



**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**

**“DETERMINACIÓN DE  $\beta$ -Caroteno EN BRÁCTEA INTERNA DE LA  
*Cynara scolymus* (ALCACHOFA) EN HARINAS DE PESCADO POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA”**

**Experiencia Profesional para optar Título Profesional de  
Licenciado en Química**

Autor:

Asurza Parra, Jorge Luis

Asesor:

Qco, Rodolfo Pumachagua Huertas

Jurados:

Mg. Rodríguez Mejía, Jorge

MSc. Castañeda Pérez, Luz Genara

Q.F. Fernández Arroyo, Carmen

Dra. Salvador Salazar, Martha

Lima – Perú

2018

## ÍNDICE

RESUMEN -----	5
ABSTRACT -----	6
I. INTRODUCCIÓN -----	7
1.1. Trayectoria del autor -----	8
1.2. Descripción de la empresa -----	8
1.3. Organización de la empresa -----	9
1.4. Áreas y funciones desempeñadas -----	10
II. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA -----	11
2.1. Justificación teórica -----	12
2.2. Justificación práctica -----	12
III. OBJETIVOS -----	13
3.1. Objetivo general -----	13
3.2. Objetivos específicos -----	13
IV. GENERALIDADES -----	14
4.1. Lípidos -----	14
4.2. Clasificación de los lípidos -----	14
4.2.1. Lípidos Saponificables -----	15
4.2.1.1. Lípidos simples -----	15
4.2.1.2. Lípidos Compuestos -----	15
4.2.2. Lípidos Insaponificables -----	15
4.3. Terpenoides -----	16
4.3.1. Clasificación -----	17
V. CAROTENOIDES -----	19
5.1. Clasificación de carotenoides -----	19
5.1.1. Carotenos -----	19
5.1.2. Xantófilas -----	19

5.2. Distribución en el mundo vegetal -----	19
5.3. Distribución en el mundo animal -----	21
5.4. Estabilidad de los Carotenoides -----	23
5.4.1. Efecto de Oxidación -----	24
5.4.2. Efecto de la composición lipídica -----	25
5.4.3. Efecto de la estructura -----	26
5.4.4. Efecto de la Temperatura -----	27
5.4.5. Efecto de la luz -----	30
5.4.6. Efecto de almacenamiento -----	30
<b>VI. ANTIOXIDANTES -----</b>	<b>32</b>
6.1. Definición -----	32
6.2. Características de los antioxidantes -----	32
6.3. Clasificación de los antioxidantes -----	33
6.3.1. Clasificación 1 -----	33
6.3.2. Clasificación 2 -----	35
6.3.3. Clasificación 3 -----	35
<b>VII. IMPORTANCIA DEL USO DE ANTIOXIDANTES -----</b>	<b>36</b>
7.1. Harina de pescado y conservación -----	36
7.2. Harina de pescado -----	37
<b>VIII. PROCESO DE OBTENCION DE LA HARINA DE PESCADO-----</b>	<b>39</b>
8.1. Captura de materia prima -----	39
8.2. Descarga, transporte y pesaje -----	39
8.3. Almacenamiento de la materia prima -----	39
8.4. Cocinado -----	40
8.5. Prensado -----	40
8.6. Recuperación de solidos -----	41
8.7. Recuperación de aceite -----	41
8.8. Tratamiento de agua de cola -----	41
8.9. Secado -----	41
8.10. Molienda -----	42
8.11. Transporte -----	42
8.12. Ensaque -----	42

<b>IX. LA OXIDACION DE LAS GRASAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA CONSERVACION DE LAS HARINAS DE PESCADO</b>	<b>43</b>
9.1. Oxidación de las grasas	43
9.2. Consecuencias de la oxidación en la conservación de las harinas de pescado	44
<b>X. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>44</b>
10.1. Extracción y determinación de $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la <i>Cynara scolymus</i>	44
10.2. Prueba de la capacidad antioxidante del $\beta$ -Caroteno de la bráctea interna extraída de la <i>Cynara scolymus</i> en la Harina de pescado	53
10.3. Análisis de calidad de la harina de pescado sometida al efecto antioxidante del $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la <i>Cynara scolymus</i>	55
10.4. Determinación del porcentaje de capacidad antioxidante por el método 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) del $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la <i>Cynara scolymus</i> (alcachofa)	64
<b>XI. RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>XII. DISCUSION DE LOS RESULTADOS</b>	<b>77</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>XIV. RECOMENDACIONES</b>	<b>80</b>
<b>XV. APORTES DESTACABLES A LA EMPRESA</b>	<b>81</b>
<b>XVI. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>82</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la determinación y cuantificación de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), donde se desarrolló un método de extracción con solventes hexano:acetona (4:6), y se utilizó un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación del  $\beta$ -caroteno, seguidamente se realizaron las pruebas en harinas de pescado para determinar la actividad antioxidante del  $\beta$ -caroteno como aditivo, adicionando el  $\beta$ -caroteno en muestras de harinas de pescado a diferentes concentraciones y almacenado por treinta días a temperatura ambiente y en oscuridad, luego de pasado el tiempo de prueba se realizaron los análisis de Histamina, Nitrógeno Total Volátil (TVN) para determinar el nivel de degradación o putrefacción de las harina de pescado, el análisis de Proteína para determinar la variación de la calidad de la harina. Finalmente se realizó la prueba de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar el porcentaje de actividad antioxidante o porcentaje de inhibición del  $\beta$ -caroteno proveniente de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), se obtuvo como resultado  $74.15\% \pm 0.14$  de capacidad antioxidante, y por tanto se debe dar a conocer como una alternativa de perseverante natural en harinas de pescado.

**Palabras clave:** ***Cynara scolymus*** (alcachofa),  $\beta$ -caroteno, antioxidante, Harina de pescado, DPPH.

## ABSTRACT

We did the determination and quantification of  $\beta$ -carotene of the internal bract of the *Cynara scolymus* (artichoke) was carried out, where a solvent extraction method hexane: acetone (4: 6) was developed, and a liquid chromatography of high efficiency for the quantification of  $\beta$ -carotene, then tests were done on fish meal to determine the antioxidant activity of  $\beta$ -carotene as an additive, adding the  $\beta$ -carotene in fish meal samples at different concentrations and stored for thirty days at room temperature and in darkness, after the test time was passed, the analyzes of Histamine, Total Volatile Nitrogen (TVN) were carried out to determine the level of degradation or putrefaction of the fishmeal, the analysis of Protein to determine the variation of the quality of the flour. Finally, the test of 2,2-Diphenyl-1-Picrilhydrazil (DPPH) was carried out to determine the percentage of antioxidant activity or percentage of inhibition of  $\beta$ -carotene from the internal bract of the *Cynara scolymus* (artichoke), obtained as a result  $74.15\% \pm 0.14$  of antioxidant capacity, and therefore should be known as an alternative natural preservative fishmeal.

**Keywords:** *Cynara scolymus* (artichoke),  $\beta$ -carotene, antioxidant, fish meal, DPPH.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los carotenoides constituyen una larga clase de pigmentos naturales encontrados en frutas y vegetales que llamaron la atención de químicos y biólogos desde 1831, cuando un colorante amarillo llamado  $\beta$ -caroteno fue aislado por primera vez en la zanahoria ***Daucus carota***. En la actualidad se han reportado más de 690 carotenos, de los cuales 477 se encuentran como  $\beta$ -caroteno y 144 como  $\alpha$ -carotenos, donde precisamente queremos dar a conocer que cantidades de  $\beta$ -caroteno contiene la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), teniendo en mayor concentración el  $\beta$ -caroteno, que es el responsable de la coloración amarilla al realizar la extracción en la alcachofa.

En estudios de carotenoides por su actividad antioxidante por fluorescencia determinaron que los carotenoides poseen importantes funciones como quenchers de oxígeno singlete en tejidos expuestos a la luz, eliminando radicales libres. Se encontró que la velocidad de secuestro de radicales libres aumenta con el número de dobles enlaces coplanares en los carotenoides.

Estudios y aplicaciones de  $\beta$ -carotenos empleados para la prevención del cáncer y de otras enfermedades ha resaltado una gran importancia en su actividad antioxidante, por tal motivo se ha desarrollado en este trabajo de investigación las pruebas necesarias para usar esta actividad antioxidante del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), como preservante en las harinas de pescado, con la finalidad de buscar alternativas más amigables en el uso de antioxidantes en harinas de pescado es que aplicaremos los  $\beta$ -carotenos extraídos de la bráctea interna ***Cynara scolymus*** (alcachofa), haciendo pruebas de Nitrógeno volátil total e histaminas como control de calidad las harinas sometidas a estos antioxidantes naturales, midiendo el nivel de descomposición de la harinas, el análisis de proteínas por el método dumas para medir en como varia la calidad proteica de las harinas de pescado en función a los parámetros antes mencionados, finalizando con el análisis de capacidad antioxidante de los  $\beta$ -carotenos extraídos de la bráctea interna ***Cynara scolymus*** (alcachofa), por el método de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).

### **1.1. Trayectoria del autor**

Jorge Luis Asurza Parra, Bachiller en química de la universidad Nacional Federico Villarreal, inició sus prácticas pre-profesionales a inicios de agosto del 2012 en la empresa Laboratorios Analíticos JYR S.A.C, realizó los ensayos fisicoquímicos de aceites y grasas, Sólidos Disueltos, Sólidos Suspendidos, pH y conductividad en aguas naturales, domésticas e industriales. Posteriormente en marzo del 2013 ocupó el cargo de analista II en el área de Cromatografía de Gases en la empresa Envirotec S.A.C, realizó la preparación y el análisis de muestras de suelos, lodos y sedimentos en los parámetros GRO (gasolina), DRO (diésel) y lubricantes. También analizó muestras de Aire en los parámetros BTEX, VOC's, HCT, TPH, PCB's, Y formó parte del grupo de Implementación de métodos de Pesticidas Clorados y Pesticidas Fosforados en agua superficial y residual. En el año 2014, ya egresado de la escuela de química de la facultad de ciencias naturales y matemáticas, trabajó en la empresa VYSLAB E.I.R.L en el cargo de analista de laboratorio de fisicoquímico-ambiental realizando los ensayos de PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>10</sub>, SO<sub>2</sub> y NO<sub>2</sub> en calidad de aire; Aceites y grasas, Sólidos Totales, Sólidos Suspendidos, Sólidos Disueltos, Acidez, Alcalinidad en calidad de agua. En febrero del año 2015 ingresó como Analista II en la empresa Certificaciones del Perú S.A, realizó, durante un año, los ensayos de proteínas por el método Kjeldahl y por el método Dumas (combustión), Proteína soluble en KOH, Digestibilidad, Granulometría, Nitrógeno Total Volátil, Humedad y Ceniza en harinas de pescado y alimentos procesados, luego fue promovido al área de absorción atómica en marzo del 2016 realizando los análisis de Hierro, Calcio, Sodio, Cobre, Estaño, Cadmio, Plomo, Aluminio por flama, en digestión por vía húmeda, seca y microondas. También realizó los ensayos de Arsénico y Selenio por generador de hidruros y mercurio por vapor frío. Posteriormente en diciembre del 2017 formó parte del grupo del área de Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC) hasta la actualidad realizando los análisis de Tiamina (B1), Rivoftamina (B2), Niacina (B3), Ácido fólico (B9), Vitamina A, Aflatoxinas, Azúcares Totales, Azúcares reductores, Argininas, Histaminas, Aminas Biogénicas, Etoxiquina, Capsaicina, β-carotenos en Alimentos.

### **1.2. Descripción de la empresa**

Certificaciones del Perú S.A., es una empresa privada con una trayectoria de cuatro décadas, dedicada a ofrecer servicios de inspección, muestreo, ensayos, certificación de productos y de sistemas de gestión.



Servicios que brinda como organismo de tercera parte con el respaldo técnico de su Organismo de Inspección (OI), Laboratorio de Ensayos (LE) y Organismo de Certificación de Sistemas (OCS).

Desde su origen Cerper estuvo ligada al sector hidrobiológico, específicamente harina de pescado, producto con el cual fue pionero en el campo de la certificación y ensayo.

Posteriormente amplió su campo de acción a otros sectores económicos en los que participa y cuenta con las siguientes divisiones, que representan sus unidades de negocios más importantes: División pesca, División Ambiental, División Agro Industrial, División Agrícola, División Aviar.

Para el desarrollo de sus operaciones CERPER cuenta con su sede central ubicada en el Callao, así como sedes en provincias y Unidades Operativas, ubicadas en Tumbes, Paita, Chimbote, Huacho, Lima, Pisco, Arequipa e Ilo.

### 1.3. Organización de la empresa.

La organización de la empresa Certificaciones del Perú S.A está conformada por tres organismos principales y laboratorio de ensayos. Que a su vez en laboratorio de ensayos se subdividen en seis áreas de acuerdo a la especialidad de estudio de las muestras. Donde el área de cromatografía líquida pertenece al subgrupo del Área de Fisicoquímica, como se observa en la figura 1.

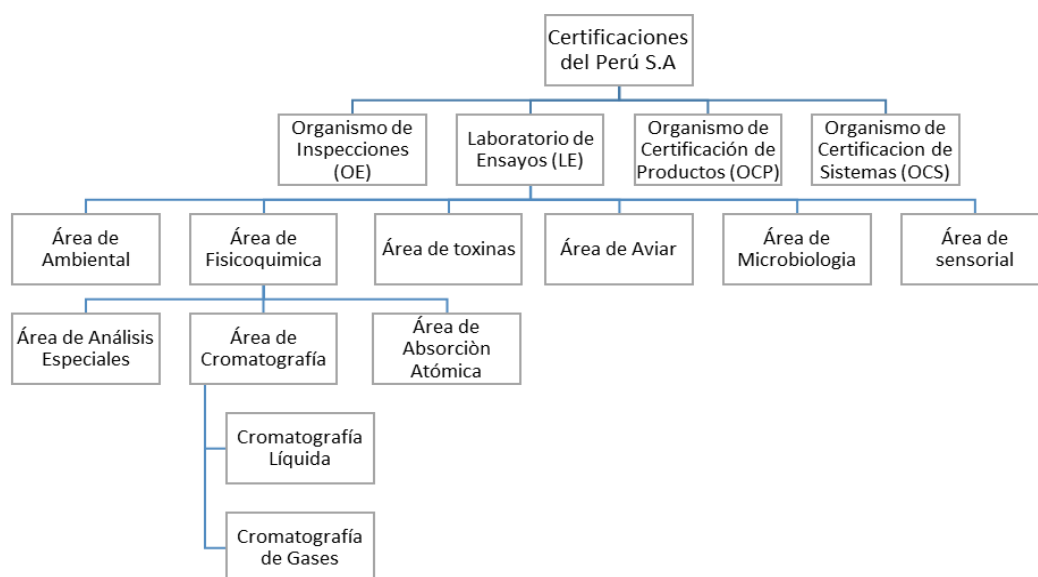


Figura 1: Organigrama de la organización de la empresa Certificaciones del Perú S.A

#### **1.4. Áreas y Funciones Desempeñadas.**

En las áreas de absorción atómica, proteínas y cromatografía se realizaron las siguientes funciones como analista fisicoquímico:

- Ejecutar las actividades asignadas, en concordancia con las leyes, políticas, normas y reglamentos, que rige el área, por lo que deberá mantenerse permanentemente actualizado.
- Realizar la homogenización de muestras de alimentos (Hidrobiológicos o alimentos procesados), así como verificar, mantener la frescura del alimento y llevar los registros correspondientes.
- Realizar el control de calidad de los materiales y muestras, haciendo duplicados de muestra y fortificaciones, mediante procesos de cálculo y aplicaciones de estándares preestablecidos.
- Realizar toda clase de pruebas químicas a las muestras, para determinar las concentraciones de sus componentes e identificar las interferencias que hace no cumplir con los estándares de calidad preestablecidos en el laboratorio
- Interpretar los textos y manuales (AOAC, AACC, NTP, EPA) para la realización de métodos de ensayo.
- Preparar los diferentes reactivos que van a ser utilizados en los ensayos de laboratorio.
- Preparar y operar los equipos de análisis instrumental, las muestras, los materiales requeridos en los diferentes análisis de laboratorio, cumpliendo con las medidas de seguridad establecidas.
- Anotar y digitar el resultado de cada prueba y análisis en la computadora para determinar las desviaciones existentes en la calidad de los productos. Elaborar los reportes de los análisis y los resultados de las pruebas.
- Interpretar los resultados obtenidos en los análisis e identificar los posibles errores en el proceso de análisis de las muestras para que sean subsanadas en el reensayo e informar al superior inmediato para que realice las correcciones necesarias.
- Asesorar a los otros analistas y practicantes en cuanto al uso del equipo e instrumentos y en la forma de realizar el análisis.
- Repetir las pruebas hechas por los practicantes y analistas cuando se hayan presentado desviaciones significativas en el control de calidad de los ensayos y ante la evidencia investigar y ejecutar otro tipo de prueba alternativa que comprueben el resultado inicial.

