): 60 W/cm ² y 10 min, (T7): 40 W/cm ² y 20 min) y (T9): 80 W/cm ² , 20 min.	48
Figura 12. Cromatogramas de HPLC de la extracción β -caroteno a partir de zanahoria utilizando aceite de naranja y ultrasonido con diferentes condiciones: T9(30 W/cm ² , 25 min), T10 (maceración con aceite de naranja), T11(extracción con hexano).	51
Figura 13. Cromatograma UPLC-DAD-MS representativo obtenido del análisis del extracto de carotenos asistido por ultrasonido con aceite de naranja como extractante.....	52
Figura 14. Curva de estándar de calibración de análisis de β -caroteno.	57
Figura 15. Curva de calibración realizada en HPLC.....	58
Figura 16. Extracciones de β -caroteno a partir de polvos de zanahoria (método de secado en charolas) utilizado como solventes aceite de naranja y hexano. A) Son los diferentes tratamientos (T ₁ a T ₁₀) con aceite de naranja y B) Tratamiento usando hexano (T ₁₁).	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Trabajos relacionados con el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido utilizando aceite como solvente no convencional.	22
Tabla 2. Diseño factorial usando potencias altas.....	35
Tabla 3. Diseño factorial usando potencias bajas.....	36
Tabla 4. Análisis fisicoquímico	41
Tabla 5. Composición química proximal de los polvos de zanahoria deshidratadas por liofilización y secado en charolas.....	42
Tabla 6. Evaluación de color medido en polvos de zanahorias y zanahoria fresca.....	43
Tabla 7. Concentración de β -caroteno en 100 g de polvo de zanahoria.....	43
Tabla 8. Rendimientos de ambos procesos de secado.....	44
Tabla 9. Análisis de varianza de dos vías para el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido y aceite de naranja utilizando potencias altas (40, 60 y 80 W).	46

Tabla 10. Concentraciones de β -caroteno (mg/g de biomasa) en los diferentes tratamientos utilizando el proceso de extracción con ultrasonido y aceite de naranja usando altas potencias*.....	47
Tabla 11. Resultados del proceso de extracción (mg de β -caroteno/g de biomasa) con hexano y aceite de naranja sin uso del ultrasonido.....	47
Tabla 12. Análisis de varianza de dos vías para el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido y aceite de naranja utilizando potencias bajas (10, 20 y 30 W).....	49
Tabla 13. Resultados de las concentraciones de β -caroteno en las extracciones con aceite de naranja usando bajas potencias.....	50
Tabla 14. Resultados del proceso de extracción (mg de β -caroteno/g de biomasa) con hexano y aceite de naranja sin uso del ultrasonido.....	50
Tabla 15. Datos obtenidos de la curva estándar de β -caroteno	57

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo para determinar porcentaje de humedad.....	31
Ecuación 2. Cálculo para determinar porcentaje de proteína.	31
Ecuación 3. Fórmula para calcular el contenido de grasa.	32
Ecuación 4. Fórmula para calcular el contenido de cenizas.	32
Ecuación 5. Calculo de β -caroteno.	36
Ecuación 6. Fórmula para el cálculo de color.....	37
Ecuación 7. Fórmula para calcular del rendimiento del extracto.	38

Resumen

En los últimos años, el consumo de zanahorias (*Daucus carota* L) y subproductos de estas ha aumentado debido a que su consumo se ha relacionado con un gran número de beneficios (actividad antioxidante y actividad anticancerígena, entre otras.) en la salud del ser humano. Son fuente importante de α -caroteno y β -caroteno, fibra dietética, provitamina A, E y C, además de tener minerales como: Ca, K, Mg, Fe, Cu y Zn. Estos compuestos son de gran importancia comercial para algunas industrias (Alimentaria, Cosmética, y Farmacéutica). Por esta razón actualmente es tema de atención en muchos trabajos de investigación enfocados en la búsqueda de nuevas tecnologías o métodos para la extracción de compuesto bioactivos, los cuales tienen que ser económicos, de fácil manejo, rápidos y sustentables. La extracción convencional se realiza usando solventes como; hexano, acetona, metanol, cloroformo y mezclas de estos en diferentes proporciones. Sin embargo, los procesos de extracción presentan muchas limitaciones técnicas. Las más importante son: gran cantidad de residuos tóxicos y pérdida o degradación de estos compuestos. En los últimos años se han evaluado distintos métodos o combinaciones de estos entre los cuales podemos encontrar métodos mecánicos, enzimáticos, por microondas o físicos. De estos el último método, puede que el ultrasonido ha sido uno de los métodos más utilizados, para la extracción o separación de un gran número de compuestos naturales (pigmentos, vitaminas, proteínas, polisacáridos, etc.) y en algunos procesos biotecnológicos. Este método presenta varias ventajas como; tiempos de extracción cortos, menor volumen de solvente, mayor rendimiento y calidad del extracto, en comparación con los métodos convencionales (disolventes orgánicos, CO₂ supercrítico). Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar un método no convencional (ultrasonido-aceite de naranja) para la extracción de β -caroteno a partir de una fuente convencional o modelo de estudio como lo son las zanahorias.

Las zanahorias fueron primero procesadas por dos métodos distintos (secado y liofilizado) para evaluar el rendimiento y calidad de los polvos obtenidos. Para ello se realizó su análisis químico proximal (AQP), fisicoquímico y se cuantificó el contenido total de carotenoides por espectrometría UV-vis. Posteriormente se realizó el proceso de extracción de β -caroteno por el método convencional (con hexano) y no convencional (ultrasonido-aceite de naranja).

Enseguida se realizó la cuantificación de β -caroteno de estos extractos por HPLC y UHPLCMS.

El análisis fisicoquímico de ambos lotes procesados (secado convectivo y liofilizado) no reflejo diferencia significativa entre el contenido total de sólidos solubles (7.47 y 7.66), pH (6.61 y 6.55) e índice de madurez (1.13 y 1.16). En el caso de la determinación de color el polvo obtenido por método de secado convectivo presento mejor coloración con respecto al liofilizado. El AQP de los polvos de zanahoria obtenidos por secado convectivo y liofilizado presentaron un contenido de humedad del de 14.13 y 11.37%, cenizas de 6.57 y 5.42 %, grasas de 2.21 y 4.08 % y proteínas de 4.19 y 3.81% (respectivamente). El contenido de β -Caroteno evaluado por espectrofotometría UV-vis en los polvos de zanahoria obtenidos secado convectivo y liofilizado fue de 28.455 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ y 1.237 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, lo cual reflejo que el método establecido por secado convectivo generó menor daño en el compuesto de interés. Posteriormente se establecieron dos métodos para la extracción de β -caroteno asistida con ultrasonido-aceite de naranja: 1) Extracción con alta potencia (40, 60 y 80 W/cm^2) y 2) Extracción con bajas potencias (10, 20 y 30 W/cm^2). Una vez obtenidos los extractos se cuantifico el contenido de β -caroteno por HPLC. El tratamiento 7 (40 W/cm^2 , 20 min) de 9 experimentos evaluados con el método 1, presento el mayor contenido de β -carotenos el cual fue de: 0.674 mg de β -caroteno/g de biomasa. Sin embargo, este valor fue similar al del control (0.632 mg de β -caroteno por g de biomasa) e inferior al método convencional con hexano (1.274 mg de β -caroteno por g de biomasa). Por esta razón se realizó esta experimentación utilizando bajas potencias. En donde el mejor tratamiento fue el experimento 9 con una concentración de 0. 721 mg de β -caroteno/g de biomasa (30 W/cm^2 y 25 min), en comparación con el proceso de extracción con hexano y control. En todos los cromatogramas de HPLC fue observado un pico antes de la señal de retención característica del β -caroteno. Debido a esto se decido evaluar el extracto por espectrometría de masas. Este análisis demostró que de acuerdo a la masa que presento el compuesto retenido antes del pico de β -caroteno fue identificado como α -caroteno.

Abstract

In the last years, the consumption of carrots (*Daucus carota L*) and subproductos of these has increased due to its consumption has been related to a large number of benefits (antioxidant activity and anticancer activity, among others.) in the health of the human. They are important source of α -carotene and β -carotene, dietary fiber, provitamin A, E and C, as well as having minerals such as Ca, K, Mg, Fe, Cu and Zn. These compounds are of great commercial importance for some industries (Foods, Cosmetics, and Pharmaceutical). For this reason, it is currently the subject of attention in many research works focused on the search for new technologies or methods for the extraction of bioactive compounds, which must be economical, easy to handle, fast and sustainable. Conventional extraction is done using solvents such as; hexane, acetone, methanol, chloroform and mixtures of these in different proportions. However, the extraction processes present many technical limitations. The most important are: large amount of toxic waste and loss or degradation of these compounds. In recent years, different methods or combinations of these have been evaluated, among which we can find mechanical, enzymatic, microwave or physical methods. Of these the last method, it may be that ultrasound has been one of the most used methods, for the extraction or separation of a large number of natural compounds (pigments, vitamins, proteins, polysaccharides, etc.) and some biotechnological processes. This method has several advantages such as; short extraction times, lower solvent volume, higher yield and extract quality, compared to conventional methods (organic solvents, supercritical CO₂). For this reason, the objective of this work was to evaluate and compare an unconventional method (ultrasound-orange oil) for the extraction of β -carotene from a conventional source or study model such as carrots.

The carrots were first processed by two different methods (drying and lyophilization) to evaluate the yield and quality of the powders obtained. For this purpose, its proximal chemical analysis (PCA), physicochemical analysis and the total carotenoid content were quantified by UV-vis spectrometry. Subsequently the extraction process of β -carotene was carried out by the conventional method (with hexane) and non-conventional (ultrasound-orange oil). The quantification of β -carotene from these extracts was then carried out by HPLC and UHPLCMS.

The physicochemical analysis of both batches processed (convective and lyophilized drying) did not reflect a significant difference between the total content of soluble solids (7.47 and 7.66), pH (6.61 and 6.55) and maturity index (1.13 and 1.16). In the case of the color determination, the powder obtained by the convective drying method showed a better coloration with respect to the lyophilization. The PCA of the carrot powders obtained by convective and lyophilized drying had a moisture content of 14.13 and 11.37%, ash of 6.57 and 5.42%, fat of 2.21 and 4.08% and protein of 4.19 and 3.81% (respectively). The content of β -Carotene evaluated by UV-vis spectrophotometry in the carrot powders obtained convective and lyophilized drying was 28,455 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ and 1,237 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, which reflects that the method established by convective drying generated less damage in the compound of interest.

Subsequently two methods were established for the extraction of β -carotene assisted with ultrasound-orange oil: 1) Extraction with high power (40, 60 and 80 W/cm^2) and 2) Extraction with low power (10, 20 and 30 W/cm^2). Once the extracts were obtained, the β -carotene content was quantified by HPLC. Treatment 7 (40 W/cm^2 , 20 min) of 9 experiments evaluated with method 1, showed the highest content of β -carotenes which was: 0.674 mg of β -carotene/g of biomass. However, this value was similar to that of the control (0.632 mg of β -carotene per g of biomass) and lower than the conventional method with hexane (1,274 mg of β -carotene per g of biomass). For this reason, this experiment was carried out using low power. Where the best treatment was the experiment 9 with a concentration of 0.721 mg of β -carotene/g of biomass (30 W/cm^2 and 25 min), in comparison with the extraction process with hexane and control. In all the chromatograms of HPLC it was observed a peak before the retention signal characteristic of the β -carotene. Because of this, I decide to evaluate the extract by mass spectrometry. This analysis showed that according to the mass which present the compound withheld prior to the peak of β -carotene was identified as α -carotene.