- Lavar y limpiar los equipos, instrumentos y espacio físico utilizados en las pruebas.
- Velar por el buen funcionamiento y uso de las instalaciones, equipos e instrumentos que utiliza en el desarrollo de sus actividades, reportando cualquier anomalía o daño importante que se presente a su superior inmediato, así como realizar aquellas reparaciones o ajustes menores que sus conocimientos técnicos le permitan para contar con equipos e instrumentos en óptimas condiciones de trabajo.
- Participar activamente, colaborar y cumplir con todas las políticas, procedimientos y regulaciones relativas al aseguramiento de la calidad que desarrolle e implemente la empresa.
- Realizar otras actividades inherentes al cargo que le sean asignadas por su superior inmediato.

## **2. DESCRIPCION DEL PROBLEMA**

En la actualidad existen diferentes tipos de antioxidantes sintéticos que se utilizan en la industria alimentaria para consumo humano y animal. En el ámbito de las harinas de pescado los antioxidantes sintéticos permitidos son la Etoxiquina y Butilhidroxitolueno (BHT). Debido a que la etoxiquina es extremadamente eficaz es el antioxidante más ampliamente utilizado en la actualidad y por ello en la actualidad según la Unión Europea en el reglamento de ejecución (UE) 2017/962 suspendió el uso de la etoxiquina debido a que no hay estudios que lleguen a una conclusión sobre la seguridad de la etoxiquina como aditivo para cualquier especie animal, los consumidores o el medio ambiente. Debido a que no se ha establecido ninguna conclusión en relación con la inexistencia de genotoxicidad de la imina quinona etoxiquina, uno de los metabolitos del aditivo etoxiquina. Además, la p-Fenetidina, una impureza del aditivo etoxiquina, está reconocida como posible agente mutágeno. Pero en Estados Unidos cuenta con autorización para el uso de etoxiquina a un punto limitante de 0.04 mg/Kg, ya que la Agencia de Protección Ambiental (Estados Unidos) ha establecido que cualquier riesgo cancerígeno relacionado con el uso de esta sustancia no excede el umbral de preocupación de esta Agencia. Y es por esto que surge la necesidad del estudio de otras alternativas naturales en la aplicación de antioxidantes en alimentos, que no sean genotóxicos, tóxicos o dañinos para los animales, personas y medio ambiente. No hay estudios ni investigaciones que se hayan realizado para buscar, determinar y aislar las propiedades antioxidantes de una fuente natural para aplicarlo a otros alimentos o productos procesados, que no los tienen.

## **2.1. Justificación teórica**

Esta investigación se realiza con el propósito de aportar al conocimiento sobre la importancia de los antioxidantes naturales y dar a conocer que se puede aplicar a otros alimentos sin alterar su composición inicial. Siendo una importante alternativa como preservante en la elaboración de alimentos procesados. Los resultados de esta investigación podrá tomarse en cuenta como un conocimiento base para otras investigaciones sobre antioxidantes, debido a que no solo se podrá investigar los  $\beta$ -carotenos de la *Cynara scolymus* (alcachofa) sino también de otras frutas, plantas o vegetales y aplicarlos a otros tipos de alimentos, ya que se estaría demostrando la capacidad antioxidante del  $\beta$ -carotenos de la *Cynara scolymus* (alcachofa).

## **2.2. Justificación práctica**

Esta investigación se realiza porque existe la necesidad de buscar una alternativa natural para reemplazar el uso de antioxidantes sintéticos, como en este caso, la etoxiquina en Harinas de pescado, y eliminar de esta forma la posible toxicidad de estos antioxidantes sintéticos. Esto beneficiaría las grandes compañías que hacen alimentos procesados y a los consumidores de estos productos. Debido a que la obtención de etoxiquina como preservante es muy costosa, y el  $\beta$ -carotenos de la *Cynara scolymus* (alcachofa) sería una opción más económica, natural y no toxica.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo general.**

Determinar y cuantificar el compuesto  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) para comprobar sus características antioxidantes como preservante en las harinas de pescado.

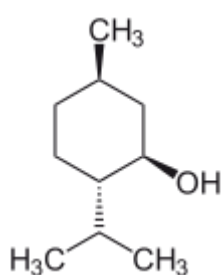
### 3.2. Objetivos específicos.

- Desarrollar un método de extracción para los antioxidantes  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa)
- Cuantificar el  $\beta$ -caroteno encontrados en la ***Cynara scolymus*** (alcachofa).
- Comparar los resultados obtenidos de la determinación del efecto antioxidante del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) fortificadas en las harinas de pescado con las variables de cantidad y tiempo, para medir el nivel de descomposición de la harina de pescado mediante los análisis de histamina y TVN.
- Realizar un control de calidad de la harina de pescado en función a los antioxidantes  $\beta$ -caroteno, haciendo una evaluación de la variación de proteína.
- Determinar el porcentaje de actividad capacidad antioxidante del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa).

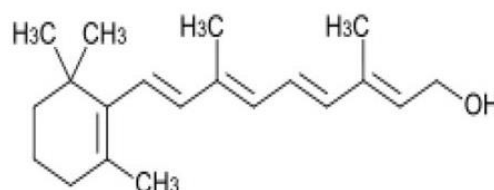
## 4. GENERALIDADES

### 4.1. Lípidos

Los lípidos son compuestos de origen biológico que se disuelven en disolventes no polares como el cloroformo o el dietil éter. El nombre lípido viene de la palabra griega *lipos*, que significa grasa. A diferencia de los carbohidratos y las proteínas, que se definen en términos de sus estructuras, los lípidos se definen en función de la operación física que se emplea para purificarlos. No es sorprendente, entonces, que los lípidos incluyan una amplia variedad de tipos estructurales. Los siguientes son algunos ejemplos:



Estructura del mentol (Terpeno)



Estructura de la Vitamina A (Terpenoide)

Figura 2: Ejemplos de tipos de lípidos

## 4.2. Clasificación de los lípidos

La heterogeneidad estructural de los lípidos dificulta cualquier clasificación sistemática. El componente lipídico de una muestra biológica puede ser extraído con disolventes orgánicos y ser sometido a un criterio empírico: La reacción de saponificación.

La saponificación consiste en una hidrólisis alcalina de la preparación lipídica (con KOH o NaOH). Los lípidos derivados de ácidos grasos (ácidos monocarboxílicos de cadena larga) dan lugar a sales alcalinas (jabones) y alcohol, que son fácilmente extraíbles en medio acuoso. No todos los lípidos presentes en una muestra biológica dan lugar a este tipo de reacción. Se distinguen por tanto dos tipos de lípidos, Eoin Fahy *et al* (2005).

### 4.2.1. Lípidos saponificables

Los lípidos saponificables agrupan a los derivados por esterificación u otras modificaciones de ácidos grasos, y se sintetizan en los organismos a partir de la aposición sucesiva de unidades de dos átomos de carbono, este grupo de lípidos se subdivide en dos:

#### **4.2.1.1. Lípidos simples**

- Ácidos grasos saturados. Son lípidos que no presentan dobles enlaces entre sus átomos de carbono. Se encuentran en el reino animal. Ejemplos: ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido araquídico y ácido lignogérico.
- Ácidos Insaturados. Poseen dobles enlaces en su configuración molecular. Se encuentran en el reino vegetal. Por ejemplo: ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido araquidónico y ácido nervónico.

#### **4.2.1.2. Lípidos Compuestos:**

- Fosfolípidos. Se caracterizan por tener un grupo fosfato en su configuración molecular.
- Glucolípidos. Son lípidos que se encuentran unidos a un glúcido

#### **4.2.2. Lípidos Insaponificables**

- Terpenos: son derivados del hidrocarburo isopreno. Entre ellos se encuentran las vitamina E, A, K y aceites esenciales.
- Esteroides: Son derivados del hidrocarburo esterano. Dentro de este grupo se encuentran los ácidos biliares, las hormonas sexuales, la vitamina D y el colesterol.
- Eicosanoides: son lípidos derivados de ácidos grasos esenciales tipo omega 3 y omega 6. Dentro de este grupo se encuentran las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.

#### **4.3. Terpenoides**

Los terpenoides, algunas veces referidos como isoprenoides, son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos similares a los terpenos. El nombre proviene de los primeros miembros de esta clase fueron derivados del aguarrás (“turpentine” en inglés, “terpentin” en alemán). Los terpenoides pueden verse como formados por unidades de 5-carbono isopreno (pero el precursor es el isopentenil difosfato), ensambladas y modificadas de muchas maneras diferentes, siempre basadas en el esqueleto del isopentano. La mayoría de los terpenoides tiene estructuras multicíclicas, las cuales difieren entre sí no sólo en grupo funcional sino también en su esqueleto básico de carbono. Los monómeros generalmente son referidos como “unidades de isopreno” porque la descomposición por calor de muchos terpenoides da por resultado ese producto; y porque en condiciones químicas adecuadas, se puede inducir al isopreno a polimerizarse en múltiplos de 5 carbonos, generando numerosos esqueletos de terpenoides. Por eso se relaciona a los terpenoides con el isopreno, si bien se sabe ya desde hace más de 100 años que el isopreno no es el precursor biológico de esta familia de metabolitos.

Estos lípidos se encuentran en toda clase de seres vivos, y son biosintetizados en las plantas, donde son importantes en numerosas interacciones bióticas, Goodwin (1971). En las plantas los terpenoides cumplen muchas funciones primarias: algunos pigmentos carotenoides son formados por terpenoides, también forman parte de la clorofila y las hormonas giberelina y ácido abscísico. Los terpenoides también cumplen una función de aumentar la fijación de algunas proteínas a las membranas celulares, lo que es conocido como isoprenilación. Los esteroides y esterolés son producidos a partir de terpenoides precursores.

Los terpenoides de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional y en los remedios herbolarios, y se están investigando sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos. Están presentes, por ejemplo, en las esencias del eucalipto, los sabores del clavo y el jengibre. También en el citral, mentol, alcanfor, y los cannabinoides.

#### **4.3.1. Clasificación**



Los terpenos son hidrocarburos que pueden verse como una combinación de numerosas unidades isopreno, por lo general unidas de forma cabeza-cola, pero también pueden darse combinaciones cabeza-cabeza y algunos compuestos están formados por uniones cabeza-cola (figura 3). Los terpenoides pueden ser considerados como terpenos modificados donde grupos metilo han sido reacomodados o removidos, o a los que se les han añadido átomos de oxígeno. Algunos autores usan el término terpeno para referirse a los terpenoides.

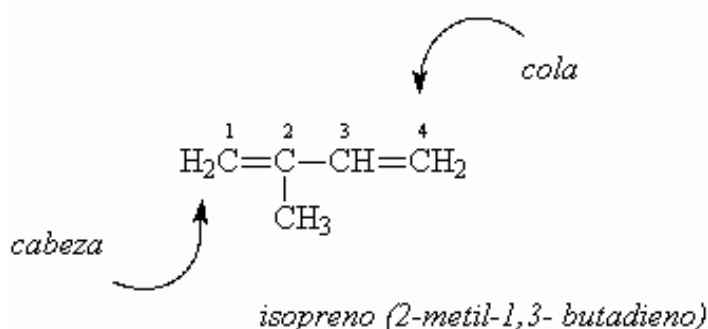


Figura 3: Estructura del isopreno cabeza – cola

La clasificación de los terpenoides según su estructura química, es similar a la de los terpenos, los cuales son clasificados en base al número de unidades isopreno presentes y en el caso de los triterpenoides, si están ciclados. Se los clasifica en:

- **Hemiterpenoides.** Los terpenoides más pequeños, con una sola unidad de isopreno. Poseen 5 carbonos. El hemiterpenoide más conocido es el isopreno mismo, un producto volátil que se desprende de los tejidos fotosintéticamente activos.
- **Monoterpenoides.** Terpenoides de 10 carbonos. Llamados así porque los primeros terpenoides aislados del aguarrás en los 1850s, fueron considerados la unidad base, a partir de la cual se hizo el resto de la nomenclatura. Los monoterpenos son mejor conocidos como componentes de las esencias volátiles de las flores y como parte de los aceites esenciales de hierbas y especias, en los que ellos forman parte de hasta el 5 % en peso de la planta seca.
- **Sesquiterpenoides.** Terpenoides de 15 carbonos (es decir, terpenoides de un monoterpenoide y medio). Como los monoterpenoides, muchos

Sesquiterpenoides están presentes en los aceites esenciales. Además, muchos Sesquiterpenoides actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios, y como inhibidores de la alimentación (“antifeedant”) de los herbívoros oportunistas. La hormona de las plantas llamada ácido abscísico es estructuralmente un sesquiterpeno, su precursor de 15 carbonos, la xantosina, no es sintetizada directamente de 3 unidades isopreno sino producida por un “cleavage” asimétrico de un carotenoide de 40 unidades.