1. INTRODUCCIÓN

Algunos compuestos presentes en frutos, cereales o vegetales poseen propiedades funcionales o compuestos bioactivos, los cuales hoy en día han cobrado gran importancia en la industria de alimentos, farmacéuticos y cosméticos. Debido principalmente a su macro y micro nutrientes que proporcionan. Actualmente existen diferentes métodos utilizados para el proceso de obtención de compuestos bioactivos tales como: flavonoides, terpenos, componentes fenólicos, taninos, licopeno (Palou & Serra, 2000) y carotenoides (Li et al., 2013). Sin embargo, este tipo de técnicas de extracción convencionales tienen ciertas limitaciones y a pesar de esto, son ampliamente utilizadas a nivel industrial para recuperación o extracción de compuestos de interés comercial. El proceso de extracción sólido-líquido con disolventes es muy utilizado, pero genera gran cantidad de residuos químicos y tóxicos. Por lo cual, existe un creciente interés sobre nuevos métodos para el proceso de obtención de compuesto bioactivos, que no solo permitan obtener el compuesto de interés, sino que, además, sean fáciles, rápidos, menos costosos y amigables con el medio ambiente. Por esta razón se ha reportado varios trabajos de investigación (Belin and Gülaçar, 2007; Mustafa et al., 2012; Altemimi et al., 2015; Butnariu, 2016) en los cuales se buscan innovar e implementar nuevas tecnologías factibles para la extracción de dichos compuestos. Los avances recientes sobre diferentes métodos de extracción comparados con los métodos convencionales, resaltan mucho la eficiencia y viabilidad industrial del método de extracción asistida por ultrasonido. Incluso mejor que el método de extracción por microondas. Dentro de este nuevo esquema, se ha identificado un grupo químico que tiene la principal característica de actuar como antioxidante, como un grupo importante de estos compuestos bioactivos se encuentran los carotenoides, que sirven como supresores de superóxido O_2 (forma altamente reactiva) y como antioxidante en la prevención del daño de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERON).

Los carotenoides son un grupo muy numeroso de pigmentos presentes en vegetales y animales, producen colores que van desde al amarillo hasta el rojo intenso. Actualmente se han identificado más de 600 carotenoides en la naturaleza, y aproximadamente al año se sintetizan 100,000 toneladas de carotenoides de fuentes naturales.

Su importancia radica en que, a través de su consumo, los carotenoides pueden contrarrestar o prevenir la presencia de ciertas enfermedades como ciertos tipos de cáncer, prevención de enfermedades del corazón y degeneración macular. Sin embargo, los carotenoides pueden perder su actividad antioxidante, debido a concentraciones altas o presión parcial de oxígeno, la concentración de carotenoides e interacciones con otros antioxidantes por lo que pueden cambiar su actividad de antioxidante a prooxidante (Carranco et al., 2011). Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue establecer una alternativa para el proceso de extracción de β -caroteno de zanahorias mediante el uso de ultrasonido y aceite de naranja como solvente no convencional, para tratar de conservar las propiedades del extracto y hacer más eficiente el proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1. Zanahorias

La zanahoria (*Daucus carota* L) pertenece a la familia de las umbelíferas, también denominadas apiáceas es considerada como la especie más importante y de mayor consumo dentro de esta familia. Es una fuente rica de carotenoides y fibra dietética, resalta su importancia también como fuente de provitamina A, E y C, además de tener minerales como: Ca, K, Mg, Fe, Cu y Zn. El consumo de zanahoria y sus productos ha aumentado en los últimos años debido a su contenido de antioxidantes naturales, principalmente a su actividad anticancerígena que se le atribuyen al β -Caroteno (Sharma et al., 2012).

2.2. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos orgánicos liposolubles del grupo de los isoprenoides que se encuentran de forma natural en plantas y otros organismos fotosintéticos como algas o algunos hongos y bacterias fotosintéticas. Estos están constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos.

Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y las xantófilas que, si contienen oxígeno. Debido a su instauración los carotenoides presentan sensibilidad al oxígeno, calor, luz, metales, lipoxigenasas, y a los ácidos (Carranco et al., 2011).

Los carotenoides son fuente importante de micronutrientes para mantener la salud en el ser humano (Fig. 1). El contenido total de carotenoides de una zanahoria está en un rango de 6,000 a 54,800 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (Sharma et al., 2012), el contenido de carotenoides puede variar dependiendo del genotipo, manejo de cosecha, estado de madurez, operaciones de procesado y conservación (temperatura e intensidad de luz), el tipo de suelo y riego, la fertilización no afecta de manera significativa (Carranco et al., 2011).

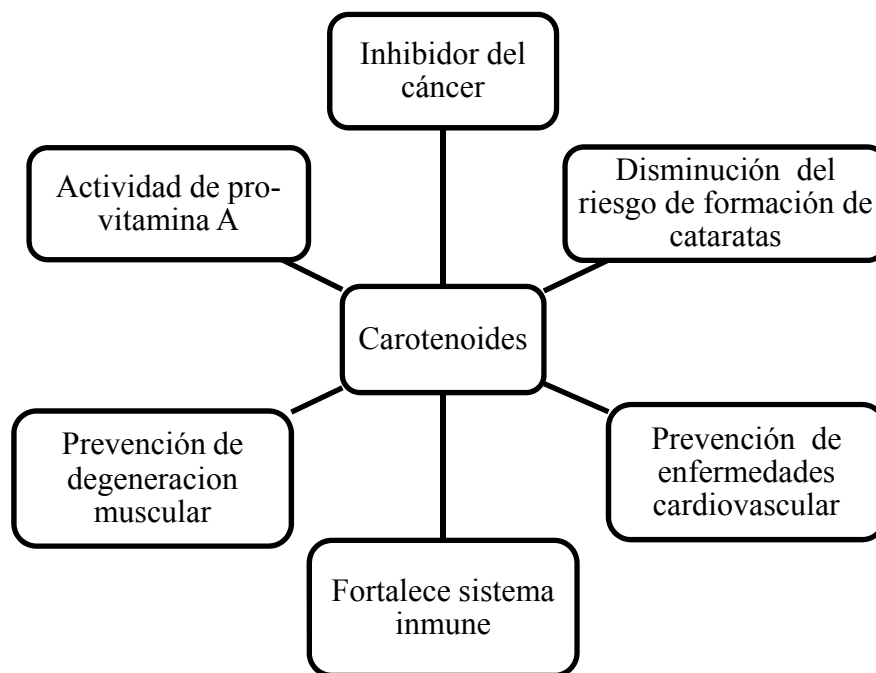


Figura 1. Funciones saludables atribuidas a los carotenoides.

(Sharma et al., 2012)

2.3. Fuentes, estructura y características químicas

Los extractos de carotenoides naturales más comunes se obtienen del achiote, el pimentón, azafrán, alfalfa, zanahoria, piel de cítricos y aceite de palma, piña, tomate, flores (como el cempasúchil y girasol), en algunos microorganismos (solo en condiciones extremas) y algunos animales, debido a su ingesta de carotenoides (Cavalcanti et al., 2013).

La estructura química básica de los carotenoides, consiste en ocho unidades isoprenoides con un sistema de dobles enlaces conjugados que da como resultado formas isoméricas muy comunes (Fig. 2). Además, sus dos dobles enlaces en la cadena de carbono hacen a los carotenoides susceptibles a algunas reacciones como la oxidación y la isomerización (cis-trans), debido sobre todo a la luz, el calor, los ácidos y oxígeno (Amorim et al., 2014).

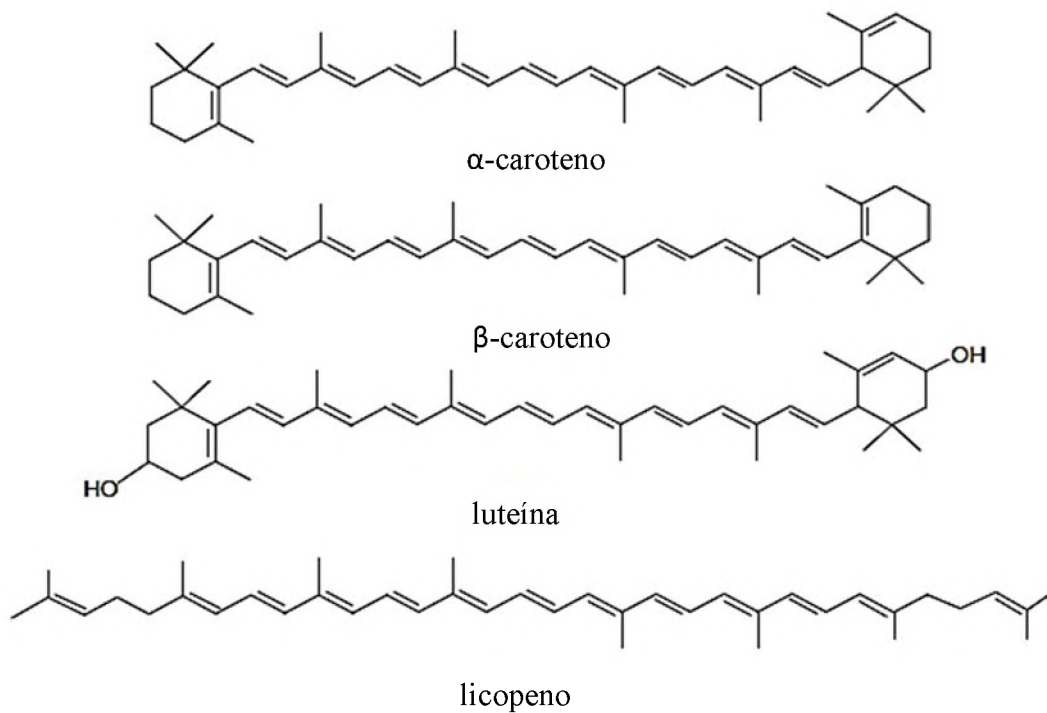


Figura 2. Principales carotenoides encontrados en las zanahorias.
(Tanumihardjo et al., 2016).

2.4. β -Caroteno

El β -Caroteno es un carotenoide, un grupo de pigmentos rojos, naranjas y amarillos. El β -Caroteno es una de las fuentes más utilizadas de pro-vitamina A, es la principal función nutricional del β -Caroteno, también se utiliza como colorante en diferentes productos como a base de grasa, en alimentos, en la industria farmacéutica, cosmética entre otras.

El β -Caroteno también actúa como antioxidante, como protector de los rayos UV, comunicador celular, y reduce el riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, y degeneración macular, (Cavalcanti et al., 2013).

2.5. Extracción de carotenoides con métodos convencionales y no convencionales

2.5.1. Métodos convencionales

Las técnicas de extracción convencionales a menudo están limitadas por las resistencias de transferencia de masa debido a la participación de más de una fase en el sistema. Estos métodos pueden requerir más tiempo, el alto consumo de energía también es una desventaja, los compuestos sensibles al calor se pueden dañar la calidad del extracto, y los procesos mecánicos tienen menos eficiencia y bajo rendimiento. Los disolventes orgánicos que son utilizados en la extracción química, son perjudiciales para la salud y el medio ambiente debido al uso de grandes cantidades de estos solventes (Shirsath et al., 2012).

2.5.2. Métodos no convencionales

Recientemente la aplicación de técnicas de ultrasonido ha atraído más atención. El ultrasonido es más eficiente debido que aumenta el rendimiento y la velocidad de transferencia de masa en varios procesos de extracción sólido-líquido. El mecanismo de intensificación del proceso de extracción se ha atribuido al fenómeno de cavitación que resulta en una intensa turbulencia y circulación del líquido en el sistema. La extracción asistida por ultrasonido (UAE por sus siglas en inglés) en el caso de la extracción de productos naturales se han reportado con éxito; por ejemplo, la extracción de la vainillina, aceites de almendra, extractos vegetales (hinojo, lúpulo, caléndula, menta), saponinas del ginseng, jengibre, proteína de soja, etc. (Shirsath et al., 2012).

Algunos trabajos recientes han reportado extracciones asistida por ultrasonido para la extracción de componentes bioactivos con el uso de disolventes, otros trabajos usan aceite como sustituto a disolventes orgánicos (tabla 1).

Tabla 1. Trabajos relacionados con el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido utilizando aceite como solvente no convencional.

Referencia	Producto	Artículo	Trabajo realizado
Li et al., 2013	β -Caroteno	Extracción de carotenoides asistida por el ultrasonido basado en el concepto de bio-refinería usando aceite de girasol como un solvente alternativo.	Se realizaron dos extracciones diferentes en las zanahorias, una con aceite de girasol como solvente y aplicando ultrasonido, y otra usando hexano como solvente. Se compararon ambas extracciones, y se obtuvo mayor rendimiento de β -caroteno usando aceite de girasol y el ultrasonido mejoro la extracción.
Kyriakopoulou et al., 2015	β -Caroteno (<i>Dunaliella salina</i>)	Técnicas de extracción para el análisis del ciclo de vida de β -caroteno	Se realizaron extracciones de β -caroteno de la microalga <i>Dunaliella salina</i> y zanahorias. Se realizó un análisis entre ambos métodos de extracción convencional con solvente, usando microondas y ultrasonido. La extracción en la microalga de β -caroteno usando ultrasonido tuvo mayor concentración de β -caroteno.
Spinella et al., 2015	Extracción de aceite	Extracción de aceite asistida por ultrasonido de granos de girasol alto esteárico alto oleico.	El uso del ultrasonido para la extracción sólido-líquido de aceite de las semillas de girasol, aumentó el rendimiento de aceite en un 92% en los primeros 30 minutos, respecto al método convencional con soxhlet.

2.5.3. Aceite esencial de naranja

El fruto de naranja no solo es aprovechado el jugo, sino que también se puede extraer aceite esencial de la cáscara, este puede extraerse a partir de las glándulas o vesículas secretoras de la cáscara, funciona como antidepresivo, sedante. Se utiliza en la industria de fármacos y como cosméticos porque limpia y revive la piel opaca, ayudando la eliminación de excesos de fluidos y toxinas, también es usado por sus propiedades germicidas, antioxidantes y anticáncerigenas en la producción de fármacos (Lawless, 1995). Los compuestos mayoritarios que se encuentran en el aceite de naranja son: limoneno (89.68%), monoterpenos (100%), β -mirceno (1.13%), linalool (0.59%), terpinoleno (0.4%), α -pineno (0.38%), sabineno (0.20%) (León et al., 2015).

3. JUSTIFICACIÓN

En la industria alimentaria se utilizan una gran gama y cantidad de colorantes con diferentes propósitos, principalmente para devolver el color o intensificarlo cuando se ha perdido durante el procesamiento del alimento. Los colorantes naturales son actualmente los más utilizados y dentro de estos destacan; los carotenoides, clorofilas, antocianinas, betalainas entre otros. El β -caroteno, además de ser utilizado como colorante, el consumo de este trae consigo propiedades benéficas en la salud (actividad antioxidante, anti-inflamatorio, hepatoprotector y propiedades contra el cáncer). Las zanahorias son alimentos modelos por su contenido de carotenoides las cuales presentan un alto contenido (6,000 a 54,800 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de sólidos totales) de estos compuestos bioactivos. Generalmente los carotenos se obtienen por extracción con solventes orgánicos. Sin embargo, el uso de estos solventes presenta inconvenientes tales como, residuos tóxicos, temperaturas para extracción elevada y deterioro de compuestos fitoquímicos. Es por esta razón que existen diferentes investigaciones enfocadas al uso y desarrollo de nuevas tecnologías que puedan subsanar este tipo de problemáticas. En los últimos años los métodos físicos como el ultrasonido ha sido uno de los métodos más utilizados para este fin. Este método de extracción presenta varias ventajas (menor tiempo de extracción, menor volumen de solvente, altos rendimientos y mejor calidad del extracto) comparado con los métodos convencionales (disolventes orgánicos, CO_2 supercrítico).

Dentro de las nuevas tecnologías para la extracción de compuestos naturales destaca el uso de ultrasonido como alternativa viable. Aunado a lo anterior, el uso de aceite de naranja (extraído de la cáscara) como solvente para el proceso de extracción de β -caroteno podría ser una alternativa ante el uso de otros solventes, debido a que no hay un trabajo reportado que utilice aceite de naranja como sustituto de disolventes usando ultrasonido para la extracción de β -Caroteno con la finalidad de mejorar o facilitar los procesos de extracción de algunos compuestos bioactivos. Esto podría contribuir también al aprovechamiento integral del cultivo de naranja, abundante en regiones cercanas (Martínez de la Torre, Veracruz) y al desarrollo sustentable del mismo.

4. HIPÓTESIS

El proceso de extracción de β -caroteno en zanahorias asistida por ultrasonido, y utilizando aceite de naranja como solvente permitirá generar un método alternativo para la extracción de estos compuestos, además de tener un mayor rendimiento de β -caroteno.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Extraer β -caroteno mediante el uso de ultrasonido y uso de aceite de naranja como solvente no convencional para el proceso de extracción.

5.2. Objetivos particulares

6.2.1 Realizar análisis químico proximal y físico de color de la materia prima.

6.2.2 Obtener β -caroteno usando hexano como solvente.

6.2.3 Obtener β -caroteno asistido por ultrasonido/aceite de naranja.

6.2.4 Evaluar el rendimiento de los extractos obtenidos por ambos métodos.

6.2.5 Evaluar el contenido de β -caroteno por espectrofotometría UV-VIS.

6.2.6 Evaluar el contenido de β -caroteno extraído por ambos métodos mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC).

6.2.7 Evaluar el contenido de α -caroteno extraído asistido por ultrasonido/aceite de naranja por espectrometría de masas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIALES

Materia prima

Las zanahorias (*Daucus carota L*) fueron adquiridas del centro de distribución (CEDIS) de Walmart ubicado en carretera Villahermosa Cárdenas Km 159, Tabasco.

7. Análisis físico y fisicoquímico de la materia prima

7.1.1. Análisis físico

Se realizó análisis físico a la zanahoria fresca el cual consistió en medir su tamaño, peso, color externo e interno y observar la forma que tenía cada una de ellas.

6.2.2 Análisis fisicoquímico

Determinación de pH

Se midió el pH de los jugos extraídos de zanahorias usando un potenciómetro digital (Marca: HANNA instrument), previamente calibrado con las soluciones buffer correspondientes (4,7 y 10), posteriormente se enjuago el electrodo con agua destilada, y se secó cuidadosamente, se introdujo el electrodo en cada muestra para leer el pH (Fig. 3). Las mediciones se realizaron por triplicado.



Figura 3. Determinación de pH.

Determinación de sólidos totales

Se determinó la concentración de sólidos totales con un refractómetro digital (Marca: Atago) a 25°C. El refractómetro se calibró colocando una gota de agua destilada, posteriormente se agregó el jugo de zanahoria en el refractómetro previamente filtrado y se leyó el contenido de sólidos totales por triplicado (Fig. 4).



Figura 4. Determinación de concentración de sólidos totales (°Brix).

Determinación de acidez titulable

Se determinó el porcentaje de acidez de acuerdo a la metodología establecida por la AOAC (2000) con el número de técnica 942.15. 37. 1. 37 en el jugo de zanahoria usando como reactivos hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, y fenolftaleína al 1% en alcohol como indicador y agua destilada. Se diluyeron 5 ml de jugo de zanahoria en 50 mL de agua destilada se añadió 1 gota de fenolftaleína y posteriormente se tituló con NaOH 0.01 N hasta que viro a color rosa.

7.2. Secado por liofilización

El primer paso consistió en lavar bien las zanahorias y posteriormente remover cuidadosamente la cáscara (Fig. 5), para esto se utilizó un pelador (marca: Ilko), enseguida las zanahorias fueron molidas utilizando 200 mL de agua destilada con ayuda de un

procesador de alimentos (Marca: Nutribullet, modelo NB-101B) por un tiempo de 3 min. Terminado el tiempo de molienda el producto se congelo a 4 °C para ser liofilizado (marca: Labconco y modelo: Freezone plus 4.5). Posteriormente los polvos de zanahoria fueron cernidos con un tamiz número 50 (0.300 mm), y almacenados en frascos color ámbar a una temperatura de -8 °C, para su posterior análisis (Zambrano et al., 2007 con modificaciones).

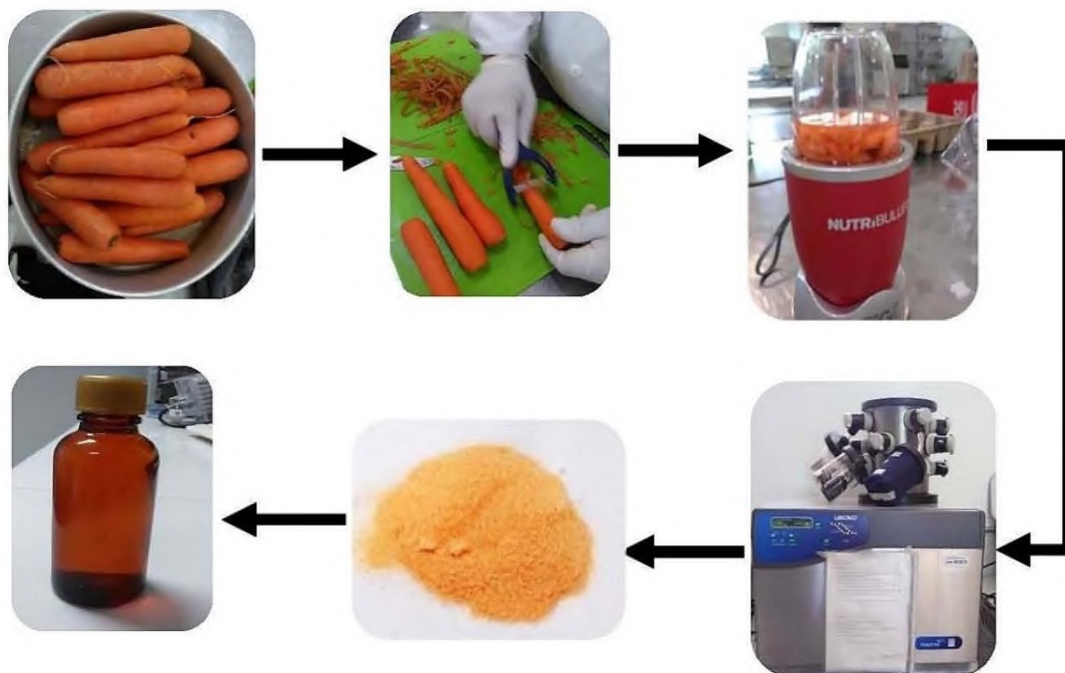


Figura 5. Diagrama de flujo del procesamiento de las zanahorias liofilizada.

7.3. Secado en charolas

El primer paso consistió en lavar bien las zanahorias y posteriormente remover cuidadosamente la cáscara, para esto se utilizó un pelador (marca: Ilko), posteriormente las zanahorias fueron cortadas en tiras con aproximadamente 1 mm de espesor, y fueron secadas en un horno secador (Marca: Scorpions Scientific modelo A:52040) a 40 °C por 24 horas. Terminado el tiempo de secado se molió en un procesador de alimentos (Marca: Osterizer) por 1 min. Posteriormente se usó un tamiz (marca: Fiicsa) número 50 (0.300 mm), para tamizar las zanahorias en polvo (Fig. 6). El polvo fue almacenado en frascos color ámbar, a una temperatura de 4°C (Hernández & Blanco., 2015 con modificaciones).