- **Diterpenoides.** Terpenoides de 20 carbonos. Entre ellos se incluye el fitol, que es el lado hidrofóbico de la clorofila, las hormonas giberelinas, los ácidos de las resinas de las coníferas y las especies de legumbres, las fitoalexinas, y una serie de metabolitos farmacológicamente importantes, incluyendo el taxol, un agente anticáncer encontrado en muy bajas concentraciones (0,01% de peso seco) en la madera del tejo (“yew”), y forskolina, un compuesto usado para tratar el glaucoma. Algunas giberelinas tienen 19 átomos de carbono por lo que no son consideradas diterpenoides porque perdieron un átomo de carbono durante una reacción de “cleavage”.
- **Triterpenoides.** Terpenoides de 30 carbonos. Son generados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola. Esta gran clase de moléculas incluye a los brassinoesteroides, componentes de la membrana que son fitoesteroles, algunas fitoalexinas, varias toxinas y “feeding deterrents”, y componentes de las ceras de la superficie de las plantas, como el ácido oleanólico de las uvas.
- **Tetraterpenoides.** Terpenoides de 40 carbonos (8 unidades de isopreno). Los tetraterpenos más prevalentes son los pigmentos carotenoides accesorios que cumplen funciones esenciales en la fotosíntesis.
- **Politerpenoides.** Los politerpenoides, que contienen más de 8 unidades de isopreno, incluyen a los “prenylated quinone electron carriers” como la plastoquinona y la ubiquinona, también poliprenoles de cadena larga relacionados con las reacciones de transferencia de azúcares (por ejemplo el dolicol), y también a enormemente largos polímeros como el “rubber”, usualmente encontrado en el látex.
- **Meroterpenoides.** Así se llama a los metabolitos secundarios de las plantas que tienen orígenes sólo parcialmente derivados de terpenoides. Por ejemplo, tanto las citoquininas como numerosos fenilpropanoides contienen cadenas laterales de un isoprenoide de 5 carbonos. Algunos alcaloides, como las drogas

anticáncer vincristina y vinblastina, contienen fragmentos terpenoides en sus estructuras. Además, algunas proteínas modificadas incluyen una cadena lateral de 15 o 20 carbonos que es un Terpenoide, que es el que ancla la proteína a la membrana.

## 5. CAROTENOIDES

Solomon Graham TW (2009), Los carotenoides son compuestos naturales presentes en diversas estructuras de plantas y en gran variedad de animales, algas, hongos y bacterias.

Estos pigmentos son responsables del color de flores y frutos (para favorecer la polinización y dispersión de semillas), o de estructuras animales como las plumas y picos de algunos pájaros, el exoesqueleto de crustáceos y el músculo o la piel de algunos peces. Son considerados compuestos indispensables para la vida, fundamentalmente debido a las funciones que llevan a cabo en relación con la fotosíntesis (captación de luz, foto protección)

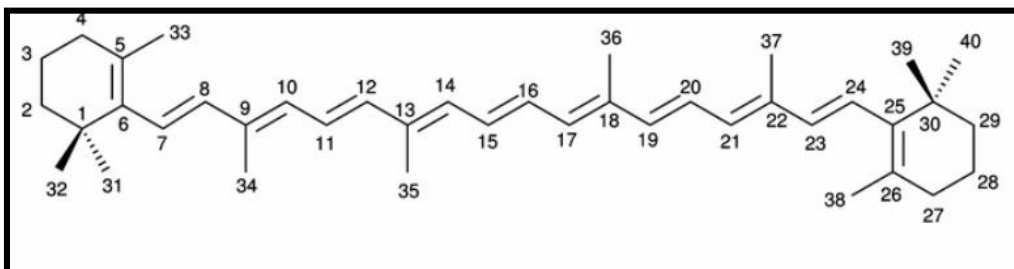


Figura 4: Estructura del  $\beta$ -caroteno constituida por un total de 40 carbonos.

### 5.1. Clasificación de carotenoides

#### 5.1.1. Carotenos

No contienen oxígeno en sus anillos terminales, ejemplos:  $\beta$ -caroteno y licopeno.

#### 5.1.2. Xantofilas

Contienen oxígeno en sus anillos terminales, ejemplo: Luteína.

## 5.2. Distribución en el mundo vegetal

Los carotenoides, son sintetizados por todos los organismos fotosintéticos, incluyendo las cianobacterias, y ocasionalmente por las bacterias no fotosintéticas y los líquenes. En el medio marino, la síntesis se lleva a cabo esencialmente por el fitoplancton: microalgas, cianobacterias y otros organismos autótrofos; así como por las microfitas y macrofitas bénticas. Ha sido reportado que las enzimas específicas de la síntesis de carotenoides se encuentran codificadas en el material genético contenido en el núcleo, sintetizada en los ribosomas citoplásmicos y transportados hacia los cloroplastos, o bien, pueden ser sintetizados in situ si están presentes las moléculas precursoras iniciales. El cloroplasto, ha sido considerado como un organelo completamente autónomo, capaz de realizar directamente la síntesis de carotenoides, Young y Briton (1993).

La distribución y dominancia de los pigmentos carotenoides en los organismos fotosintéticos puede variar de un género a otro, en función de las enzimas participantes, tal aspecto ha sido considerado para establecer la taxonomía, así como las teorías de evolución de las algas a partir de organismos primitivos, Klein (1967).

La dominancia de algunos pigmentos carotenoides: carotenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y xantofilas (xantinas: violaxantina, astaxantina, zeaxantina, etc.) en los diferentes grupos de algas. Los carotenoides están ampliamente distribuidos en las diferentes divisiones de algas, sin embargo, la mayor diversidad se presenta en las clorofitas, en las cuales la localización de la astaxantina, como metabolito de alto valor agregado, está en función de las condiciones de cultivo, específicamente temperatura e intensidad luminosa. De esta manera, bajo condiciones favorables se localiza en los cloroplastos, mientras que en condiciones desfavorables (altas intensidades luminosas) se acumula en los glóbulos extracloroplásticos.

Los pigmentos característicos, en el caso de las cianobacterias, son la equinenona, la zeaxantina y la antoxantina, y estos se presentan en las especies representativas del género *Oscillatoria* sp, además de los géneros *Phormidium* foveolarum, *Anabaena* aerulosa, *Nostoc* commune, *Tolypothrix* tenuis, *Aphanizomenon* flosaquae, *Synechococcus* elongatus, *Calothrix* parietina y *Microcystis* aeruginosa. En el caso de los hongos, no considerados como vegetales, la presencia de la astaxantina ha sido reportada en diferentes géneros como *Phaffia* rhodozyma y *Rhodotorula* rubra, Longo et al., (1992); Nelis et al, (1991). En el caso de los vegetales superiores, existen reportes únicamente en 5 especies de flores: *Adonis aestivalis*, la cual presenta además  $\beta$ -

caroteno; *Adonis annua*, *Adonis flammeus*, *Adonis turkestanica* y *Viola tricolor*, la cual contiene además luteína,  $\beta$ -caroteno, flavoxantina, violaxantina y licopeno, Goodwin, (1965); Goodwin,(1980).

### **5.3. Distribución en el mundo animal**

En el reino animal, los pigmentos carotenoides se presentan en forma de lipocromos solubles, unidos por medio de enlaces proteicos. Merejkowsky (1883), en sus primeras investigaciones, mostro que la hidrolisis de estos compuestos liberaba un pigmento rojo, al cual llamo zooeritrina, el cual debido a estudios específicos de purificación de proteínas, análisis e identificación de espectros de absorción adquirió posteriormente el nombre de astaxantina. Como resultado del avance de estos estudios, se pudieron establecer listas de distribución de carotenoides en los órganos de las diferentes especies de invertebrados). Así también, se llegó a la determinación de dos grandes grupos de pigmentos: el primero que comprende los verdaderos carotenoides, es decir aquellos pigmentos que se encuentran unidos en proporción estequiométrica con las proteínas por enlaces no covalentes, mientras que el segundo grupo está constituido por carotenoides que se encuentran disueltos en compuestos lipídicos. Zagalski, (1976) y Briton (1982), utilizando técnicas de bioquímica avanzada de proteínas y de espectroscopia de masas, contribuyeron a la afirmación de estos resultados. En general, los animales no presentan la capacidad de sintetizar pigmentos carotenoides, sin embargo, la mayoría son capaces de asimilarlos en forma selectiva, una vez obtenidos de su régimen alimenticio pueden ser biosintetizados o metabolizados ya sea por oxidación o reducción de los precursores primarios, dando por consecuencia la diversidad de pigmentos carotenoides en los organismos del medio ambiente marino. En algunos animales marinos, los procesos metabólicos que intervienen en la transformación de los carotenoides son muy especializados debido a la importancia que tienen estos en el camuflaje, en las actitudes de cortejo, guerra o defensa, Liaaen Jensen (1990).

La presencia de carotenoides en las esponjas, se ha detectado en sus estructuras debido a la acumulación de fitoplancton o de zooplancton rico en carotenoides; algunos pigmentos como la diatoxantina, astaxantina y zeaxantina pueden obtenerse a partir de la acumulación de diatomeas, hongos y bacterias fotosintéticas, o bien por el metabolismo de otros pigmentos, Johnson (1991).

En el caso de los insectos, la distribución de carotenoides va a determinar en la mayoría de los casos, modelos de pigmentación que pueden contribuir al estudio y explicación de mutaciones, así como de mecanismos de sobrevivencia, como por ejemplo el camuflaje. Estas variaciones en la distribución y función van a estar reguladas por diferentes factores como son: la luz, la temperatura y la humedad. Dentro de los reptiles, podemos mencionar en las tortugas la presencia de astaxantina en el caparazón, en combinación con el  $\beta$ -caroteno y la luteína, así también existe astaxantina en la retina de la especie *Clemmys insculpa*.

En los anfibios, la distribución de carotenoides es muy amplia, ya que se puede detectar en diferentes sitios de acumulación, tales como la piel, el hígado, los ovarios, los oviductos, las gónadas, los riñones, los músculos, el páncreas, los ojos, el nervio ciático y medular. El origen de estos pigmentos no es todavía muy claro, sin embargo, sus funciones están claramente definidas, ya que ha sido reportado que durante las variaciones estacionales se producen cambios en el metabolismo y transporte de estos carotenoides que se manifiesta en el periodo de hibernación tanto en los machos como en las hembras.

En los peces la presencia de astaxantina se encuentra ampliamente distribuida, ya que se ha reportado al menos en 86 especies, las cuales la contienen entre otros pigmentos carotenoides. Esta distribución está en función del régimen alimenticio, así como de la época de fresa tanto en el macho, como en la hembra, dependiendo además de la fase de desarrollo y crecimiento en la que se encuentren los organismos, ya que se puede llegar a manifestar la dominancia temporal de un pigmento específico. De esta manera la función primordial de los carotenoides se da en la reproducción, sin embargo, también desempeñan un papel muy importante en la visión y como precursores de la vitamina A.

Las aves acumulan vía alimentación, carotenoides en el cuerpo y en el plumaje, confiriéndoles una coloración que va desde tonalidades amarillas, hasta el color naranja, siendo posible la presencia de diferentes pigmentos en un mismo organismo. Se ha reportado que la acumulación de los carotenoides provenientes de la alimentación, está programada genéticamente, y que la transferencia de los pigmentos hacia las plumas está regulada por control hormonal, induciendo además el dimorfismo sexual y favoreciendo el reconocimiento de la pareja, ya que los carotenoides, particularmente los que aportan la coloración roja y naranja, se presentan en mayor concentración en los machos a diferencia de las hembras, otorgándoles una coloración muy vistosa y llamativa para las hembras, Goodwin (1980) y Pomarede (1990).

#### 5.4. Estabilidad de los carotenoides

Los carotenoides son pigmentos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. Así, se ha comprobado que los procesos de oxidación son más acusados cuando se pierde la integridad celular, de forma que en alimentos vegetales triturados, la pérdida de compartimentación celular pone en contacto sustancias que pueden modificar estructuralmente, e incluso destruir los pigmentos. No todos los tipos de cocinado afectan en la misma medida a los carotenoides, de forma que la pérdida de estos pigmentos aumenta en el siguiente orden: cocinado con microondas < cocinado al vapor < hervido < salteado.

Los carotenoides, excepto algunas excepciones, son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante el lavado y procesamiento de frutos son mínimas. Otros tratamientos empleados en las industrias alimentarias, como por ejemplo el tratamiento a alta presión, parecen no afectar significativamente a los niveles de carotenoides en diversos productos vegetales. El escaldado industrial de los alimentos puede producir pérdidas de carotenoides, si bien la inactivación enzimática que reduce proviene pérdidas posteriores durante el procesado y almacenamiento. En cambio, la congelación, la adición de antioxidantes y la exclusión del oxígeno (vacío, envases impermeables, atmosfera inerte) disminuyen las pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos.

La destrucción de estos pigmentos reduce el valor nutritivo de los alimentos e induce una decoloración y una pérdida de sus características organolépticas. El grado de decoloración va a depender fundamentalmente de la presencia de agentes oxidantes en el medio (sobre todo oxígeno molecular) y de que se comunique energía suficiente para la reacción de degradación tenga lugar. La energía se aporta en forma de luz o calor. La reacción de decoloración supone la pérdida de conjugación de la molécula y, en principio, no tiene por qué implicar la rotura del esqueleto hidrocarbonado, por lo que cualquier factor capaz de interrumpir la deslocalización electrónica existente, podría producir pérdida de color. Si las condiciones oxidantes son débiles y la energía molecular con la posibilidad, se vuelve a restaurar el orbital molecular con la posibilidad de que la estructura adopte la configuración *cis* o *trans*, en función de que hay habido rotación en el enlace. Si las condiciones son muy severas, el grado de degradación progresa, fragmentándose entonces el pigmento.

En resumen, puede decirse que los factores que influyen en la degradación de carotenoides en sistemas modelos son varios, como por ejemplo estructura del

carotenoide, exposición a la luz, actividad de agua, temperatura, presencia de oxidantes o antioxidantes, presencia de sulfitos, etc. Estos estudios de estabilidad, sin embargo, son más complejos en los alimentos, debido a sus diferencias estructurales y de composición, diferentes tipos de procesos industriales.

#### **5.4.1. 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 la lipoxigenasa, y se presenta generalmente durante el secado de frutas y vegetales. Los primeros datos que existen sobre oxidación de carotenoides son los de Cole ER y Kapur NS (1957), 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, Fennema OR (1993). Al igual que con los lípidos, la oxidación de los carotenoides se acelera por la temperatura, la presencia de metales, luz y enzimas y se reduce por la adición de antioxidantes. Los alimentos que contienen antioxidantes, como tocoferoles o vitamina C, conservan mejor los carotenoides y por tanto, su color.

En los alimentos procesados, el mecanismo de oxidación es complejo y depende de muchos factores. Los pigmentos pueden auto-oxidarse por reacción con oxígeno atmosférico a velocidades que dependen de la luz, el calor, 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 epoxidación, 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 (te, vino) y en otros no (zanahoria deshidratada), Rodríguez Amaya DB, (1997).

Hasta aquí se ha expuesto la acción del oxígeno, sin embargo, también el ozono influye en la estabilidad de los carotenoides. 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) absorbidos en fase sólida (C<sub>18</sub>), Henry LK *et al* (2000). 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 solo 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).

En los últimos años se han realizado una serie de estudios que confirman que las encapsulaciones de carotenoides los hacen más manejables y estables frente a la oxidación, Selim K *et al* (2000).

Los carotenoides pueden actuar como pro- o antioxidantes dependiendo del potencial redox de la molécula y del átomo, 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 del oxígeno, como el oxígeno singlete, Burton GW (1989). En este sentido el  $\beta$ -caroteno posee como característica importante, que lo diferencia de estos de antioxidantes solubles en grasas (como la vitamina E), la de ser más efectivo a bajas presiones de oxígeno.

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

Los carotenoides pueden sufrir oxidación acoplada en presencia de lípidos a velocidades que dependen del sistema. El efecto de la composición lipídica ha sido objeto de varios estudios, sobre todo en productos derivados del pimiento rojo, donde se ha demostrado que el cambio del perfil lipídico de un medio poliinsaturado a otro monoinsaturado mejora la estabilidad de los carotenoides, el estudio de la velocidad de degradación de carotenoides esterificados y no esterificados del pimiento rojo indicó que el que se degrada a menor velocidad es capsorrubina, seguido de zeaxantina, capsantina y  $\beta$ -caroteno. Asimismo, se comprobó que capsantina y capsorrubina y sus esteres se degradaban a la misma velocidad, mientras que los esteres de zeaxantina se degradaban más rápido que el pigmento libre, presumiblemente debido a que dicho pigmento está esterificado principalmente por ácido graso poliinsaturado linoleico, Perez Galvez A, Minguez Mosquera MI (2002).

En otro interesante estudio, Liu MH, Chen BH (1998), se evaluó el comportamiento de clorofila  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno durante tratamientos térmicos en sistemas modelo de lípidos. La tasa de degradación de ambos pigmentos fue mayor en metil estearato, seguida por metil oleato y metil linoleato, Es decir, la reacción entre el carotenoide y los radicales libres se minimiza en presencia de metil linoleato, posiblemente debido a la mayor reactividad de este con el oxígeno. No obstante, en otra investigación, Baloch AK *et al* (1977), se llegó a la conclusión contraria, es decir, que el  $\beta$ -caroteno es más inestable que el ácido linolénico y, por tanto, puede proteger este durante tratamientos térmicos.

Teniendo en cuenta los estudios a los que se ha hecho referencia en este apartado, queda claro que existen resultados contradictorios en relación a la influencia del contenido lipídico en la estabilidad de los carotenoides frente a los procesos oxidativos, y que la presencia de otros compuestos en los alimentos podría influir en los resultados.

#### **5.4.3. Efecto de la estructura**

La diferencia de estabilidad entre los distintos carotenoides está influenciada por su estructura individual, Mortensen A, Skibsteb L (1997). 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 libres, 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 C3 de aquella, cambio que no implica una importante variación de reactividad con respecto al  $\beta$ -caroteno. Se ha comprobado, en cambio, que cuando cada anillo de  $\beta$ -ionona contiene un grupo hidroxilo (como ocurre en la zeaxantina), dicha variación si es patente, Miller NJ (1996).. 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 cataxantina 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, Woodall AA *et al* (1997).

La configuración geométrica de los carotenoides implica también diferencias en cuanto a estabilidad de los mismos. 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, este último isómero es bastante menos sensible a la oxidación, Henry LK *et al* (2000). Por otro lado, la estabilidad de los dos isómeros anteriormente citados no difería significativamente en un medio lipídico en caliente, Henry LK *et al* (1998). 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, Jimenez C, Pick U (1993). 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 Levin G *et al* (1994). 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.

#### **5.4.4. 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 las reacciones de degradación, Minguez Mosquera MI (1997). Por lo general, los carotenos con mayor actividad biológica son aquellos que tienen todos sus dobles enlaces en forma de isómero *trans*, que se transforman parcialmente en la forma de *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, Chen BH, Chen TM (1994) y licopeno debida a diferentes condiciones de calentamiento sigue una cinética de primer orden. En uno de esos estudios se evaluó el efecto del calentamiento de una disolución de  $\beta$ -caroteno-todo-*trans* en horno (50, 100, 125 y 150°C) y a reflujo de 70°C, comprobándose que, en el caso del tratamiento térmico en horno, los isómeros a diferentes temperaturas (60 y 120°C) en sistemas modelo de lípidos con distinto grado de insaturación, conduce a la aparición de 4 isómeros *cis* (9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis*, 13,15-di-*cis*- $\beta$ -caroteno, Liu MH, Chen BH (1998). En cuanto al  $\alpha$ -caroteno, parece ser que su degradación como consecuencia de la acción de la luz o el calor, sigue también 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  $\alpha$ -caroteno. Con respecto al licopeno, en un estudio reciente se ha puesto de manifiesto que como consecuencia del calentamiento de disoluciones modelo de este

pigmento a 50, 100, y 150°C se forman hasta seis isómeros distintos: dos di *cis* (5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis* y 15-di-*cis*-licopeno), lee MT, Chen BH (2002)

Debido a su importancia nutricional como fuente de carotenos, muchos de los estudios de estabilidad de estos compuestos se han realizado en zanahorias y productos derivados. 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 el zumo de zanahorias ha sido objeto de estudio por parte de Bao y Chang (1994). El escaldado (previo a la obtención de pulpa o zumo) en agua hirviendo y en una solución de ácido acético hirviendo durante 5 minutos, produce una retención de estos compuestos del 35.4% y 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 solo 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. 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 (51.3 y 51.2%, respectivamente), Bao B, Chang KC (1994).

También se ha estudiado el efecto del escaldado de zanahorias de la variedad Kintoki en los niveles de licopeno, que es el carotenoide mayoritario en esta variedad, y  $\beta$ -caroteno. El escaldado en agua a diferentes temperaturas (50, 70, 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, Mayer *et al* (2003).

Howard *et al* (1996), estudiaron el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de esterilización (118.3°C durante 34.2min, 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 difiera 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, Pinheiro *et al* (1998), comprobándose que, a menor tiempo y temperatura de cocinado y contacto con agua, mayor es la retención de los carotenoides. De entre las distintas formas de cocinado evaluadas (el vapor, cocidas a

presión, trituradas, etc), la cocción de las zanahorias en agua y sin presión resulto ser la que producía una mayor retención de los carotenoides estudiados. Por su parte, Sulaeman *et al* (2001). Estudiaron los cambios en el contenido de carotenoides en zanahorias escaldadas y posteriormente fritas en diferentes aceites (canola, palma y soja parcialmente hidrogenada) y a diferentes temperaturas (165, 175, 185°C), comprobando que, los niveles de carotenoides diferían significativamente en función de la temperatura, pero no en función del aceite empleado para una misma temperatura.

El efecto de la temperatura en los niveles de carotenoides en otros alimentos también está siendo objeto de estudio en la actualidad. Abushita *et al* (2000). 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 aumento considerablemente con respecto 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*-  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en la pasta descendió considerablemente aumento 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.

En cuanto al efecto de la pasteurización (90°C, 30s) 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-epoxido *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 provitaminicos,  $\beta$ -criptoxantina y  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno, no se observaron pérdidas significativas, Lee HS *et al* (2003).

#### **5.4.5. Efecto de la luz**

La acción intensa de la luz sobre los carotenos induce su ruptura con la consiguiente formación de compuestos incoloros de bajo 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 Carnevale J *et al* (1979), encontrándose que la

instauration de los ácidos grasos protege en esas condiciones a los pigmentos. Existen 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. En cuanto al  $\alpha$ -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*- $\alpha$ - $\beta$ -caroteno, Chen BH, Chen TM (1994) 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, Lee MT *et al* (2002).

#### **5.4.6. Efecto de almacenamiento**

Por otro lado, el efecto de almacenamiento sobre los carotenoides va a depender, indudablemente, de las condiciones en las que se lleve a cabo. En un interesante estudio se han evaluado los cambios que tienen lugar en  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y luteína cuando se mantienen en la oscuridad a diferentes temperaturas (4°C, 25°C y 45°C) y cuando se almacenan a 25°C expuestos a la luz, Tang YC *et al* (2001). Para ello utilizaron carotenoides en polvo liofilizados, obtenidos a partir de zanahorias. Los resultados revelaron que los niveles de las formas todas-*trans* de estos tres carotenoides disminuían al aumentar la temperatura de almacenamiento o el tiempo de iluminación. Los isómeros mayoritarios formados durante el almacenamiento al abrigo de la luz fueron 13-*cis*- $\alpha$ -caroteno, 13-*cis*- $\beta$ -caroteno, y 13-*cis*-luteína.

Wagner y Warthesen (1995), evaluaron la estabilidad de  $\alpha$ - y  $\beta$ -caroteno en polvo de zanahoria encapsulado en diferentes tipos de almidón hidrolizado, comprobando que la degradación de los carotenos estudiados como consecuencia de almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 37°C y 65°C, seguía una cinética de primer orden. No todos los tipos de almidón hidrolizado empleados para encapsular el producto fueron igual de eficientes, comprobándose que el de 36.5 equivalentes de dextrosa mejoraba la retención de carotenos en comparación con el resto (4, 15 y 25 equivalentes de dextrosa). Los resultados del estudio muestran que la encapsulación aumentaba la vida media del producto a 21°C entre 70 y 220 veces, en función del tipo de almidón empleado. En cuanto al efecto de la luz, se observó que la retención de los carotenos estudiados en las muestras expuestas a la luz y en la muestra mantenida en la oscuridad tras ocho semanas era prácticamente la misma, sugiriéndose que la degradación de carotenos en polvo de zanahoria encapsulado se debía fundamentalmente a procesos de autooxidación.

Oruña-Concha *et al* (1995). Evaluaron la evolución de clorofilas a y b,  $\beta$ -caroteno y luteína en judías verdes frescas y escaldadas y en pigmentos de patrón almacenadas durante un año a  $-22^{\circ}\text{C}$ . En las judías verdes no escaldadas se comprobó que los niveles de los pigmentos disminuían sensiblemente durante el primer mes de almacenamiento, estabilizándose después, aunque en el caso del  $\beta$ -caroteno también hubo pérdidas durante el segundo mes antes de la estabilización. En el caso de las judías escaldadas los resultados fueron similares, si bien la retención de carotenoides fue mayor debido a la inactivación de la lipoxigenasa como consecuencia del escaldado. En cuanto a los pimientos de padrón, los niveles de los pigmentos estudiados permanecieron más o menos constantes a lo largo de todo el estudio.

Selim *et al* (2000), estudiaron la cinética de degradación de los carotenoides del azafrán, principalmente crocinas, encapsulados en tres matrices diferentes, pululan y dos polivinilpirrolodonas (PVP), PVP40 y PVP360, comprobando que la encapsulación lo protegía de la oxidación. Las crocinas son carotenoides hidrosolubles, por lo que los ensayos se realizaron a diferentes actividades de agua y en la oscuridad a  $35^{\circ}\text{C}$ . Los resultados del estudio indicaron que la encapsulación con PVP40 era la que reducía en mayor medida la velocidad de oxidación en todas las condiciones de almacenamiento ensayadas.

Choi *et al* (2002), estudiaron la relación existente entre la retención de vitamina C y la estabilidad de los pigmentos presentes en el zumo de naranja durante su almacenamiento durante 7 semanas a  $4.5^{\circ}\text{C}$ . Para ello emplearon muestras de zumo de naranjas de variedad Moro, de color rojizo debido a la presencia de pigmentos antocianos y carotenoides. Comprobaron que la degradación de la vitamina C estaba correlacionada linealmente ( $r>0.93$ ) con la pérdida de antocianos. En el caso de los carotenoides, se observó que las pérdidas eran menos sensibles que en el caso de los antocianos, debido al efecto estabilizante de la vitamina C, que protege a los carotenoides de procesos oxidativos.

## **6. ANTIOXIDANTES**

### **6.1. Definición.**

Se define como Antioxidantes, a las sustancias que usadas en pequeñas cantidades son capaces de inhibir ó retardar la oxidación de otras fácilmente oxidables como los lípidos.

La finalidad de estas sustancias llamadas antioxidantes es detener la oxidación de las grasas de las sustancias químicas, impidiendo que se realice la reacción en cadena, evitando la acción energética y la capacidad de combinación del oxígeno.

## 6.2. Características de los antioxidantes.

A continuación, se indica las características que deben tener los Antioxidantes en general, Roos R (1982).

- No debe ser tóxico, aún en concentraciones mayores a las empleadas en determinados tipos de industrias, tal como la Industria Alimentaria.
- No deben impartir olores, sabores y colores extraños al producto, aún después de un almacenamiento prolongado.
- Debe ser activo en concentraciones extremadamente bajas (rangos de 0,01 a 0,001%).
- Debe ser fácilmente incorporado dentro del sustrato. Su acción antioxidante no debe limitarse a la grasa, a la cual se ha incorporado, sino debe ser transmitida al producto que podría ser preparado de esta grasa.
- Debe ser de fácil adquisición y su costo muy bajo para que el uso de éste no aumente significativamente el precio del producto.
- El antioxidante debe ser fácil de detectar, identificar y dosificar a fin de tener un buen efecto

## 6.3. Clasificación de los antioxidantes.

### 6.3.1. Clasificación 1:

Los antioxidantes se clasifican según algunos autores en tres tipos:

#### 6.3.1.1. Antioxidantes tipo I:

Estos antioxidantes son usados cuando se requieren condiciones de baja coloración y escasa toxicidad, los compuestos fenólicos pertenecen a este tipo siendo la fórmula general la siguiente:

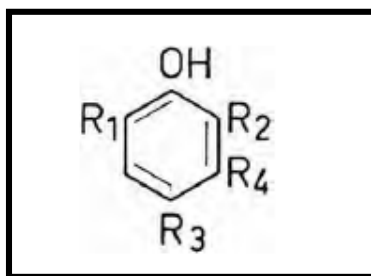




Figura 5: Fórmula general de la estructura fenólica

Los derivados "orto" y "Para", son los más eficaces porque dan radicales libres relativamente estables, debido a la localización del electrón entre dos formas de resonancia, tal como se muestra a continuación.

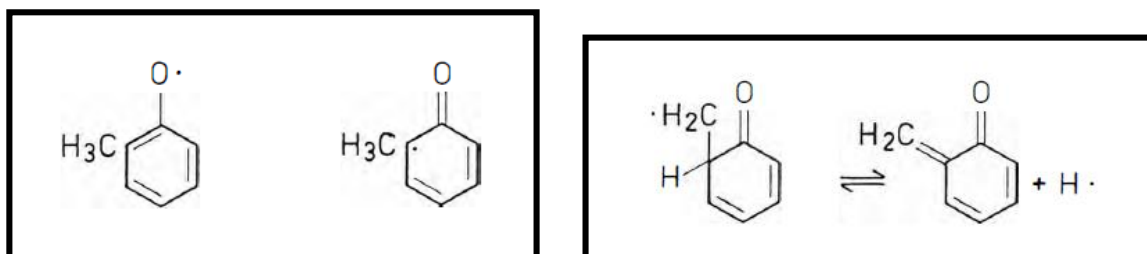


Figura 6: Resonancia de electrones de las estructuras "orto" y "para"

Entre los antioxidantes de tipo I se pueden mencionar:

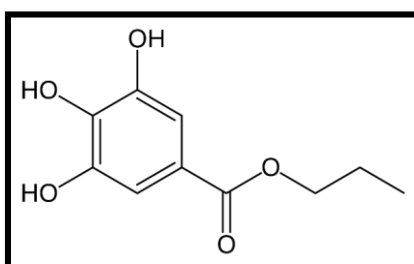


Figura 7: Estructural del Galato de propilo

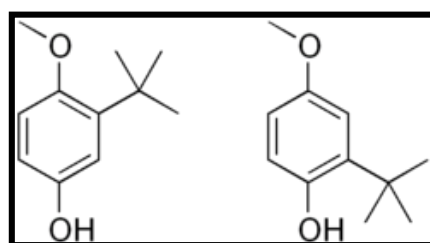
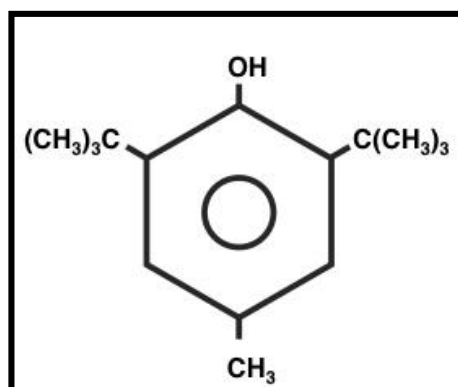


Figura 8: Estructuras "Orto" y "Meta" - Butilhidroxianisol (BHA)



*Figura 9: Estructura del Butilhidroxitolueno (BHT)*

#### **6.3.1.2. Antioxidantes tipo II:**

Los antioxidantes de este tipo son compuestos que actúan impidiendo ó disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son los agentes que secuestran los metales; su acción depende del pH y de la temperatura, ya que la estabilidad de los complejos formados está en relación con estos parámetros. En la forma de complejo, los metales no pueden desarrollar una acción catalítica eficiente, los hidroperóxidos no se descomponen y la consecuente disminución en el número de radicales libres produce una caída en la velocidad de la reacción.