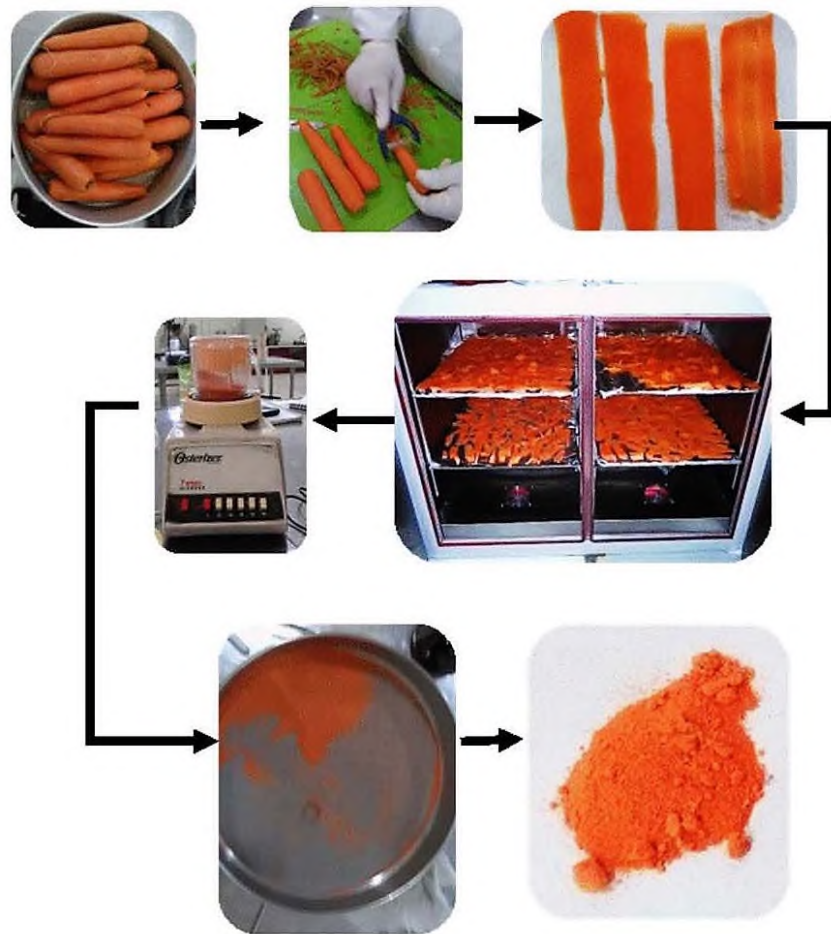


Figura 6. Diagrama de flujo del procesamiento de las zanahorias secada en horno por convección.

7.4. Análisis químico proximal en zanahorias

La caracterización química proximal de los polvos de zanahoria se realizó empleando la metodología propuesta por la AOAC (2000), consistió en la determinación del contenido de humedad, lípidos, cenizas, proteínas y fibra presentes en los polvos de zanahoria obtenidos en secado en charolas y secado por liofilización.

7.4.1. Humedad

Se determinó por el método oficial AOAC (2000), con el N^o de técnica 925.09. Se pesaron 0.5 g de muestra en charolas de aluminio (previamente puestas a peso constante), se colocaron en la estufa (Marca: Binder) a 100 ± 1 °C durante 3 h, posteriormente se enfriaron en un desecador por 15 min. Y finalmente se pesaron y se determinó la humedad por diferencia de peso (Ec. 1).

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Peso inicial de la muestra(g)} - \text{Peso final de la muestra(g)}}{\text{Peso inicial(g)}} \times 100$$

Ecuación 1. Cálculo para determinar porcentaje de humedad.

7.4.2. Proteína

Para determinar el contenido de proteína en los polvos de zanahorias se utilizó el método establecido por la AOAC (2000) con el N^o de técnica 920.87. Se pesó 40 mg de la muestra, se colocó en un tubo del equipo Micro Kjeldahl, se le adicionó 2 g de la mezcla catalizadora (HgO-K₂SO₄) y 3 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). El tubo se colocó en el equipo de digestión a una temperatura de 400 °C y se mantuvo en calentamiento hasta que la muestra se clarificó, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregó al tubo 10 mL de agua destilada e inmediatamente 13 mL de la mezcla de hidróxido de sodio y tiosulfato de sodio (NaOH 60% - Na₂SO₂O₃ 5%), estando ya preparado el tubo se colocó en el destilador; en la terminal del condensador se colocó un matraz Erlenmeyer con 25 mL de ácido bórico al 5% (H₃BO₃) con dos gotas del indicador de Wesslow, y se recolectaron 100 ml del destilado, el recolectado se tituló con una solución valorada de HCl al 0.01 N (el vire del color fue de verde a violeta tenue). Posteriormente se realizó el cálculo del contenido de proteína (Ec. 2).

$$\%N = \frac{(V_2 - V_1)(EqN)N}{M} \times 100$$

Ecuación 2. Cálculo para determinar porcentaje de proteína.

Donde:

%N = Porcentaje de nitrógeno total

V₁ = volumen de HCl gastado al titular el blanco (mL)

V_2 = volumen de HCl gastado en titular la muestra (mL)

EqN = peso molecular del nitrógeno (14.007)

N = normalidad del HCl (0.01)

M = peso de muestra (mg)

7.4.3. Lípidos

Para determinar el contenido de lípidos se utilizó el método oficial AOAC (2000) con el número de técnica 925.38. Se pesó 1 g de muestra seca, y se colocó en los cartuchos de celulosa, se tapó con un algodón. Posteriormente se colocó en el equipo Soxhlet (Marca PRENDO), se adicionaron 40 mL de éter de petróleo a los matraces de fondo plano del equipo y posteriormente se realizó la extracción por 4 h. Finalmente, los matraces se secaron en una estufa de vacío (Marca: SHEL-LAB, modelo 1425) a $60 \pm 1^\circ \text{C}$ por 1 h y se pesaron para determinar el porcentaje de lípidos (Ec. 3)

$$\% \text{ Extracto etéreo} = \frac{\text{Peso final del vaso(g)} - \text{Peso inicial del vaso(g)}}{\text{Peso de la muestra en base seca(g)}} \times 100$$

Ecuación 3. Fórmula para calcular el contenido de grasa.

7.4.4. Cenizas

Se determinó el contenido de cenizas siguiendo el método de la AOAC (2000) con el No de técnica 945.46. En un crisol a peso constante, se pesó 1 g de muestra; se colocó el crisol con muestra en una parrilla y se calcinó lentamente hasta que dejó de desprender humo, evitando que se proyectara fuera del crisol. El crisol se colocó en la mufla (Marca: WISETHERM, Modelo FH-14) y se efectuó la calcinación completa a $550 \pm 1^\circ \text{C}$ por 5 horas. Se dejó enfriar en la mufla, y se transfirió al desecador, se pesó el crisol con cenizas, posteriormente se determinó el contenido de cenizas en la muestra (Ec. 4).

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{\text{Peso del residuo(g)}}{\text{Peso de la muestra en base seca(g)}} \times 100$$

Ecuación 4. Fórmula para calcular el contenido de cenizas.

7.4.5. Fibra dietética total

Se determinó el contenido de fibra dietética total siguiendo el método AOAC (2000) con el número de técnica 985.29. Se pesó 1 g de muestra desengrasada y se colocó en un vaso de precipitado para fibra, se adiciono 50 mL de tampón fosfato de pH 6 a cada vaso más 0.1 mL de α -amilasa, posteriormente se colocaron los vasos en baño María a 100 °C y se cubrieron con papel aluminio.

Se agitaron los vasos en intervalos de 5 min por 15 minutos a 95 °C y se enfrió a temperatura ambiente.

Se ajustó el pH a 7.5 ± 0.2 adicionando 10 mL de NaOH 0.027 N en cada vaso o con HCL. Se realizó una solución de proteasa (50 mg/mL) de tampón fosfato y se pipeteo 0.5 mg/0.1 mL de esta solución en cada vaso. Se taparon los vasos de precipitado con papel aluminio y se colocaron en baño María a una temperatura de 60 °C con agitación continua por 30 minutos y enfriar a temperatura ambiente.

Se ajustó el pH A 4-4.6 adicionando 10 mL de 0.325 de HCL a cada vaso si es necesario agregar NaOH. Se taparon los vasos con papel aluminio nuevamente y se colocaron en baño María a 60 °C con agitación continua se incubaron por 30 minutos, y se añadió 4 volúmenes de etanol al 95% y se dejó en reposo toda la noche para que se precipitara. Posteriormente se filtró y se distribuyó con 0.5 g celite.

8. Curva de calibración por espectrofotometría UV-vis

Se realizó la curva de calibración, se utilizó un estándar de β -caroteno grado analítico (95% de pureza), de Sigma-Aldrich, se determinó la absorbancia óptica de cada una de las muestras a una longitud de 450 nm, usando como blanco hexano.

Se siguió la metodología de Contreras-Villar (2004), para realizar la curva estándar, se preparó una solución equivalente 0.5 mg de β -caroteno/mL, a partir de esta se preparó una segunda solución de 20 μ g por mL, tomando 2 mL de la solución patrón 1, y se afora a 50 mL.

Se construyó la curva con las siguientes concentraciones, 0,5 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 1,5 μ g/mL y 2,0 μ g/mL, 2.5 0 μ g/mL, 3 0 μ g/mL.

9. Extracción de β -caroteno

9.1. Extracción con hexano de β -caroteno.

Se utilizaron 4 g de polvo de zanahoria que fueron obtenidos en dos métodos de secado 1) secado por liofilización, 2) secado en charolas, se le agregó 20 mL de hexano y se dejó en agitación por una hora a temperatura ambiente.

Las mezclas se filtraron al vacío a través de papel WATMAN N°1, mientras que el residuo sólido se volvió a extraer con hexano dos veces más bajo las mismas condiciones (Fig. 7). Después de la extracción, el hexano se evaporó en un evaporador rotatorio (Marca: Buchi, modelo R-210) (Li et al., 2013).

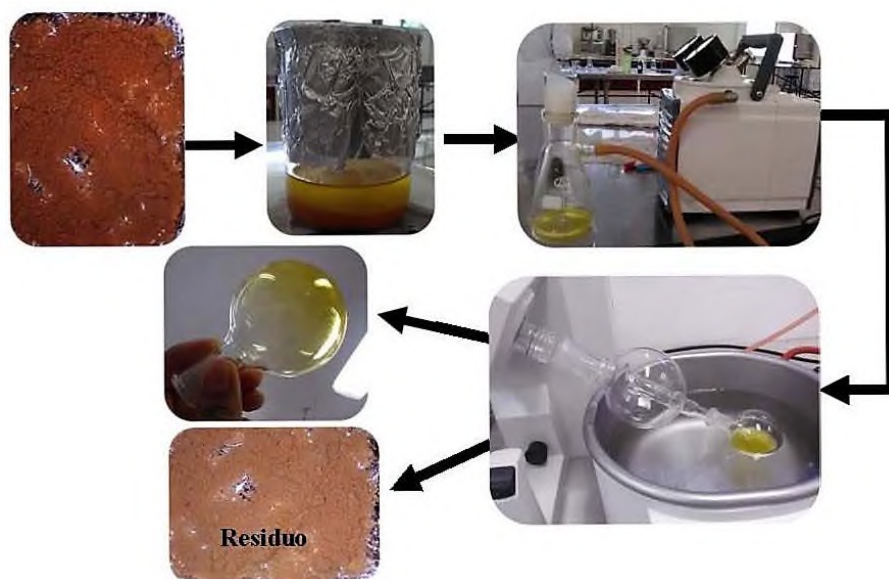


Figura 7. Extracción de β -caroteno con hexano.

9.2. Extracción asistida con ultrasonido

Se usaron 4 g de polvo de zanahoria y se le agregó 20 mL de aceite de naranja con BHT (Butil-Hidroxil Tolueno) al 0.03%, la mezcla se homogenizó previamente y posteriormente se sonó con un baño de agua fría siguiendo las condiciones del diseño factorial propuesto. Todas las muestras fueron filtradas usando papel WATMAN N°1, las muestras se guardaron en frascos color ámbar a una temperatura de 4 °C para posteriormente ser analizadas por

UPLC-DAD-MS (modelo ACQUITY ARC UHPLC C18, marca: WATERS) para obtener el tratamiento con mayor contenido de β -caroteno.