A este tipo de antioxidante pertenece el Etilen -Dianino-Tetracetato (EDTA) que es un agente complejante muy eficaz, pero poco utilizado en la industria alimentaria.

Otro antioxidante que corresponde a este tipo; es el ácido cítrico que es un ácido polivalente, que tiene la propiedad de multiplicar su acción duradera con los antioxidantes fenólicos ó del Tipo I

Por otro lado va a eliminar la acción pro-oxidante ejercida por metales como el hierro cobre, cobalto y manganeso, que son transportadores de electrones, formando complejos tipo quelatos especialmente a través de grupos hidroxílicos.

Es por esta razón que reciben el nombre de secuestrantes y es muy usado especialmente en aceites de animales marinos, de coníferos y de soya.

#### **6.3.1.3. Antioxidantes tipo III:**

En esta categoría se considera básicamente los procedimientos preventivos contra la oxidación, los cuales consisten en establecer determinadas condiciones físicas para una mejor prevención del producto final. Estas condiciones físicas están relacionadas con el contenido de oxígeno, humedad y temperatura y deben ser convenientemente seleccionadas en el momento del envasado o cierre del producto final.

Algunos productos se envasan al vacío ó en atmósferas inertes como el Nitrógeno; en estas condiciones una forma de eliminar o disminuir el oxígeno -

(Debido al fenómeno de oclusión y adsorción) es el empleo de materiales tal como el paladio, que cataliza la formación de agua a partir, del oxígeno residual y del hidrógeno, que

pueda penetrar en el momento del *cierre* del producto. También es importante evitar la ausencia total de aguas en productos deshidratados, afín de bajar la velocidad de oxidación de ciertos compuestos (lipoxigenasas) que se forman en productos que no han recibido pre-cocción.

### **6.3.2. Clasificación 2:**

Otros autores clasifican a los antioxidantes en:

#### **6.3.2.1 Antioxidantes Naturales:**

Esta clasificación pertenece a los tocoferoles (Vitamina E), ácido ascórbico, lecitina, etc; este último es el más eficaz y resistente al calor, su acción antioxidante depende de la concentración y temperatura hasta un cierto nivel.

#### **6.3.2.2 Antioxidantes Artificiales:**

En este tipo de antioxidantes se consideran principalmente la etoxiquina, ampliamente utilizada en la industria de producción de harina de pescado.

### **6.3.3 Clasificación 3:**

Una tercera clasificación que hacen algunos autores sobre los antioxidantes es:

#### **6.3.3.1 Antioxidantes Primarios:**

Pertencen a este grupo los ya citados anteriormente como grupo I, tales como el BHT, BHA, ácido gálico, tocoferoles etc., es decir la misma clasificación indicada previamente.

#### **6.3.3.2 Antioxidantes Sinergistas:**

El efecto antioxidante se incrementa porque constituyen una mezcla de antioxidantes primarios y sintéticos, considerándose el efecto antioxidante de cada uno de sus componentes.

## **7 IMPORTANCIA DEL USO DE ANTIOXIDANTES**

### **7.1 Harina de pescado y conservación.**

El Perú, por su ubicación geográfica posee un litoral con condiciones especiales que hacen de su mar un emporio de especies marinas, caracterizándolo como país pesquero desde tiempos remotos.

La industria pesquera en el país se inicia con la llamada industria conservera, desarrollándose ésta notablemente en los años 50; esto dio lugar a un desarrollo incipiente de la industria de harina de pescado proveniente específicamente de los residuos de la materia prima usada en la industria de la conservería.

Posteriormente a partir del año 1951 se inicia la pesca de la anchoveta con 6,800 toneladas, empleándose ésta para la producción de harina de pescado, 10 años más tarde, en 1961, se pescan en el litoral 4 579 000 toneladas de anchoveta, manteniéndose el país a partir de ese momento como primer productor mundial de harina de pescado; pocos años después se llega a la cifra record de 10 276 593 toneladas en el año 1971.

Paralelamente a la industria de la harina de pescado se desarrollan otras industrias conexas como por ejemplo la industria naval en la construcción de lanchas pesqueras; la industria de cabos, redes, sacos y montaje de plantas metalmecánicas, etc. Todo este desarrollo significó evidentemente un auge de la industria y el comercio en todo el litoral y de esta manera fueron creados muchos puertos y fábricas.

Este crecimiento de la industria inconsistente con los recursos existentes, trajo como consecuencia la crisis de la industria pesquera, lo que se evidenció con la baja en la captura de la anchoveta que se retiró del litoral. En 1973 el estado se hace cargo de toda la industria productora de harina y se crea Pesca-Perú. Se toman medidas preventivas a fin de racionalizar la capacidad instalada de esta industria con ajustes periódicos y con el objeto de llegar al punto óptimo de número de fábricas a lo largo de todo el litoral peruano.

En esta situación se buscan nuevas especies marinas con el fin de sustituir a la anchoveta y es entonces que aparecen la sardina y el jurel principalmente, y en mucha menor proporción la caballa

Durante los años 1976, 1977 y 1978 se reflota nuevamente la industria harinera en nuestro país, colocándose ésta nuevamente en un sitio expectante en el mundo.

Estas nuevas especies dan además un gran impulso a la industria conservera, y otras especies como la merluza promueven la industria del pescado congelado.

Durante esta época se inician inversiones en todo el sector pesquero, y se genera la recuperación de este campo, creándose también empresas conexas, que se dedican a la crianza de langostinos, truchas, etc.

El panorama actual en nuestro país es bastante prometedor; en este campo se están desarrollando otras industrias tales como las conserveras, congelados, pisciculturas, además de la harina y aceite de pescado, Elisa Medina (1989).

## 7.2 Harina de pescado.

Se conoce con este nombre al producto industrial que se obtiene por el proceso de reducción del contenido de agua, aceite del pescado y/o partes del pescado sin agregar sustancias extrañas (salvo aquellas que tiendan a mantener la calidad original del producto), y mediante operaciones de cocción, prensado, secado y molienda.

La harina de pescado está compuesta de proteínas, grasa, cenizas, materia mineral y humedad (agua), aproximadamente en el siguiente porcentaje, Cerper S.A. (2017):

Tabla 1:

*Rangos del proximal de los tipos de calidad de harinas de pescado*

Componente	Unidad	Rango	Super Prime	Prime	Estándar (tradicional)
Proteínas	%	min.	68-70	67-70	64-68
Grasa	%	max.	10	10	10
Humedad	%	min-max	7-10	7-10	10
Ácidos Grasos	%	max.	7,5	10	-
Ceniza	%	min-max	13-16	14-17	-
Sal y Arena	%	max.	4	5	5
TVN (índice volátil total)	mg / 100grs	max.	100	120	-
Histamina	PPM	max.	500	1000	-
Digestibilidad	%	min.	94	94	-
Antioxidante	PPM	min.	150	150	150

alidad de la

las que se  
nitrógeno y

frecuentemente azufre.

Estas proteínas están compuestas de aminoácidos en proporciones, variadas pudiendo contener hasta 23 aminoácidos diferentes. Como es de conocimiento, el cuerpo animal puede sintetizar rápidamente 12 de los 23 aminoácidos que contiene.

La harina de pescado, contiene un elevado número de aminoácidos, entre los cuales se encuentra los once aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el cuerpo animal, el porcentaje de aminoácidos, que contiene la harina de pescado es tal, que permite formular un alimento balanceado como cualquier otra harina de origen animal o vegetal. Es más, la harina de pescado contiene cuatro aminoácidos que son: lisina, triptófano,

metionino y cistina, en los cuales el resto de harinas vegetales ó animales son deficientes.

Además de los compuestos señalados anteriormente, la harina de pescado es excelente como fuente de energía, calcio, fósforo, trazas minerales, vitaminas y un factor no identificado de crecimiento, el cual es sumamente importante para el desarrollo y crecimiento de los animales.

Cabe mencionar que otro producto de la industria pesquera en sí es el Aceite de Pescado; el cual es un subproducto en el proceso de reducción de la anchoveta ó sardina.

El aceite de pescado en su estado natural es inestable y está sujeto a la oxidación, debido principalmente a la presencia de agua y sólidos, estos elementos provocan la hidrólisis del aceite almacenado, es decir el desdoblamiento de la molécula tri-glicerina y ácido graso libre, aumentando el contenido de ácidos grasos, lo que da lugar a un aumento de las pérdidas en el momento de la refinación

La harina de pescado es un material heterogéneo, debido principalmente a la variedad de la materia prima que la origina así como por la mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos que contiene, es por esta razón que es sumamente necesario realizar una homogenización una vez que las muestras hayan llegado al laboratorio de control de calidad, y ésta homogenización se realizará previamente a la designación de las muestras para ensayos físicos ó químicos de manera que se pueda obtener en lo posible una selección representativa de la harina muestreada.

## **8 PROCESO DE OBTENCIÓN DE LA HARINA DE PESCADO.**

Según Corporación Pesquera Inca S.A.C (2017).

### **8.1 Captura de la materia prima**

La captura de la materia prima (anchoveta, sardina, jurel, caballa, etc.) se realiza con embarcaciones especializadas.

### **8.2 Descarga, transporte y pesaje**

Una vez terminada el trabajo de pesca, las embarcaciones se dirigen a entregar su captura a la fábrica, lo hacen por intermedio de las "chatas" absorbentes, que se encuentran ubicados en el mar cerca de 80 metros de la playa.

Estas "chatas", son plataformas flotantes equipadas con bombas y diseñadas para succionar el pescado de las embarcaciones e impulsarlo a la fábrica, a través de tuberías de fierro de 16" de diámetro tendidas bajo el agua. El pescado es bombeado con una proporción de 2/1 (agua/pescado).

Para efectuar el bombeo del pescado, se necesita adicionarle agua, la que debe ser eliminada antes del pesaje, esto da como resultado la instalación del equipo desaguador, usándose en cada línea de descarga. Este equipo tiene un desaguador vibratorio y un transportador de malla, el cual entrega el pescado a la tolva pesadora de anchoveta.

Esta tolva pesadora, tiene un compartimiento doble de un metro de altura, totalmente cerrada y equipada con cierres de cuchilla, la que previa mente ha sido ubicada para control del peso de la captura.

### **8.3 Almacenamiento de la materia prima**

Una vez pesada la materia prima, es descargada en pozos de concreto de piso inclinado, para un mejor escurrimiento del agua residual, en donde se almacena la materia prima para su procesamiento en la planta.

La capacidad de almacenamiento de los pozos, depende de la capacidad de procesamiento de la planta.

### **8.4 Cocinado**

De los pozos de almacenamiento, el pescado es transportado a las cocinas por medio de gusanos helicoidales o rastras. El cocinado se realiza con vapor, usándose el sistema mixto, es decir vapor directo o indirecto, alcanzándose una temperatura de 95 a 100°C

El cocinado tiene por objeto, coagular las proteínas para permitir su tratamiento posterior en las prensas y romper la pared de las células - para dejar que el aceite pueda ser eliminado en la etapa de prensado.

El trabajo en los cocinadores es continuo, siendo el tiempo de permanencia en los mismos entre 10 y 15 minutos.

### **8.5 Prensado**

El pescado cocinado es alimentado a uno de los tambores rotativos. Construidos exteriormente con planchas de huecos, con el objeto de reducirla parte líquida favoreciendo de este modo el prensado posterior.

La operación de prensado, es una de las fases más importantes y se lleva a cabo en prensas de doble tornillo.

La prensa consiste en dos tornillos de construcción sólida, alojados en una caja, cuya superficie exterior está formado por mallas con huecos pequeños.

El tornillo varía de peso y de diámetro con el objeto de admitir un volumen alto de carga con lo que efectúa una compresión de la carga contra la malla exterior, permitiendo la fuga de caldo a través de los huecos de las mallas, obteniéndose 52% de humedad. Extrayéndose aproximadamente el 70% de agua y aceite o caldo de prensa.

Con resumen podríamos decir que en la etapa del prensado se elimina el líquido y se forman los sólidos obteniéndose dos productos: uno el queque de prensa, y el otro el caldo de prensa.

## **8.6 Recuperación de sólidos**

El caldo de prensa, proveniente de los tambores rotativos y de las prensas (70% del pescado cocinado) contiene sólidos en suspensión, aceite y agua. A fin de recuperar los sólidos en suspensión; el caldo de prensa, pasa a través de máquinas centrífugas horizontales denominados "separadoras". El producto sólido recuperado denominado queque de separadoras, contiene residuos de aceite y agua, siendo la humedad promedio de este producto de 64%, el queque de separadoras es alimentado junto con el queque de prensas en el pre-secador.

## **8.7 Recuperación del aceite**

El caldo de separadoras que se calienta hasta una temperatura de 95°C, se alimenta a las máquinas denominadas "centrífugas", de donde se obtienen dos productos, el primero es el aceite y el segundo el agua de cola, la que contiene sólidos en suspensión, aceite y agua.

El aceite obtenido se almacena para su venta posterior.

## **8.8 Tratamiento del agua de cola**



El agua de cola, obtenida en la etapa anterior, se calienta a 100°C y se alimenta a evaporadores triples, en donde se concentra hasta obtener un producto denominado "Concentrado de agua de Cola", el que contiene 45% de sólidos totales.

El concentrado obtenido se almacena en tanques, de los cuales se alimenta por medio de bombas, a la línea que sale del pre-secador.

### **8.9 Secado**

El secado se efectúa por el sistema en serie, haciendo uso de dos secadores.

Cada secador consta de una cámara de combustión, un cilindro rotativo giratorio y un extractor de gases.

El objeto del secado, es reducir el contenido de humedad del queque, para obtener un producto final, con un contenido de humedad entre 8 y 10%.

El queque de entrada al pre-secador o primer secador, constituido por el queque de prensa y el de separadores, con un contenido promedio de humedad de 55%, es secado aprovechando el calor sensible de los gases de combustión y el exceso de aire caliente, hasta obtener un producto final en ésta primera etapa, con un contenido de humedad de 32%

El producto del primer secador, se mezcla con el 100% del concentrado de agua de cola, obteniéndose un producto final con un contenido de humedad de más o menos 38% humedad con lo que ingresa al post-secador o segundo-secador, en donde el contenido de humedad se reduce a 8-10%.

La temperatura de los gases, a la entrada de ambos secadores, no excede de 500°C, saliendo los mismos a 85°C.

### **8.10 Molienda**

Con la finalidad de reducir y uniformizar el tamaño de las partículas de harina, el producto que sale del segundo secador, se alimenta a dos molinos horizontales de martillos, los cuales giran entre 1 000 a 1 800 r.p.m.

Para no sobrecargar a dichas máquinas, previamente producto se en realiza una clasificación del máquinas llamadas zarandas, alimentándose a los molinos las partículas gruesas.

### **8.11 Transporte neumático**

De los molinos (con partículas gruesas) y de las zarandas (partículas finas), la harina se alimenta a los ventiladores centrífugos, que transportan la harina hasta la zona de ensaque, estos ventiladores sirven además, como enfriadores debido al gran volumen de aire que utilizan, enfriándola durante todo el recorrido.

### **8.12 Ensaque**

La harina transportada por los ventiladores, se colecta en dos ciclones, de los que se alimenta a un transportador (gusano helicoidal), el que a su vez alimenta ésta a un equipo denominado "dosificador de antioxidante".

En este equipo, se adiciona a la harina un producto que inhibe la oxidación de la grasa presente, evitando su descomposición, así como desapareciendo el peligro de combustión espontánea durante el almacenamiento de la harina.

Del dosificador de antioxidante, la harina es transportada a las balanzas de pesaje de harina, en donde automáticamente se pesa 50 kilos usándose envases de polipropileno.

Para facilitar el transporte marítimo se comprime la harina en gránulos o pellets, esto en envases especiales, y se almacena a granel para el embarque en esta forma. Cerca de un 35% de la harina es comercializada en pellets, por requerirlo así el mercado mundial.

Una vez pesada y ensacada la harina, se cose el envase y se transporta a la zona de almacenamiento, donde se almacena en rumas de 50 toneladas.

## **9 LA OXIDACION DE LAS GRASAS Y SUS CONSECUENCIAS EN LA CONSERVACION DE LAS HARINAS DE PESCADO.**

### **9.1 Oxidación de las Grasas**

El concepto de oxidación se entiende químicamente como la pérdida de valencias positivas o ganancia de valencias negativas de una sustancia, en otras palabras podemos decir una pérdida o ganancia de electrones, que significan cambios en la estructura de la molécula, confiriéndole a éstas propiedades diferentes.

La oxidación significa un proceso químico que, al realizarse en ácidos grasos ó glicéridos se trata de la fijación de oxígeno; esta fijación puede realizarse en carbonos terminales ó centrales, originando oxidación tipo aldehídico o cetónico.

La oxidación va a significar el ingreso del oxígeno en la molécula, desplazar al hidrógeno ó proceder a la ruptura de los dobles o triples enlaces; en otros términos es más fácilmente oxidable un ácido graso en su doble o triple enlace y este grado de

instauración varía de acuerdo a la longitud de la cadena. Los ácidos grasos ofrecen gran capacidad de retención o fijación de oxígeno y dan lugar a la formación de los llamados "puentes dióxido". Estos conceptos nos indican que un cuerpo o sustancia constituida únicamente por grasa, ó que encierra en su composición química porcentajes notables de grasa es fácilmente oxidable.

La diferencia de oxidación y rancidez es que la oxidación es un proceso de fijación del oxígeno y la rancidez es la descomposición de los peróxidos originando diferentes compuestos de sabor y olor desagradables; es decir primero ocurre la oxidación con la formación de los hidroperóxidos y luego los peróxidos, los cuales a determinada concentración inician la ruptura de su molécula (rancidez) originándose diferentes compuestos como: carbinol, metil-etil cetona, etc. que son los que dan olor y sabor desagradable a la grasa, Soto Rodríguez E (1966).

## **9.2 Consecuencias de la oxidación en la conservación de las harinas de pescado**

Una de las consecuencias de la oxidación de las grasas en la conservación de la harina de pescado es la influencia en su carácter organoléptico, debido a la formación de peróxidos, que disminuyen su valor comercial.

Por otro lado las grasas oxidadas presentes en la harina de pescado, se combinan con las proteínas, produciendo un oscurecimiento de ésta, con la consecuente disminución de su valor comercial.

Finalmente, como consecuencia de la oxidación de las grasas se produce liberación de energía, que determina el calentamiento de la grasa presente en la harina, eleva la temperatura de ésta y se produce la auto combustión, en la mayor parte de los casos se realiza la auto combustión a consecuencia de la oxidación violenta de la grasa.

La oxidación se favorece por la temperatura de la harina que sale del secador y el enfriamiento lento en la etapa siguiente; si este enfriamiento fuera violento a la salida del secador (inyección de aire frío) se podría evitar la oxidación inmediata.

El problema de la oxidación es uno de los desafíos que tiene actualmente la industria de la harina de pescado, por ello el uso de antioxidantes comerciales está en la actualidad bastante difundido.

## **10 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

## 10.1. Extracción y determinación de $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*

**10.1.1. Principio del método.** El método se basa en la extracción de  $\beta$ -caroteno con una solución de hexano:acetona a una proporción de (4:6) respectivamente a temperatura ambiente, sonicación, evaporación, reconstitución con acetonitrilo y filtración del extracto obtenido con filtro de jeringa PVDF de 0.22  $\mu$ m y posterior cuantificación en fase reversa por Cromatografía Líquida, con detector UV-VIS a una longitud de onda de 450nm.

### 10.1.2. Equipos, Materiales y reactivos.

#### 10.1.2.1. Equipos.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector UV-VIS



Figura 10: UHPLC UltiMate 3000 Rapid Separation Binary System Thermo Scientific



Figura 11: Detector UV-VIS UltiMate 3000 Thermo Scientific

- Columna C18 de 150 x 4.6mm y 5 um y Guarda columna C18, 5 um



*Figura 12:* Columna LiChrospher100 Hibar RP-18 150 x 4.6mm, 5um Merck Millipore

- Balanza analítica de 0.1mg de resolución



*Figura 13:* Balanza analítica Metler Toledo

- Balanza microanalítica de 0.001mg de resolución



Figura 14: Mettler Toledo Escala de Laboratorio de equilibrio micro MX5; Max 5.1g  
 $d=1\mu\text{g}$

- Ultrasonido



Figura 15: Branson M5800H 2.5G limpiador ultrasónico con temporizador mecánico & Calentador CPX-952-517R

- Evaporador de Nitrógeno



Figura 16: Evaporador de nitrógeno con termostato.

- Estufa



*Figura 17:* Estufa de Memmert de 110 L, modelo UN 110

- Equipo de filtración al vacío



*Figura 18:* VWRI87006-068 | sistema de filtración en vacío, membrana P.E.S, estéril, 0.45  $\mu$ m, capacidad 150/250 ml, PQ. x 12

#### **10.1.2.2. Reactivos.**

- Agua ultrapura para uso en HPLC
- Metanol grado HPLC
- Acetonitrilo grado HPLC
- Hexano grado HPLC
- Tetrahidrofurano grado HPLC
- Acetato de Amonio ACS
- Acetona ACS
- Estándar de  $\beta$ -caroteno  $\geq 95\%$  (tipo II sintético)

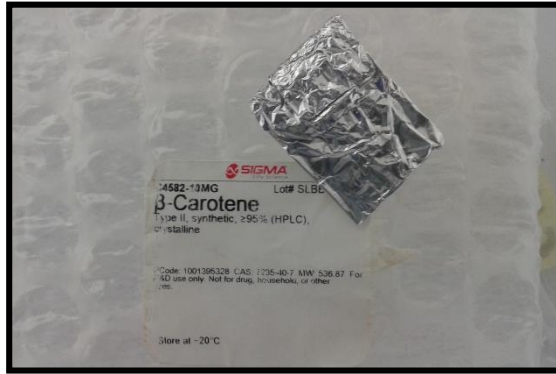


Figura 19: Estándar de  $\beta$ -caroteno Tipo II, sintético  $\geq 95\%$  (HPLC), cristalina

### 10.1.2.3. Materiales.

- Micropipetas de volumen variable de 100 y 1000  $\mu\text{L}$
- Pipetas volumétricas de vidrio de 1, 3, 5, 8 y 10 ml..
- Probeta de 100, 500 y 1000 ml
- Matraz volumétrico ámbar de vidrio de 10 y 100 ml.
- Filtros de jeringa PVDF de 0.22  $\mu\text{m}$  de 25mm de diámetro.
- Jeringas de plástico
- Viales ámbar de vidrio de 2 ml para HPLC

### 10.1.3. Desarrollo.

#### 10.1.3.1. Condiciones cromatográficas.

<b>Columna</b>	LiChrospher100 Hibar RP-18 150 x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$
<b>Flujo</b>	1.7 mL/min
<b>Temperatura de Columna</b>	Ambiente
<b>Detector</b>	UV-VIS
<b>Volumen de inyección</b>	10 $\mu\text{L}$



<b>Tiempo de corrida</b>	10 min
<b>Longitud de onda</b>	450nm
<b>Sistema</b>	isocrático
<b>Fase móvil</b>	Tetrahidrofurano:Metanol:CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> al 1% (68.4:22.0:6.8:2.8)
<b>Tiempo de retención</b>	8min ±10%

Tabla 2:

*Condiciones cromatográficas para el análisis de β-caroteno*

### **10.1.3.2. Preparación de soluciones.**

#### **10.1.3.2.1 Solución de acetato de amonio 1%**

Pesamos 1g de Acetato de Amonio, disolvimos con agua Ultrapura y enrasamos en un matraz volumétrico de 100mL.

#### **10.1.3.2.2. Solución Stock de B-Caroteno (10 µg/ml)**

Pesamos 1 mg de estándar de β-caroteno, disolvimos con acetonitrilo y enrasamos en un matraz volumétrico de 100mL.

#### **10.1.3.2.3. Solución intermedia de B-Caroteno (1 µg/ml)**

Retiramos 1ml de la solución stock de β-Caroteno estándar a un matraz volumétrico de 10 ml y enrazamos con acetonitrilo.

#### **10.1.3.2.4. Solución de extracción Acetona:Hexano(4:6)**

En una probeta de 250 ml medimos 100 ml de Acetona y vertimos en un matraz volumétrico de 250 ml y enrazamos con hexano.

#### **10.1.3.2.5. Preparación de la curva de trabajo de B-Caroteno**

Preparamos los estándares, diluyendo con acetonitrilo en viales de 1.5 ml, de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 3: *Proporción de preparación para la curva de calibración.*

<b>Concentración del Estándar (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Volumen de solución estándar Stock de B-Caroteno (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Volumen de Acetonitrilo (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>Volumen final (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<i>0.050</i>	<i>50</i>	<i>950</i>	<i>1 ml</i>
<i>0.150</i>	<i>150</i>	<i>850</i>	<i>1 ml</i>
<i>0.250</i>	<i>250</i>	<i>750</i>	<i>1 ml</i>
<i>0.400</i>	<i>400</i>	<i>600</i>	<i>1 ml</i>
<i>0.500</i>	<i>500</i>	<i>500</i>	<i>1 ml</i>

#### **10.1.3.2.6. Preparación de fase móvil**

En una probeta de 1000 ml, medimos 684 ml de Acetonitrilo, 220 ml de Tetrahidrofurano, 68 ml de Metanol y 28 ml de acetato de amonio al 1%, Trasvasamos la mezcla a un frasco de 1L limpio y agitamos. Filtramos al vacío con filtro de membrana de Nylon de 0.47 mm y 0.22  $\mu\text{m}$ , Se desgasificamos y colocamos en los reservorios del equipo destinados para la fase móvil.

#### **10.1.3.3. Preparación de la muestra.**

**10.1.3.3.1.** Extraemos con una espátula la parte comestible de la alcachofa que son las brácteas internas blandas, denominados coloquialmente “corazón de alcachofa”, y las licuamos para homogenizar toda la droga vegetal.

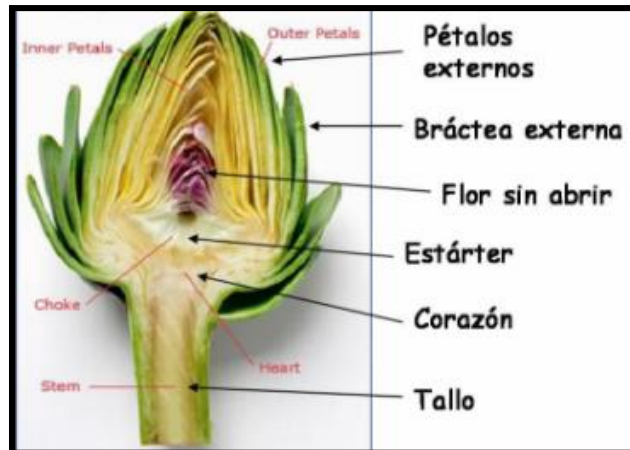


Figura 20: Partes de la *Cynara scolymus* (alcachofa)

10.1.3.3.2. Llevamos a una estufa convencional a 50°C por 36 horas. Si es necesario calentar más tiempo hasta llevar completamente a sequedad.

10.1.3.3.3. Retiramos las muestras y Molemos en mortero, luego cernimos por malla 40 y almacenamos en frasco ámbar ó envolvemos en papel aluminio y llevamos a refrigeración a 6°C.

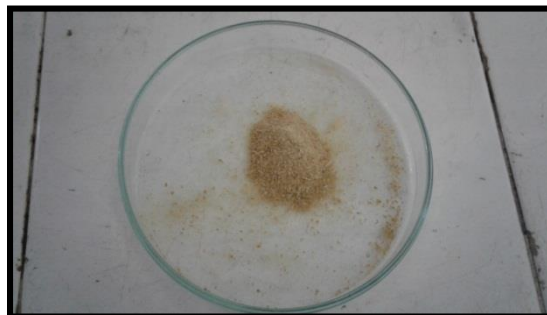


Figura 21: extracto seco de la bráctea interna blanda de la *Cynara scolymus* (alcachofa)

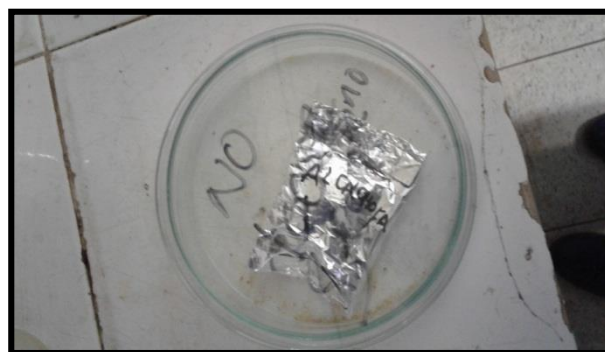


Figura 22: Envoltura de papel aluminio como envase de protección a la luz.

10.1.3.3.4. Pesamos a oscuridad 50 mg de muestra en un vaso precipitado de 100 ml.

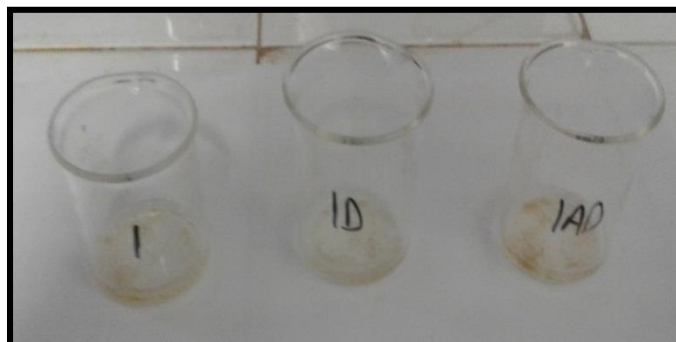


Figura 23: Pesado de muestra con los controles de calidad que son muestra (1), muestra duplicado (1d) y adición (1AD).