10. Diseño factorial

Se probaron dos diseños factoriales de 3 variables con 3 niveles, un diseño usando altas potencias (Tabla 2) y en el otro diseño usando bajas potencias (tabla 3), para encontrar las condiciones a las cuales se obtiene mayor contenido de β -caroteno. Se evaluaron por separado cada método (convencional y no convencional). La variable de interés fue el contenido de β -caroteno extraído en cada método. Se consideran 2 factores en el método asistido por ultrasonido, intensidad ultrasónica (UI por sus siglas en inglés) y tiempo de sonicación (t), con 3 repeticiones, se abreviará T₁ para el tratamiento 1, T₂ para el tratamiento 2 y así sucesivamente hasta el tratamiento T₉, T₁₀ para el control de las extracciones con aceite de naranja-ultrasonido (aceite de naranja y polvo de zanahoria sin sonicar) y T₁₁ para la extracción usando hexano. Se uso un nivel de confianza del 95%, y fue analizado usando el programa Minitab 17.

Tabla 2. Diseño factorial usando potencias altas.

Tiempo (min)	Intensidad ultrasónica (UI)		
	40	60	80
	Temperatura constante con celda de flujo enchaquetada 40° C		
10	T ₁	T ₂	T ₃
15	T ₄	T ₅	T ₆
20	T ₇	T ₈	T ₉

Tabla 3. Diseño factorial usando potencias bajas.

Tiempo (min)	Intensidad ultrasónica (UI)		
	10	20	30
	Temperatura constante con celda de flujo enchaquetada 40° C		
15	T ₁	T ₂	T ₃
20	T ₄	T ₅	T ₆
25	T ₇	T ₈	T ₉

11. Cuantificación de carotenoides totales

11.1. Análisis por espectroscopia ultravioleta (UV-vis) en los polvos de zanahoria

El contenido de carotenoides total se realizó siguiendo la metodología de Burgos & Calderón., 2009, la determinación se realizó en el taller de alimentos de la Universidad del Papaloapan, utilizando una celda de cuarzo de 1 cm y un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis a 450 nm para β-caroteno en cada extracto, contra el disolvente el n-hexano utilizado como blanco, y se calcularon los µg de β-caroteno equivalente/100 g (Ec. 5).

$$\mu\text{g de } \beta\text{-caroteno} \frac{\text{equiv}}{100} \text{ g} = \left(\frac{A \times V \times 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} \times 100 \times P_{\text{mx}}(\text{g})} \right)$$

Ecuación 5. Calculo de β-caroteno.

A= Absorbancia de la muestra

V= Volumen total del extracto (mL)

A_{1cm}^{1%}= Coeficiente de absortividad del β-caroteno (2500)

Pmx=Peso de la muestra en gramos

12. Determinación de color

La determinación de color se realizó en el laboratorio de ingeniería de alimentos en el Instituto Tecnológico de Tuxtepec. Se colocaron aproximadamente 5 g muestra en una celda de cuarzo, se realizaron las lecturas por triplicado en el colorímetro Ultra-Scan Vis Hunter Lab, en la escala referencia se determinaron los parámetros L (luminosidad), a (-a=verde, a=rojo), y b (-b=amarillo, b=azul) en el sistema Hunter. También se analizó la zanahoria fresca esta se cortó en un cuadrado y se analizaron las caras de este (Fig. 8). A partir de las lecturas se calcularán los siguientes parámetros: diferencia de luminosidad (ΔL), diferencia neta de color (ΔE), tonalidad (H), claridad, croma o pureza de color (C) (Ec. 6):

$$H = \arctan b/a$$

$$C = (a^2 + b^2)^{0.5}$$

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{0.5}$$

$$(\Delta L) = L_{\text{muestra}} - L_{\text{estándar}}$$

$$(\Delta a) = a_{\text{muestra}} - a_{\text{estándar}}$$

$$(\Delta b) = b_{\text{muestra}} - b_{\text{estándar}}$$

Ecuación 6. Fórmula para el cálculo de color

Donde:

$L_{\text{estándar}}$, $a_{\text{estándar}}$ y $b_{\text{estándar}}$ son las lecturas de referencia de la muestra al tiempo cero.



Figura 8. Zanahoria fresca.

13. Rendimiento total del extracto

Para calcular el rendimiento de cada extracto, se tomaron muestras después de la extracción por ultrasonido y por el método usando hexano, las muestras se filtraron. El extracto se colocó en crisoles a peso constante y se secaron en un horno de aire caliente posteriormente los crisoles se enfriaron en un desecador y fueron pesados para calcular el rendimiento total de extracto (Ec. 7).

$$\% \text{ rendimiento total de extracto} = \frac{\text{obtención total de extracto (g)}}{\text{cantidad de zanahoria usada (g)}} \times 100$$

Ecuación 7. Fórmula para calcular del rendimiento del extracto.

14. Cuantificación del contenido de β -caroteno por UHPLC fase reversa

Preparación de las muestras.

Las extracciones con aceite de naranja se prepararon con 20 μL de extracto y con 980 μL de una mezcla metanol: acetonitrilo (50:50), las muestras fueron filtradas usando un filtro de teflón, y posteriormente inyectadas en el HPLC junto con el blanco (aceite de naranja y mezcla de metanol: acetonitrilo).

La extracción hecha con hexano se preparó usando aceite de naranja, el hexano fue evaporado para obtener solo el β -caroteno, posteriormente la muestra fue diluida en aceite de naranja esto con el fin de tener la misma matriz y posteriormente se analizó en el UHPLC para conocer la concentración de β -caroteno. Las muestras fueron analizadas en el HPLC bajo condiciones muy específicas (Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones usadas en HPLC para el procesamiento de las muestras.

Cromatógrafo	Acquity Arc, Waters
Detector	Arreglo de fotodiodos
Fases móviles	Fase A: Acetonitrilo Fase B: Metanol
Separación en gradiente	0 min 50 % A, 50 % B 0 → 4 min 50 % A, 50 % B 4 → 6 min 90 % A, 10 % B
Flujo	0.4 mL/min
Volumen de inyección	1 µL
Columna	Acquity BEH C18 (150 mm x 2.1 mm, 1.6 µm) Waters
Temperatura de columna	40 °C
Detección	450 nm; ventana espectral 200 – 600 nm

15. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

15.1. Obtención y acondicionamiento de las muestras

La materia prima fue procesada por dos métodos de secado diferentes a) Liofilizado y b) Secado en charolas. Antes de ser procesada la materia prima fue analizada, se calculó el índice de madurez (1.16 y 1.13 respectivamente), para conocer si las zanahorias tenían condiciones para ser procesadas. Se realizó un análisis físico a las zanahorias para saber si cumplían con la norma de calidad (NMX-FF-024-1982) y que se trataba de una sola variedad. Las zanahorias tuvieron un diámetro de hombros de ± 4 cm, agudizándose uniformemente hacia las puntas, con una longitud de 20 cm ± 1 cm y con un peso aproximado de 160 g ± 10 g. Externamente las zanahorias presentaron un color anaranjado fuerte, sin hombros verdes y buena firmeza. La epidermis fue lisa sin presencia de raicillas y su interior presentó un color anaranjado homogéneo (Fig. 9), este análisis físico de las zanahorias nos confirmó que las zanahorias cumplían con los requisitos de la norma mexicana (NMX-FF-024-1982). Además, que se trabajó con una sola variedad de zanahoria (Chantenay).



Figura 9. A) Materia prima procesada (zanahorias), B) interior de las zanahorias.

15.2. Análisis fisicoquímico

En la tabla 5 se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos realizados a los dos lotes de zanahorias usadas para secado en charolas y para el secado usando liofilización. Ambos lotes no presentaron diferencia significativa ($p=0.05$) en cuanto al contenido total de sólidos, pH, índice de madurez, % de acidez titulable, esto quiere decir que debido que ambos lotes no presentaron diferencia significativa fueron adecuados para su procesamiento.

Tabla 5. Análisis fisicoquímico

Lote	Contenido total de sólidos solubles (°Brix)	pH	Índice de madurez	% de acidez titulable
Zanahorias usadas para liofilización	$7.66^a \pm 0.208^a$	$6.51^b \pm 0.030^a$	$1.16^c \pm 0.030^a$	0.04 ± 0.01^a
Zanahorias usadas en el secado por convección	$7.47^a \pm 0.150^a$	$6.55^b \pm 0.008^a$	$1.13^c \pm 0.023^a$	0.05 ± 0.01^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística ($p<0.05$) con la prueba Tukey.

15.3. Análisis químico proximal de zanahoria liofilizada y secada en charola

La composición proximal de los polvos de zanahorias se presenta en la tabla 6. Los polvos obtenidos por secado en charola presentaron una mayor humedad ($14.13\% \pm 0.16$) que los polvos obtenidos por liofilización ($11.37\% \pm 0.40$), Gazalli et al, (2013) y Shyamala & Jamuna., (2010) reportaron un porcentaje de humedad del 8.78 y 7.54 respectivamente en polvos de zanahoria de la misma variedad, sin embargo, el contenido de humedad alto puede deberse al método de secado al igual que a la manipulación de las muestras durante el tamizado que se pudieron haber hidratado. Respecto al contenido de cenizas los polvos obtenidos por secado en charola presentaron un mayor contenido ($6.57\% \pm 0.02$) Gazalli et al, (2013) y Shyamala & Jamuna., (2010) los cuales reportaron un porcentaje de cenizas de 5.05 y 5.78% respectivamente, el contenido de cenizas es mayor de los valores reportados, y del obtenido en el secado por liofilización. El contenido de grasa (extracto etéreo) es de

2.21%, es menor a lo reportado por Gazalli et al (2013) y Shyamala & Jamuna, (2010) los cuales reportaron un porcentaje de grasa de 2.43 y 2.72% respectivamente, el contenido bajo de grasa podría presentar una ventaja porque las muestras no corren riesgo de enranciamiento. El contenido de fibra es similar a la biografía reportada Hernández & Blanco., 2015, de los polvos de zanahorias obtenidos por deshidratación por aire forzado (7.89%),

Tabla 6. Composición química proximal de los polvos de zanahoria deshidratadas por liofilización y secado en charolas.

Método de secado	*Humedad (%)	*^bCenizas (%)	*^bGrasa (%)	*^{b,c}Proteína (%)	Fibra (%)
ZSC	14.13 ± 0.16 ^a	6.57± 0.02 ^a	2.21 ± 0.13 ^b	4.19 ± 0.27 ^a	7.79 ± 0.07 ^a
ZL	11.37 ± 0.40 ^b	5.42 ±0.09 ^b	4.08 ± 0.28 ^a	3.81 ± 0.27 ^b	7.81 ± 0.07 ^a

*Promedio de tres repeticiones ± error estándar. ZSC: zanahorias secado en charolas, ZL: zanahoria secada por liofilización.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (p<0.05) con la prueba Tukey. ^bBase seca, °N x 5.7

15.4. Análisis de color en polvos de zanahoria.

Se evaluaron los parámetros de L, a* y b* de los polvos de zanahoria obtenidos por liofilización y secado en charola y fueron comparados con la zanahoria fresca para conocer si hubo pérdida de color durante el proceso de secado de ambos métodos (Tabla 7). En el parámetro luminosidad los polvos de zanahoria obtenidos por liofilización (71.89 ± 0.63) presentaron menos coloración que los polvos de zanahoria obtenidos usando secado en charolas, esto quiere decir que usando el método de secado en charola hay menor pérdida de color (67.66 ± 0.31), y la luminosidad del secado en charolas corresponden a lo reportado por Almeida & Zambrano, (2007) para polvos de zanahoria. El parámetro a* que representa el color que van de rojo/verde, los polvos de secado en charola presentaron mejor color (32.51 ± 0.35) que las zanahorias liofilizadas (14.17 ± 0.14), debido que el color es una medida indirecta para apreciar el contenido de carotenoides se puede decir que el secado en charola

fue mejor para obtener los polvos de zanahoria. El parámetro b* representa las coordenadas cromáticas que va de amarillo/-azul no hubo diferencia significativa entre ambos métodos de secado.