10.1.3.3.5. Agregamos 10 ml de la solución de extracción al vaso precipitado, trasvasamos a matraces volumétricos de 25 ml respectivamente y sonicamos por 5 minutos.



Figura 24: Muestras llevadas a ultrasonido y vertidas en los matraces volumétricos ámbar de 25 ml

10.1.3.3.6. Secamos con nitrógeno hasta sequedad o esperamos a que evapore a temperatura ambiente.



Figura 25: Secado con nitrógeno de las muestras de *Cynara scolymus* (alcachofa) con el solvente de extracción.

**10.1.3.3.7.** Reconstituimos con 2 ml de acetonitrilo y sonicamos por 2 min.

**10.1.3.3.8.** Con la ayuda de una jeringa de plástico tomamos el extracto y filtramos usando filtros de jeringa PVDF 0.22 µm y colocamos en viales ámbar.

#### **10.1.3.4. Cálculos.**

Hacemos los cálculos respectivos con la ayuda del software del equipo, la fórmula que aplica es la siguiente:

$$\beta\text{-CAROTENO } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{\text{Am} \times \text{Cs} \times \text{D}}{\text{As} \times \text{W}}$$

**Donde:**

**Am** = Área del pico del analito de interés en la muestra

**As** = Área del pico del analito de interés en el estándar

**Cs** = Concentración del analito de interés en el estándar (µg/ml)

**D** = Factor de dilución

**W** = Peso de la muestra (mg)

## **10.2. Prueba de la capacidad antioxidante del β-Caroteno de la bráctea interna extraída de la *Cynara scolymus* en la Harina de pescado.**

### **10.2.1. Principios tomados para la prueba de la capacidad antioxidante del β-Caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*.**

Para poder comprobar la capacidad antioxidante del β-caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*, se han realizado tres parámetros importantes que son el análisis de Proteína, Nitrógeno total volátil y histamina, que permitirá saber en qué condiciones de calidad se encuentra la harina de pescado en función a la concentración agregada de β-caroteno y tiempo de almacenaje de la harina de pescado.

## 10.2.2. Equipos, Materiales y Reactivos.

### 10.2.2.1. Equipos.

- Balanza analítica de 4 decimales.

### 10.2.2.2. Materiales.

- 4 placas Petri
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{l}$
- Desecador
- Vaguetas

### 10.2.2.3. Reactivos.

- Hexano
- Acetona
- Metanol

## 10.2.3. Procedimiento

**10.2.3.1.** Extraemos el  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* (alcachofa) cómo se realizó anteriormente en la extracción de hasta reconstituir con metanol.

**10.2.3.2.** Pesamos en 4 placas Petri aproximadamente 1g de harina de pescado.



*Figura 26:* Harina de pescado

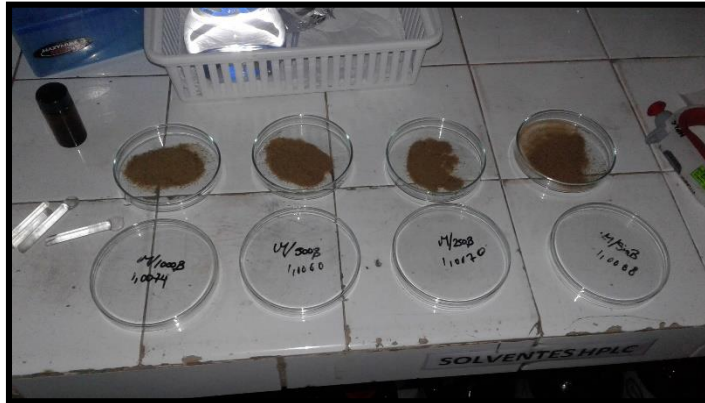


Figura 27: se muestra las muestras pesadas en las placas Petri, etiquetadas según la cantidad de  $\beta$ -caroteno que se agregó.

**10.2.3.3.** Agregamos 0  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000ul de extracto de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* respectivamente.

**10.2.3.4.** Se almaceno por 30 días a temperatura ambiente y en oscuridad.

### **10.3. Análisis de calidad de la harina de pescado sometida al efecto antioxidante del $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*.**

Pasado el tiempo del almacenaje de las muestras de harina de pescado, se realizamos los análisis correspondientes para observar que tanto ha variado las características de la harina de pescado.

#### **10.3.1. Análisis de proteína por el método DUMAS de la harina de pescado.**

##### **10.3.1.1. Principio.**

El nitrógeno liberado por combustión a alta temperatura con oxígeno puro se mide por conductividad térmica y se convierte mediante un factor numérico apropiado a su equivalente en proteínas.

##### **10.3.1.2. Equipos.**

Usamos un equipo diseñado para medir nitrógeno por combustión y está equipado para proporcionar las siguientes condiciones.

- a) Horno.- mantiene una temperatura mínima de 950°C para pirolisis de un porción de prueba con oxígeno puro de (99.90%), algunos sistemas pueden necesitar temperaturas más altas.

- b) Sistema de aislamiento.- aísla gas nitrógeno liberado de otros productos de combustión para medidas subsiguientes con un detector de conductividad térmica. Se puede necesitar o incluir un diseño, un dispositivo para convertir productos NO, a nitrógeno o medir nitrógeno como NO<sub>2</sub>.
- c) Sistema de detección.- interpreta la respuesta del detector como el porcentaje de nitrógeno en w/w. Debe incluir características tales como calibración con el material estándar, la determinación del blanco y la compensación de presión barométrica. Cualquier calibración requerida, debe estar basada en el porcentaje teórico de nitrógeno del material estándar primario orgánico puro tal como el EDTA.

#### **10.3.1.3. Requerimientos para el funcionamiento.**

El sistema del equipo tiene siguientes especificaciones mínimas de funcionamiento.

- 1) El sistema es capaz de medir nitrógeno en materiales de alimentos para animales que contengan 0.2-20% de nitrógeno.
- 2) La precisión del sistema se demuestra haciendo 10 determinaciones sucesivas de nitrógeno con ácido nicotínico y 10 determinaciones sucesivas de lisina-HCl, Los promedios de las determinaciones deben estar dentro  $\pm 0.15$  de los valores teóricos respectivos. Con desviación estándar  $\leq 0.15$ . El estándar de triptófano puede ser sustituido por lisina-HCl.
- 3) El tamaño de partícula adecuado de molienda es aquella que da una desviación estándar relativa (DER)  $\leq 2.0\%$  para 10 determinaciones sucesivas en mezclas de grano de maíz y soya (2+1) que ha sido molidas para el análisis DER, % =  $(DE/promedio \%N)*100$

El tamaño de partícula (ca 0.5mm) requerido para alcanzar esta precisión que debe ser usado en todas las muestras como mezclas de alimentos para animales y otros materiales heterogéneos.

El equipo usado es el Thermo Scientific Flash 2000 N/Protein





*Figura 28:* Equipo Dumas Thermo Scientific Flash 2000 N/Protein para la determinación de proteínas

#### **10.3.1.4. Condiciones.**

- Horno izquierdo: 950°C
- Horno derecho: 840°C
- Presión de Helio: 250 PSI
- Presión de Oxígeno: 300 PSI
- Flujo de oxígeno: 300 ml/min
- Flujo de helio carrier: 140 ml/min
- Flujo del helio referencia: 100 ml/min

#### **10.3.1.5. Procedimiento.**

**10.3.1.5.1.** Luego de haber pasado los 30 días de almacenaje de la harina de pescado retiramos y pesamos 100 mg de muestra por triplicado de cada placa Petri con láminas de estaño.



*Figura 29:* tinfoil de estaño

**10.3.1.5.2.** Pesamos 3 capsulas de 100 mg de lisina, con láminas de estaño para la curva de calibración.

**10.3.1.5.3.** Colocamos en el carrusel de muestras y esperamos los resultados.

### **10.3.2. Análisis de Nitrógeno total volátil de la Harina de pescado**

#### **10.3.2.1. Términos y definiciones.**

TVN nitrógeno volátil (amoniaco) total, es el resultado de la descomposición de la harina de pescado ocurriendo un proceso de autólisis donde se acumula en el musculo del pescado amoniaco y diversas amina como la dimetilamina y trimetilamina de carácter básico y volátil.

#### **10.3.2.2. Equipos, Reactivos y Materiales.**

##### **10.3.2.2.1. Equipos.**

- Balanza analítica de 4 dígitos
- Equipo de digestión y destilación.



*Figura 30:* Equipo de destilación de 12 balones para el análisis de TVN.

##### **10.3.2.2.2. Reactivos.**

- Oxido de magnesio
- Piedra pómez
- Ácido sulfúrico 0.1N

- Rojo de metilo
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Agua desionizada

#### **10.3.2.2.3. Materiales.**

- Matraces de 250 ml
- Pipeta volumétrica de 10 ml
- Microbureta de 10 ml
- Vaguetas
- Balones de 800 ml
- Probeta de 200 ml

#### **10.3.2.3. Procedimiento.**

**10.3.2.3.1.** Agregamos 2 g de Oxido de magnesio calcinada y 1g de piedra pómez dentro del balón kjeldahl de 800 ml.

**10.3.2.3.2.** Adicionamos de 3 a 3.2g de muestra (Harina de pescado).

**10.3.2.3.3.** Adicionamos 200 ml de agua desionizada

**10.3.2.3.4.** Colocamos el balón kjeldahl y su contenido en el equipo de destilación Kjeldahl

**10.3.2.3.5.** Recepcionamos el destilado en el matraz conteniendo 10 ml de ácido sulfúrico 0.1N

**10.3.2.3.6.** Destilamos hasta 100 ml

**10.3.2.3.7.** Paralelamente realizamos el ensayo con un blanco.

**10.3.2.3.8.** Titulamos el destilado con hidróxido de sodio 0.1N para la muestra, muestra duplicado y blanco.

### **10.3.3. Análisis de Histamina de la harina de pescado**

#### **10.3.3.1. Principio del método.**

El análisis de histamina en la harina de pescado se realizado por medio de una extracción en medio ácido, para luego hacer una Derivatización pre-columna, haciendo una reacción de Danilación, para formar agentes fluorescentes donde serán identificados por un equipo de HPLC acoplado a fluorescencia.

#### **10.3.3.2. Equipos, Materiales y Reactivos.**

##### **10.3.3.2.1. Equipos.**

- Baño María, calibrado a 60°C
- Equipo de filtración con membrana filtrante de 5  $\mu$ m
- ultrasonido
- Equipo HPLC acoplado a Fluorescencia



*Figura 31:* Equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia Elite Lacrom con cuatro canales acoplado a fluorescencia.

#### **10.3.3.2.2. Materiales.**

- Viales ámbar de 5 ml con tapa
- Viales ámbar de 1 ml
- Micropipetas de 100-1000 ul y 10 ml
- Jeringas de 5 ml
- Acrodiscos de PVDF de 0.2 y 0.5 um
- Fialas ámbar de 100 ml.

#### **10.3.3.2.3. Reactivos y preparación de soluciones**

**10.3.3.2.3.1.** Solución de bicarbonato de sodio 0.25 M.- Pesamos 5.25 g de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) y llevamos a un matraz de 250 ml, aforando con agua para análisis filtrada.

**10.3.3.2.3.2.** Cloruro de dansilo 10 mg/L.- Pesamos 50 mg de cloruro de dansilo y llevamos a matraz de 5 ml, aforando con acetona p.a. Luego llevamos a un envase ámbar, guardamos bien cerrado y refrigerado para evitar que se evapore.

**10.3.3.2.3.3.** Solución de ácido tricloroacético (TCA) 10%.- Pesamos 50g de ácido tricloroacético, colocamos en un matraz aforado de 500 ml y llevamos a volumen con agua para análisis filtrada. En caso de usar estándar interno se debe agregar 0.125g de efedrina p.a. antes de aforar.

**10.3.3.2.3.4.** Acetona

**103.3.2.3.5.** Estándar de Histamina

#### 10.3.3.2.4. Condiciones cromatográficas:

- Fase móvil: Gradiente

Tabla 4:

*Gradiente de la fase móvil del método de  $\beta$ -caroteno*

---

Tiempo	Metanol	Agua
0	70	30
5 min	75	25
10 min	100	0
15 min	75	25
20 min	70	30

- Tiempo por corrida: 20 min
- Comuna RP18, (5  $\mu$ m) 120mm x 0.5mm

#### 10.3.3.2.5. Extracción de la muestra.

10.3.3.2.5.1. Pesamos 1g del homogenizado de la harina de pescado, en un vial ámbar de 5 ml

10.3.3.2.5.2. Agregamos 5 ml de ácido tricloroacético 10% y llevamos a sonicar por 15 min.



*Figura 32:* Soluciones de Ácido tricloroacético al 5%, Bicarbonato de sodio y la acetona antes, y los viales de 5ml con la muestra de harina de pescado extraída con tricloroacético al 5%.

### **10.3.3.2.6. Preparación de la curva de calibración**

**10.3.3.2.6.1.** Preparamos 50 ml de una solución patrón de TCA de 10% que contenga 1000 mg/L de histamina

**10.3.3.2.6.2.** A partir de la solución patrón de preparamos 50 ml de las soluciones estándares de 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 60 mg/L.

**10.3.3.2.6.3.** Realizamos la Derivatización de los estándares.

### **10.3.3.2.7. Reacción de Dansilo.**

**10.3.3.2.7.1.** En cada vial de vidrio ámbar con tapa adicionamos consecutivamente los siguientes volúmenes:

- 200 µl de cada una de las muestras respectivamente y de la curva de calibración
- 800 µl de Bicarbonato de sodio 0.25M
- 400 µl de la solución de Cloruro de Dansilo
- 600 µl de acetona p.a.

**10.3.3.2.7.2.** Cerramos herméticamente el vial, mezclamos e incubamos las muestras y los estándares a  $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en el baño maría por 1h.

**10.3.3.2.7.3.** Enfriamos a temperatura ambiente, Filtramos con Acrodiscos de 0.2 µm y vializamos en viales de 1ml ámbar.

**10.3.3.2.7.4.** Llevamos a lectura al equipo de HPLC.



*Figura 33:* los cinco puntos de curva de calibración de la Histamina en la parte inferior del rack de viales y las muestras de harina de pescado con la muestra duplicado y adición en la parte superior del rack de viales.

#### 10.4. Determinación del porcentaje de capacidad antioxidante por el método 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) del $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* (alcachofa).

El fundamento del método desarrollado por Brand Williams *et al* (1995), consiste que el radical del DPPH, tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida a 517 nm. La diferencia de absorbancias permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres, o porcentaje de capacidad antioxidante en función al 50% (IC50) de consumo del DPPH.