Tabla 7. Evaluación de color medido en polvos de zanahorias y zanahoria fresca.

Muestras	L	a*	b*
Zanahoria fresca	56.28 ± 1.25 ^c	33.99 ± 0.86 ^a	44.32 ± 3.17 ^a
Liofilizado	71.89 ± 0.63 ^a	14.17 ± 0.14 ^c	29.05 ± 0.47 ^b
Secado en charolas	67.66 ± 0.31 ^b	32.51 ± 0.35 ^b	32.11 ± 0.42 ^b

*Promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras diferentes en una misma columna indican diferencia estadística (p<0.05) con la prueba Tukey

15.5. Cuantificación de carotenoides totales en ambos polvos de zanahoria

Se realizó la cuantificación de los carotenoides totales presentes en ambos polvos de zanahoria por espectrofotometría UV-vis usando el método de Burgos & Calderón, (2009). A continuación, se presentan los resultados obtenidos µg de β-caroteno equivalente/100 g, usando el coeficiente de extinción molar de 2500 del β-caroteno.

Tabla 8. Concentración de β-caroteno en 100 g de polvo de zanahoria.

Polvos de zanahoria	µg β-caroteno/100g
Liofilizado	14.461 ± 0.25
Secado en charolas	308.052 ± 0.58

Se obtuvo un mayor contenido de β-caroteno con el método de secado en charolas que usando liofilización esto puede deberse que las zanahorias se dañaron al momento de ser congeladas para liofilizarlas debido que el congelamiento se realizó de manera lenta, esto provocó que los cristales formados dañaron las células y al β-caroteno, debido que se necesitaron varios días para obtener los polvos de zanahoria.

15.6. Rendimiento del proceso de obtención en polvos de zanahoria.

Se calculo el rendimiento de ambos métodos de secado, el secado por liofilización tuvo un rendimiento de 81.26% y procesando las zanahorias para obtener polvos usando el secado en charola se obtiene un rendimiento de 79.73%, se obtuvo un rendimiento similar en ambos métodos de secado esto quiere decir que se puede usar ambos métodos para obtener polvos de zanahoria, sim embargo, conviene usar el secado en charolas, debido que es un método más rápido, más fácil y económico para obtener los polvos de zanahoria (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimientos de ambos procesos de secado.

Polvos de zanahoria	Rendimiento (%)
Liofilizado	81.26 ± 0.36
Secado en charolas	79.73 ± 0.38

15.7. Polvos obtenidos en el secado por liofilización y secado en charolas

En la figura 10 se presentan los polvos obtenidos en ambos métodos de secado, se puede apreciar que los polvos obtenidos por secado en charola son más intensos que los obtenidos usando liofilización, puede deberse que el proceso de liofilización requirió varios días y esto afectó el color de los polvos, así como posiblemente el contenido de β -caroteno, debido que presentaron un olor a rancio y su color se deterioró aún más en los siguientes días a diferencia de los polvos obtenidos por secado en charola, su color permaneció hasta un mes esto bajo condiciones de almacenamiento de sellado al vacío, a una temperatura de $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ para ambos polvos durante 1 mes.

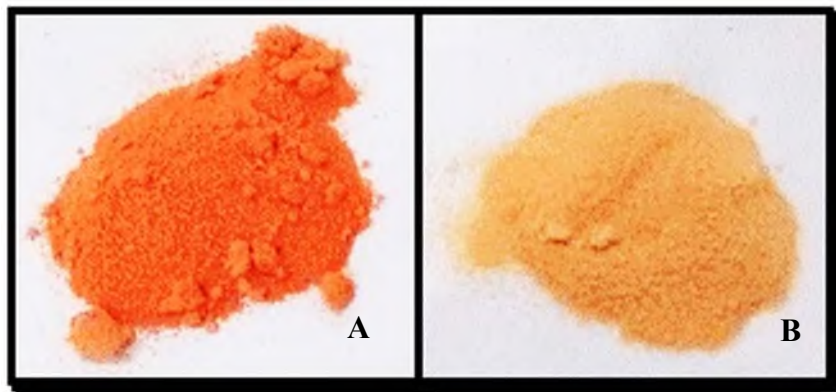


Figura 10. Polvos de zanahoria A) Secado convectivo. B) Secado por liofilización

15.8. Análisis estadístico de las extracciones de β -caroteno a altas potencias.

En la tabla 8 se muestra el ANOVA de dos vías obtenido en MINITAB 17 donde se observa que al menos un tiempo, una potencia y una interacción causa un efecto diferente en el diseño experimental propuesto para las extracciones. El diseño tiene un coeficiente de correlación de 98.90%, y una desviación estándar de 0.0225325 por lo que podemos confiar en el diseño de experimentos (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis de varianza de dos vías para el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido y aceite de naranja utilizando potencias altas (40, 60 y 80 W).

Fuente de variación	Gd	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados Medios	F	P
Tiempo (X_1)	2	0.054819	0.027409	53.99	0.000
Potencia (X^2)	2	0.128436	0.064218	126.48	0.000
Interacción	4	0.640090	0.160022	315.18	0.000
Error	18	0.009139	0.000508		
Total	26	0.832484			

$$S = 0.0225325 \quad R\text{-Sq} = 98.90\% \quad R\text{-Sq(adj)} = 98.03\%$$

En la tabla 11 se muestran los resultados de las concentraciones de β -caroteno presentes en las extracciones, el tratamiento 7 (40 W/cm², 20 min) fue la extracción con mayor contenido de β -caroteno (0.674 mg de β -caroteno/g de biomasa), sin embargo, no supero a el control (0.632 mg de β -caroteno por g de biomasa) y a la extracción con hexano (1.274 mg de β -caroteno por g de biomasa), debido que estos fueron más altos (Tabla 12). Las altas potencias y el tiempo prolongado degradaron al β -caroteno al mismo tiempo que este se extraía.

Sin embargo el contenido de β -caroteno fue mayor a la bibliografía reportada por Olives et al., 2006, uso dos variedades de zanahoria (Nantesa y Monkum) y uso una mezcla de Hexano:acetona (50:50) obtuvo 0.096 y 0.630 mg de β -caroteno/g de biomasa respectivamente. Tsukakoshi et al., 2009 uso la variedad japonesa y utilizo una mezcla de n-hexano:acetona:etanol:tolueno (10:7:6:7), y obtuvo 0.062 mg de β -caroteno/g de biomasa. Biswas et al., 2011 probó 4 solventes (acetona, acetonitrilo, metanol, éter di etílico) usando

la variedad roja de zanahoria y obtuvo 0.098, 0.0414, 0.0288 y 0.0786 mg de β -caroteno/g de biomasa respectivamente.

Tabla 11. Concentraciones de β -caroteno (mg/g de biomasa) en los diferentes tratamientos utilizando el proceso de extracción con ultrasonido y aceite de naranja usando altas potencias.

Factor X ₁ . Tiempo (min)	Factor X ₂ . Potencia (W/cm ²)		
	40	60	80
	40 °C temperatura constante con celda de flujo enchaquetada.		
10	T ₁ 0.479 ± 0.009 ^C	T ₂ 0.551 ± 0.004 ^B	T ₃ 0.500 ± 0.004 ^D
15	T ₄ 0.462 ± 0.005 ^E	T ₅ 0.472 ± 0.004 ^E	T ₆ 0.590 ± 0.016 ^B
20	T ₇ 0.674 ± 0.007 ^A	T ₈ 0.354 ± 0.005 ^F	T ₉ 0.484 ± 0.022 ^E

*Los valores son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$). Los resultados son el rendimiento de cada tratamiento expresado en mg de β -caroteno por g de biomasa.

Tabla 12. Resultados del proceso de extracción (mg de β -caroteno/g de biomasa) con hexano y aceite de naranja sin uso del ultrasonido.

T ₁₀ (mg de beta caroteno/g de biomasa)	T ₁₁ (mg de beta caroteno/g de biomasa)
0.632 ± 0.009	1.274 ± 0.017

T₁₀= Extracción con hexano. T₁₁= Extracción solo en maceración.

Las muestras se realizaron por triplicado.

Concentración: mg de beta caroteno por g de biomasa.

El análisis por HPLC se realizó para evaluar y comparar el contenido β -caroteno obtenido por el método de extracción convencional (con hexano) y el alternativo (aceite de naranja-ultrasonido).

En la figura 11 se presentan los cromatogramas de las muestras sometidas al proceso de extracción con ultrasonido y aceite de naranja como solvente: T₂(60 W/cm², 10 min), T₇(40 W/cm², 20 min), T₉(80 W/cm², 20 min), de estos 3 tratamientos se observa que T₇ presenta un mayor contenido de β-caroteno (0.674 mg/g de biomasa) debido que la extracción se realizó con una potencia más baja que las demás, debido que se observó que las potencias altas dañan al β-caroteno.

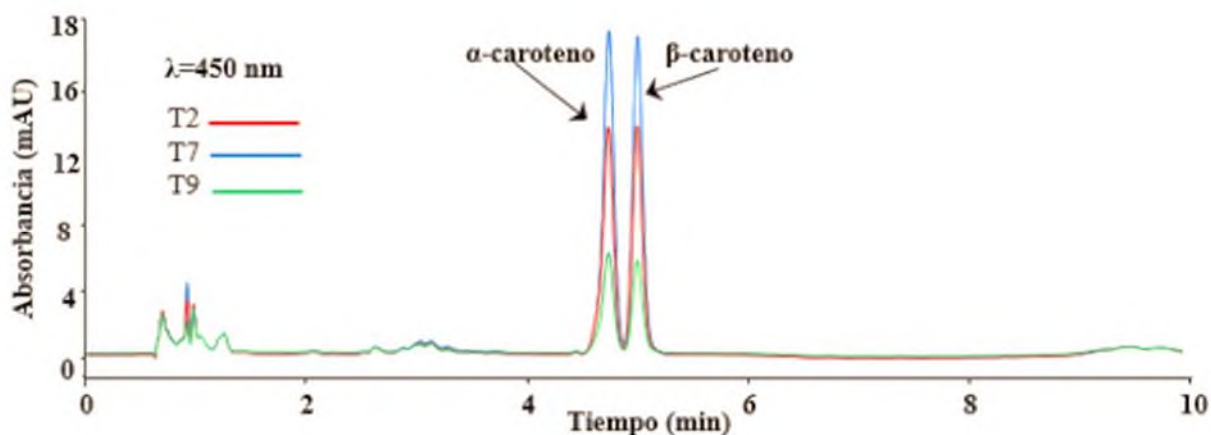


Figura 11. Cromatogramas de HPLC de la extracción β-caroteno a partir de zanahoria utilizando aceite de naranja y ultrasonido con diferentes condiciones. (T₂): 60 W/cm² y 10 min, (T₇): 40 W/cm² y 20 min) y (T₉): 80 W/cm², 20 min.

15.9. Análisis estadístico de las extracciones de β-caroteno a bajas potencias.

En la tabla 13 se muestra el ANOVA de dos vías obtenido en MINITAB 17 donde se observa que al menos un tiempo, una potencia y una interacción causa un efecto diferente en el diseño experimental propuesto para las extracciones. El diseño tiene un coeficiente de correlación de 97.94%, y una desviación estándar de 0.0170709, por lo que podemos confiar en el diseño de experimento.

Tabla 13. Análisis de varianza de dos vías para el proceso de extracción de β -caroteno con ultrasonido y aceite de naranja utilizando potencias bajas (10, 20 y 30 W).

Fuente de variación	Gd	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados Medios	F	P
Tiempo (X_1)	2	0.037689	0.018845	64.67	0.000
Potencia (X^2)	2	0.199909	0.099954	343.00	0.000
Interacción	4	0.012201	0.003050	10.47	0.000
Error	18	0.005245	0.000291		
Total	26	0.255044			

$$S = 0.0170709 \quad R\text{-Sq} = 97.94\% \quad R\text{-Sq}(\text{adj}) = 97.03\%$$

En la figura 12 se muestran los cromatogramas de los 3 mejores rendimientos del proceso de extracción. El mejor rendimiento fue T₉, esta extracción supero casi al 100% a la extracción solo con maceración y a la extracción usando hexano.

Los resultados usando bajas potencias y modificando el tiempo de sonicación se muestra en la tabla 14, los resultados fueron favorables usando una potencia de 30 W/cm² y un tiempo de 25 min, en estas condiciones se obtuvo el mayor contenido de β -caroteno (0.721 mg de β -caroteno/g de biomasa) usando ultrasonido para el proceso de extracción. Este proceso supero la extracción usando hexano (0.415 mg de β -caroteno/g de biomasa) y al control (aceite de naranja más zanahoria en polvo sin uso del ultrasonido) (0.394 mg de β -caroteno/g de biomasa), ambos procesos de extracción (Tabla 15) son menos eficientes para la obtención de β -caroteno.

El contenido de β -caroteno fue mayor a la bibliografía reportada por Olives et al., 2006, uso dos variedades de zanahoria (Nantesa y Monkum) y uso una mezcla de Hexano:acetona (50:50) obtuvo 0.096 y 0.630 mg de β -caroteno/g de biomasa respectivamente. Tsukakoshi et al., 2009 uso la variedad japonesa y utilizo una mezcla de n-hexano:acetona:etanol:tolueno (10:7:6:7), y obtuvo 0.062 mg de β -caroteno/g de biomasa. Biswas et al., 2011 probo 4 solventes (acetona, acetonitrilo, metanol, éter di etílico) usando la variedad roja de zanahoria y obtuvo 0.098, 0.0414, 0.0288 y 0.0786 mg de β -caroteno/g de biomasa respectivamente.

Tabla 14. Resultados de las concentraciones de β -caroteno en las extracciones con aceite de naranja usando bajas potencias.

Factor X ₁ . Tiempo (min)	Factor X ₂ . Potencia (W/cm ²)		
	10	20	30
	40 °C temperatura constante con celda de flujo enchaquetada.		
15	T ₁ 0.430 ± 0.012 ^E	T ₂ 0.652 ± 0.028 ^B	T ₃ 0.679 ± 0.023 ^{AB}
20	T ₄ 0.444 ± 0.016 ^E	T ₅ 0.602 ± 0.009 ^{CD}	T ₆ 0.633 ± 0.011 ^{BC}
25	T ₇ 0.563 ± 0.013 ^D	T ₈ 0.664 ± 0.020 ^B	T ₉ 0.721 ± 0.011 ^A

*Los valores son el promedio de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($\alpha = 0.05$). Los resultados son el rendimiento de cada tratamiento expresado en mg de β -caroteno por g de biomasa.

Tabla 15. Resultados del proceso de extracción (mg de β -caroteno/g de biomasa) con hexano y aceite de naranja sin uso del ultrasonido.

T ₁₀ (mg de beta caroteno/g de biomasa)	T ₁₁ (mg de beta caroteno/g de biomasa)
0.415 ± 0.004	0.394 ± 0.006

T₁₀= Extracción con hexano. T₁₁= Extracción solo en maceración.

Las muestras se realizaron por triplicado.

Concentración: mg de beta caroteno por g de biomasa.

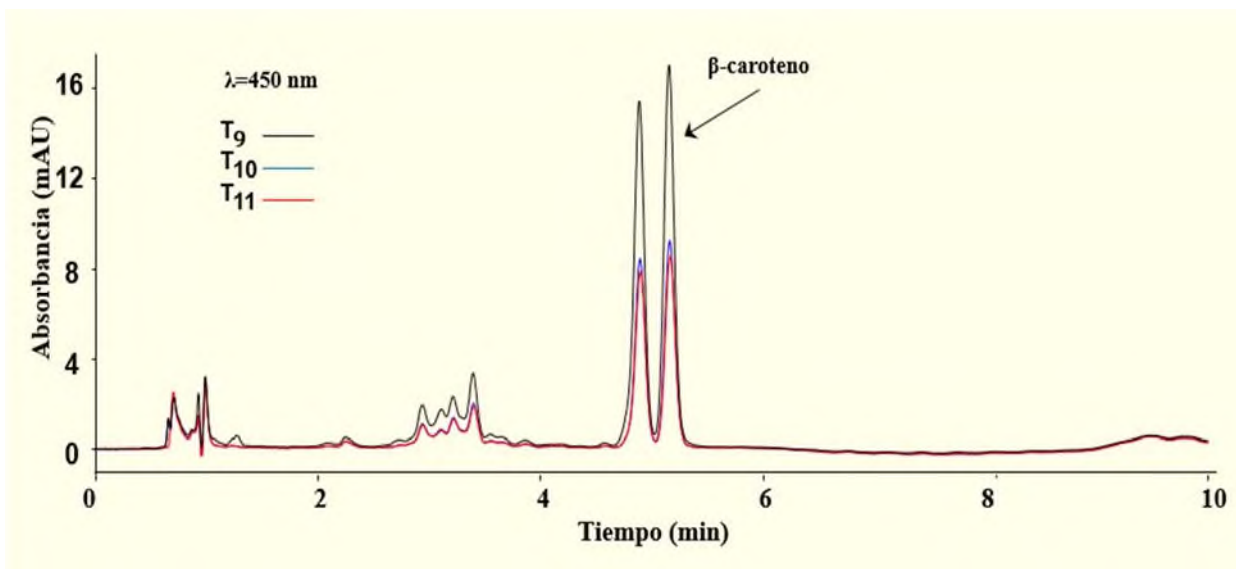


Figura 12. Cromatogramas de HPLC de la extracción β -caroteno a partir de zanahoria utilizando aceite de naranja y ultrasonido con diferentes condiciones: T_9 (30 W/cm², 25 min), T_{10} (maceración con aceite de naranja), T_{11} (extracción con hexano).

15.10. Análisis de carotenos por UPLC-DAD-TOFMS

Los carotenos obtenidos por los distintos procedimientos de extracción se analizaron por UPLC-DAD-TOFMS. En la figura 16 se muestra un cromatograma típico correspondiente a la muestra obtenida con la extracción con hexano (1 hora de agitación a temperatura ambiente). Como se puede observar en el cromatograma se obtiene una señal analítica en el minuto 5 (pico cromatográfico) que coincide con el β -caroteno. También se observa otra señal analítica antes del minuto 5 que tiene un espectro de absorción en visible y de masas similar al β -caroteno, obviamente este compuesto no es producto de oxidación y/o descomposición al no presentar un cambio de masa molecular y cambio de la longitud de onda de máxima absorción. De acuerdo a las referencias, esta señal analítica podría corresponder a α -caroteno ya que reportan que se eluye justo antes que el β -caroteno (Li et al., 2013). Por otro lado, la intensidad de la señal de analítica del α y β caroteno es muy similar lo que resulta atípico de acuerdo con otros reportes que indican que la abundancia de α -caroteno en extractos de zanahoria es mucho menor que la cantidad de β -caroteno.

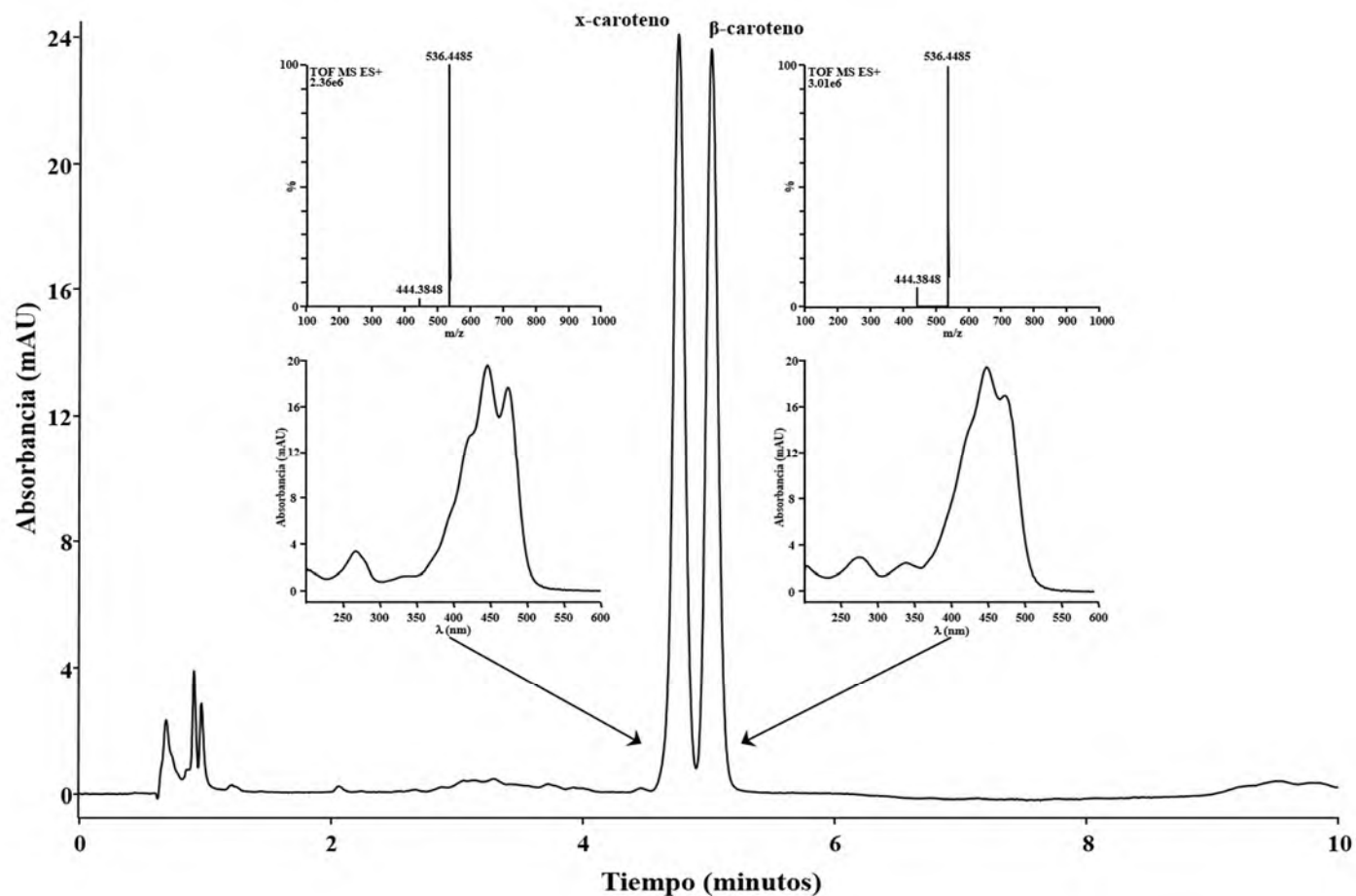


Figura 13. Cromatograma UPLC-DAD-MS representativo obtenido del análisis del extracto de carotenos asistido por ultrasonido con aceite de naranja como extractante.

15.11. CONCLUSIONES

- El análisis físico permitió identificar la calidad de la materia prima, de acuerdo a lo establecido por la norma mexicana NMX-FF-024-1982.
- El análisis fisicoquímico permitió conocer las condiciones en las que se encontraba la materia prima antes de ser procesadas, los valores de pH, concentración de sólidos totales, índice de maduración se encuentran dentro de lo reportado por otros autores, además de que estos son muy similares.
- La composición química proximal fue muy similar a lo reportado por otros autores con excepto el contenido de grasas (4.08%) y proteína (3.81% y 4.19%) los cuales fue ligeramente mayor y menor (respectivamente) al reportado en otras investigaciones.
- El método de secado en charolas permitió la obtención polvos de zanahorias con un mejor color y un rendimiento (79.73%) similar (81.26%) al obtenido por liofilización.
- La concentración de β -Caroteno presente en los polvos de zanahoria usando el método de secado en charolas fue mayor (0.366 mg de β -Caroteno/g) en comparación con los polvos obtenidos por liofilización (0.028 mg de β -Caroteno/g).
- La concentración β -Caroteno (1.83 mg de β -Caroteno) presente en el extracto obtenido a partir de la materia prima secada en charola fue mayor en comparación con el extracto obtenido a partir del liofilizado (0.14 mg de β -Caroteno).
- El mejor tratamiento para obtener β -Caroteno usando altas potencias fue el tratamiento 7 (40 W/cm², 20 min), sin embargo, no superó a la extracción realizada con hexano y al control, esto se debe que las altas potencias y el tiempo prolongado de extracción se degrada al β -Caroteno.
- El mejor tratamiento usando bajas potencias fue el tratamiento 9 (30 W/cm², 25 min), 0.721 mg de β -caroteno/g de biomasa, se obtuvo mayor aislamiento a lo reportado por varios autores. Este tratamiento fue mayor incluso a la extracción con hexano y al control. La baja potencia no degrada al β -caroteno, debido que el tiempo es el adecuado para obtener un buen rendimiento.
- El compuesto retenido antes que el β -caroteno es α -caroteno debido que presentó una masa igual al ser analizado por espectrometría de masas.

16. REFERENCIAS

- Almeida & Zambrano., (2007). Elaboración de jugo, pasta, y polvo de zanahoria. Pp. 115.
- Altemimi A, Lightfoot DA, Kinsel M, Watson DG (2015) Employing Response Surface Methodology for the Optimization of Ultrasound Assisted Extraction of Lutein and β -Carotene from Spinach. *Molecules*. Vol (20). Pp.6611-6625.
- Amorim et al., (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*. Pp. 56, 49-73.
- AOAC, (2000). Official Methods of the Association of Agricultural Chemists. (17th ed.) Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Belin GK, Gülaçar FO (2007) Separation of chlorins and carotenoids in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*. Vol (45). Pp. 593-599.
- Biwas, A., Sahoo, J., Chatli, M., (2011). A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of β -carotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat Nuggets. *LWT-Food Science and Technology*. Vol (44): 1089-1813.
- Burgos & Calderón., (2009). Determinación del contenido de carotenoides totales en ocho especies de frutas y verduras comercializadas en la zona metropolitana de san salvador. 78, 79.
- Butnariu, M. (2016) Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products, *Journal of Ecosystem & Ecography*. Vol (6). Pp.193.
- Carranco et al., (2011). Carotenoides y su función antioxidante: A review. 233-241.

Cavalcanti, R. N. (2013). Uses and Applications of Extracts from Natural Sources. Pp. 1-57.

Contreras-Villar. (2004). Relación entre el contenido de caroteno, color y características botánicas del polen corbicular. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de ingeniería en alimentos.

Ganga & Corke. (1999). Physical properties of starch of Asian-adapted potato varieties. J. Sci. Food Agric. 79. Pp. 1642-1646.

Gazalli et al., (2013). Proximate composition of Carrot Powder and Apple pomace powder. International Journal of Food Nutrition and Safety, 3 (1), pp, 25-28.

Kyriakopoulou et al., (2016). Life Cycle Analysis of Microalgae Extraction Techniques. Chemical Engineering Transactions, 52. Pp. 1039-1044.

Lawless J., The Illustrated Encyclopedia Of Essential Oils, ISBN 1-85-230-721-8. Element Books, London, 1995.

Mustafa A, Trevino LM, Turner C (2012) Pressurized hot ethanol extraction of carotenoids from carrot by-products. Molecules. Vol (17). Pp. 1809-1818.

NMX-K-402-1973. Determinación del índice de peróxido en aceites esenciales. 1-4.

NMX-FF-024-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano. Tubérculo. Zanahoria (*Daucus carota L*) especificaciones. 1-6.

Sivathanu & Palaniswamy., (2012). Purification and characterization of carotenoids from Green algae *Chlorococcum humicola* by HPLC-NMR and LC-MS-APCI.

Spinella et al., (2015). Granos de girasol alto esteárico alto oleico.

- León et al., (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. revista cubana de farmacia. Pp. 747.
- Li et al., 2013. (2013). Ultrasonics sonochemistry Green ultrasound-assited extraction of carotenoids basedon the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. Ultrasonics-sonochemistry, 20 (1). Pp. 12-18.
- Palou & Serra (2000). Perspectivas europeas sobre alimentos funcionales. Alimentación, Nutrición y Salud. 7 (3). Pp. 76-90
- Sharma et al., (2012). Chemical composition functional properties and processing of carrot: A review. Journal of Food Science and Technology.
- Shirsanth et al., (2012). Chemical Engineering and Processing: Process Intensification of extrationof natural products using ultrasonic irradiations: A review of current status. Chemical Engineering & Processing: Process Intensification. Pp. 53, 10-23.
- Tanunmihardjo et al., (2016). Vegetables of temperatura climates: Carrot, Parsnip and Beetroot. Pp. 387-392.
- Shyamala & Jamuna., (2010). Nutritional Content and Antioxidant Properties of Pulp Wastefrom *Daucus carota* and *Beta vulgaris*. Pp. 398-402.

17. ANEXOS

17.1. Curva de calibración por espectrofotometría.

Tabla 16. Datos obtenidos de la curva estándar de β -caroteno

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
0	0.000
0.5	0.183
1	0.343
1.5	0.525
2	0.698
2.5	0.846
3	0.999

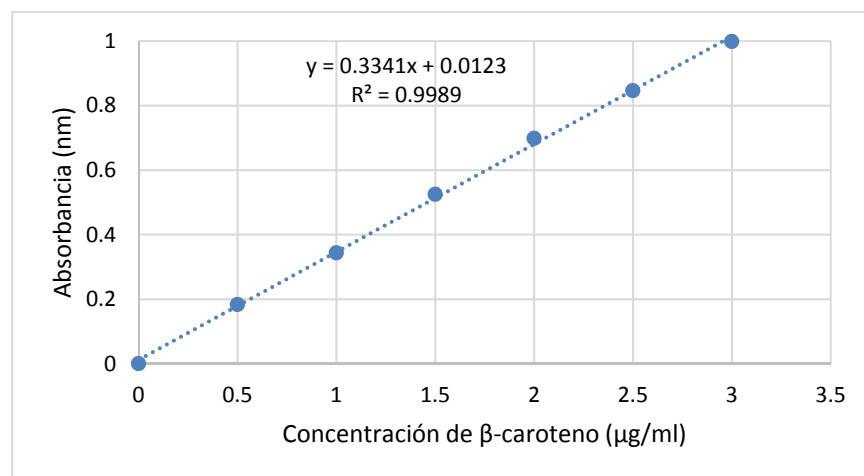


Figura 14. Curva de estándar de calibración de análisis de β -caroteno.

17.2. Curva de calibración realizada en HPLC.

Se realizaron diferentes soluciones en concentraciones muy pequeñas para construir la curva y evitar dañar la columna de HPLC con el aceite de naranja. Se preparo una solución madre de 500 ppm (4.7 g de estándar de de β -caroteno UV-vis y 8.75 ml de aceite de naranja), a partir de esta solución madre se prepararon 5 soluciones más (200 ppm, 150 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 10 ppm) y a partir de estas soluciones se prepararon 5 soluciones más 0.2 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm. Esta ultimas soluciones fueron filtradas en un filtro de teflón para posteriormente ser analizado en HPLC y calcular la concentración de β -caroteno presente en las extracciones. En la figura 19 se muestra la curva de calibración realizada en HPLC.

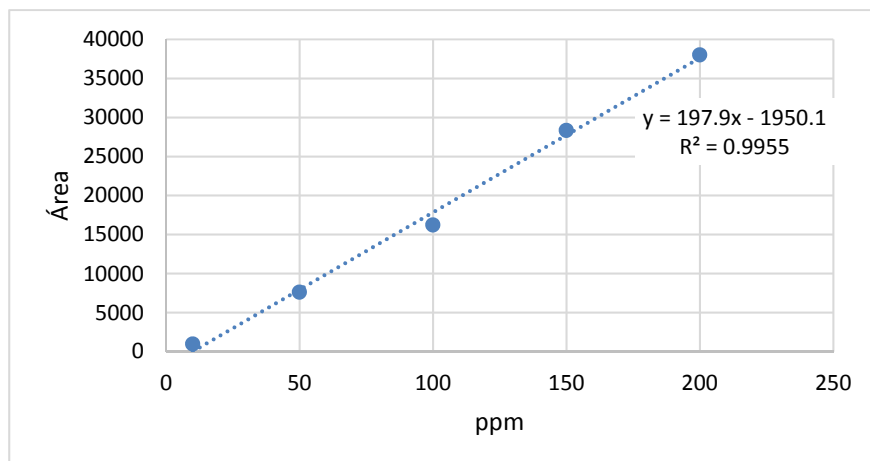


Figura 15. Curva de calibración realizada en HPLC.

17.3. Extracción de β -caroteno usando aceite de naranja.

En la figura 16, se pueden observar las diferentes tonalidades de las extracciones usando aceite de naranja como solvente y la extracción usando hexano como solvente, las diferentes tonalidades están directamente relacionadas con el tiempo y la potencia usada en cada tratamiento.

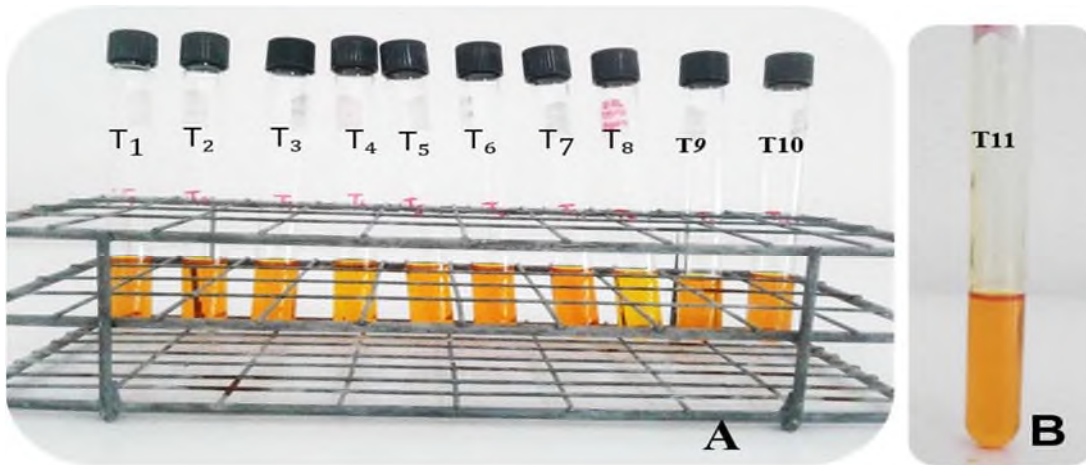


Figura 16. Extracciones de β -caroteno a partir de polvos de zanahoria (método de secado en charolas) utilizado como solventes aceite de naranja y hexano. A) Son los diferentes tratamientos (T₁ a T₁₀) con aceite de naranja y B) Tratamiento usando hexano (T₁₁).