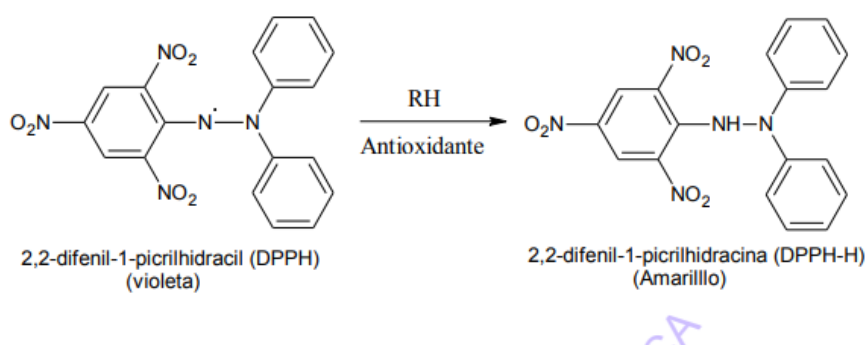


Figura 34. Reacción de las estructuras del DPPH y del compuesto oxidante

##### 10.4.1. Equipos y materiales

10.4.1.1. Espectrofotómetro Shimadzu IRTracer-100.

10.4.1.2. 2 Celdas de cuarzo.

10.4.1.3. Estándar de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH).

10.4.1.5. Metanol grado HPLC.

10.4.1.6. 10 Tubos de ensayo.

10.4.1.7. Papel tisú.

10.4.1.8. Agitador o shaker



## 10.4.2. Procedimiento

**10.4.2.1.** El blanco se preparó con metanol para ajustar el espectrofotómetro a cero.

**10.4.2.2.** Preparamos una solución patrón de 20 mg/L de DPPH en metanol por triplicado (se pesó 2 mg de DPPH y se llevó a una fiola de 10 ml con metanol, de allí se tomó 2.5 ml y se llevó a una fiola de 25 ml) y leímos las absorbancias a 517 nm. En los tiempos de cero, treinta y sesenta minutos.

**10.4.2.3.** Agregamos 400 µL del extracto metanólico del β-caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* (alcachofa) de 5.4 mg/L a un tubo de ensayo con 2 ml del estándar de 100 ppm de DPPH, y leímos las absorbancias a 517 nm, también por triplicado en los tiempos de cero, treinta y sesenta minutos.

## 10.4.3. Cálculos

Con los valores de las absorbancias obtenidas se determinó el % de capacidad antioxidante o captación de radicales libres mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ captación de radicales libres: } \left[ 1 - \frac{(A2 - A3)}{A1} \right] * 100$$

Donde:

A1: Absorbancia del patrón de referencia

A2: Absorbancia de la muestra

A3: Absorbancia del blanco de muestra

## 11 RESULTADOS

- Se ha desarrollado el método para la extracción del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* (Alcachofa), donde obtuvimos el extracto líquido en metanol, para luego poder cuantificarlo por el equipo de cromatografía de alta eficiencia acoplado a detector UV-VIS a una longitud de onda de 450 nm, Haciendo los controles de calidad de muestra duplicado y adición, obteniendo un resultado promedio de 543.8701  $\mu\text{g}/100\text{g}$  con tiempos de retención de 8.160 y 8.067; con un porcentaje de recuperación en la muestra adición de 99.44%, con un tiempo de retención de 8.060, como se observa en el Figura 35:

Sample No.	Sample Name	Ret. Time	Area	Height	Amount	Type	Plates
		min	mAU*min	mAU	ug/L		(EP)
		ETA-CAROTE	ETA-CAROTE	ETA-CAROTE	ETA-CAROTE	CA-CAROT	T-CAROT
		UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1	UV VIS 1
3	STD-50PPB-2	8.073	0.0205	0.0861	53.5791	BMB*	7327
4	STD-150PPB-1	8.060	0.0585	0.2400	152.8109	BMB*	6610
5	STD-150PPB-2	8.087	0.0570	0.2412	148.8592	BMB*	7146
6	STD-250PPB-1	8.100	0.0960	0.3855	251.0101	BMB*	6686
7	STD-250PPB-2	8.100	0.0955	0.3848	249.5763	BMB*	6714
8	STD-400PPB-1	8.020	0.1529	0.6280	399.5612	BMB*	6659
9	STD-400PPB-2	8.100	0.1523	0.6283	397.9602	BMB*	6792
10	STD-500PPB-1	8.040	0.1899	0.7578	496.4276	BMB*	6587
11	STD-500PPB-2	8.040	0.1899	0.7578	496.4276	BMB*	6587
12	BK	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
13	EXAI 18499-1	8.160	0.0524	0.2233	543.9109	BMB*	7244
14	EXAI 18499-1D	8.067	0.0522	0.2253	543.8294	BMB*	7381
15	EXAI 18499-1AD	8.060	0.0996	0.3982	1041.0947	BMB*	6601
Average:		8.078	0.0957	0.3879	371.4488		6845

Figura 35: Reporte de resultados del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*, de la muestra, muestra duplicado y adición, en las posiciones N° 13,14 Y 15.

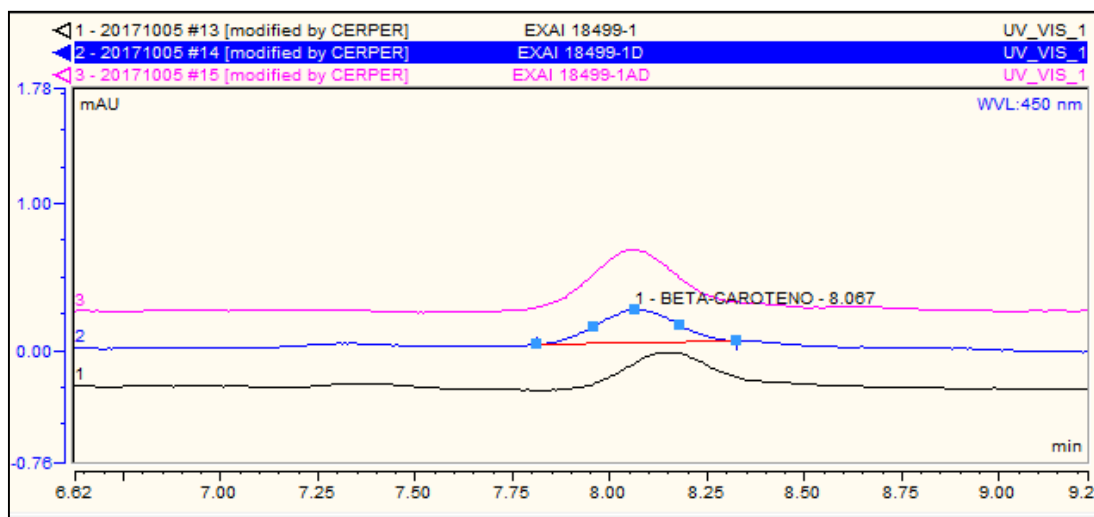


Figura 36: Superposición de los cronogramas de la muestra (Negro), muestra duplicado (Azul) y adición (Guinda) de las muestras de harina de pescado.

Realizamos la verificación de los resultados mediante el siguiente cálculo mencionado en el punto 10.1.3.4. De la parte experimental.

$$\beta\text{-CAROTENO } (\mu\text{g}/100\text{g}) = \frac{0.0524 \times 250.4585 \times 0.2}{0.09575 \times 0.0504} = 543.9109$$

**Am** = 0.0524

**As** = 0.0955

**Cs** = 249.4585 (μg/ml)

**D** = 0.2

**W** = 0.0504 (g)

Los datos se pueden observar en los siguientes cronogramas:

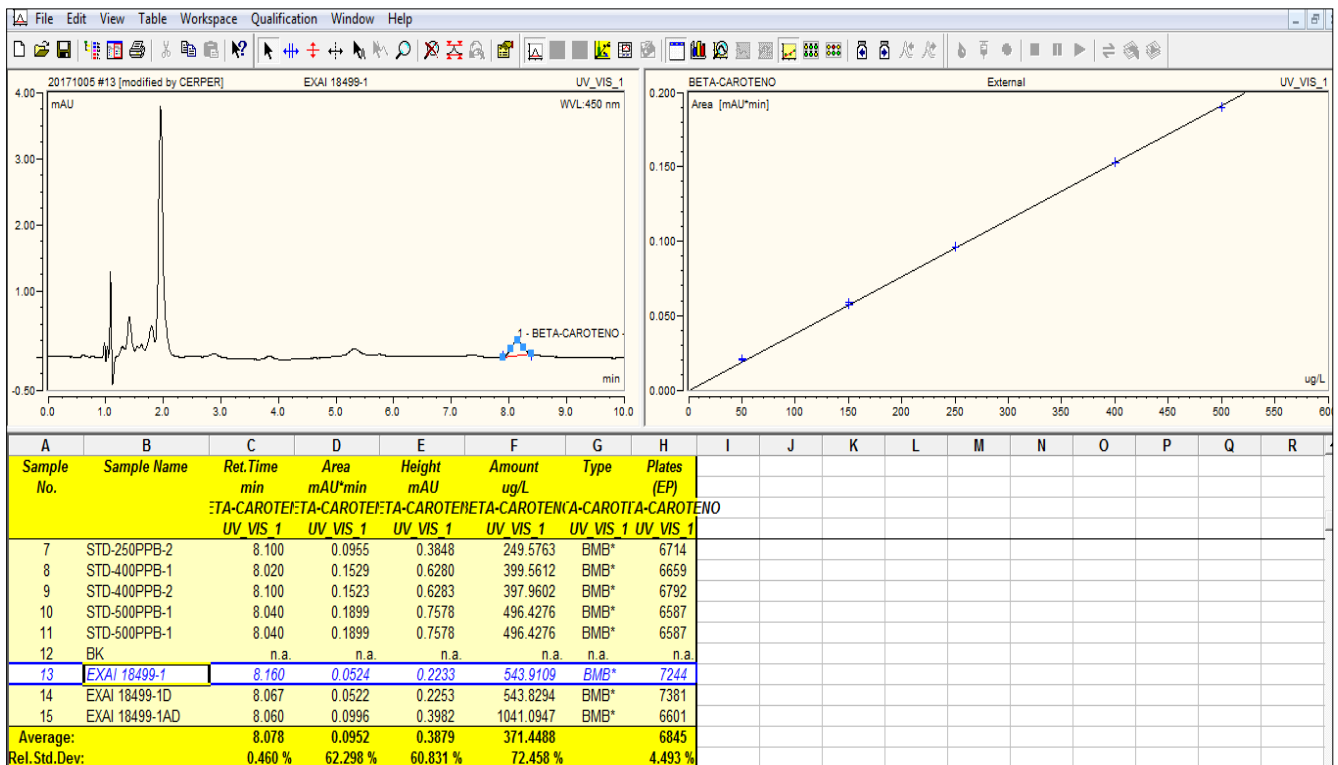


Figura 37: cronograma del β-Caroteno extraído de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*, donde se observa en el tiempo de retención de 8.160 para la muestra EXAI 18499-1

Como controles de calidad se realizó duplicado y una adición de 500 µg/L, el promedio de las muestras EXAI18499-1 y EXAI18499-1D es 543.8701 µg/100g, y la adición con el siguiente porcentaje de recuperación:

$$\frac{(1041.0947 - 543.8701)}{500} = 99.44 \%$$

Donde en la siguiente imagen se muestra la curva de calibración del β-caroteno.

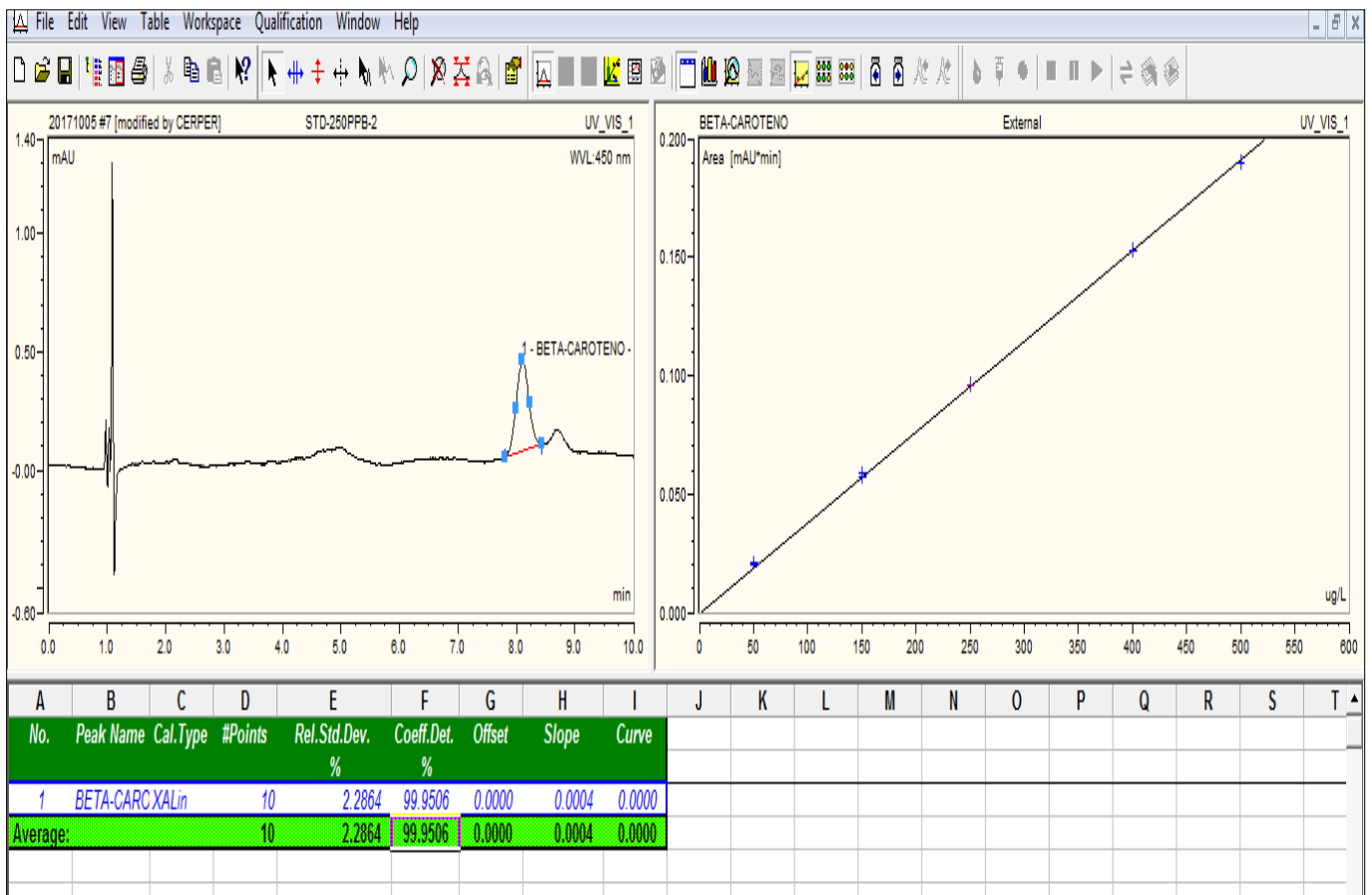


Figura 38: Se muestra un coeficiente de determinación de r<sup>2</sup>= 0.999506 de la curva lineal del estándar de β-caroteno.

En la siguiente imagen podemos observar que la concentración hallada se encuentra por el punto medio de la curva:

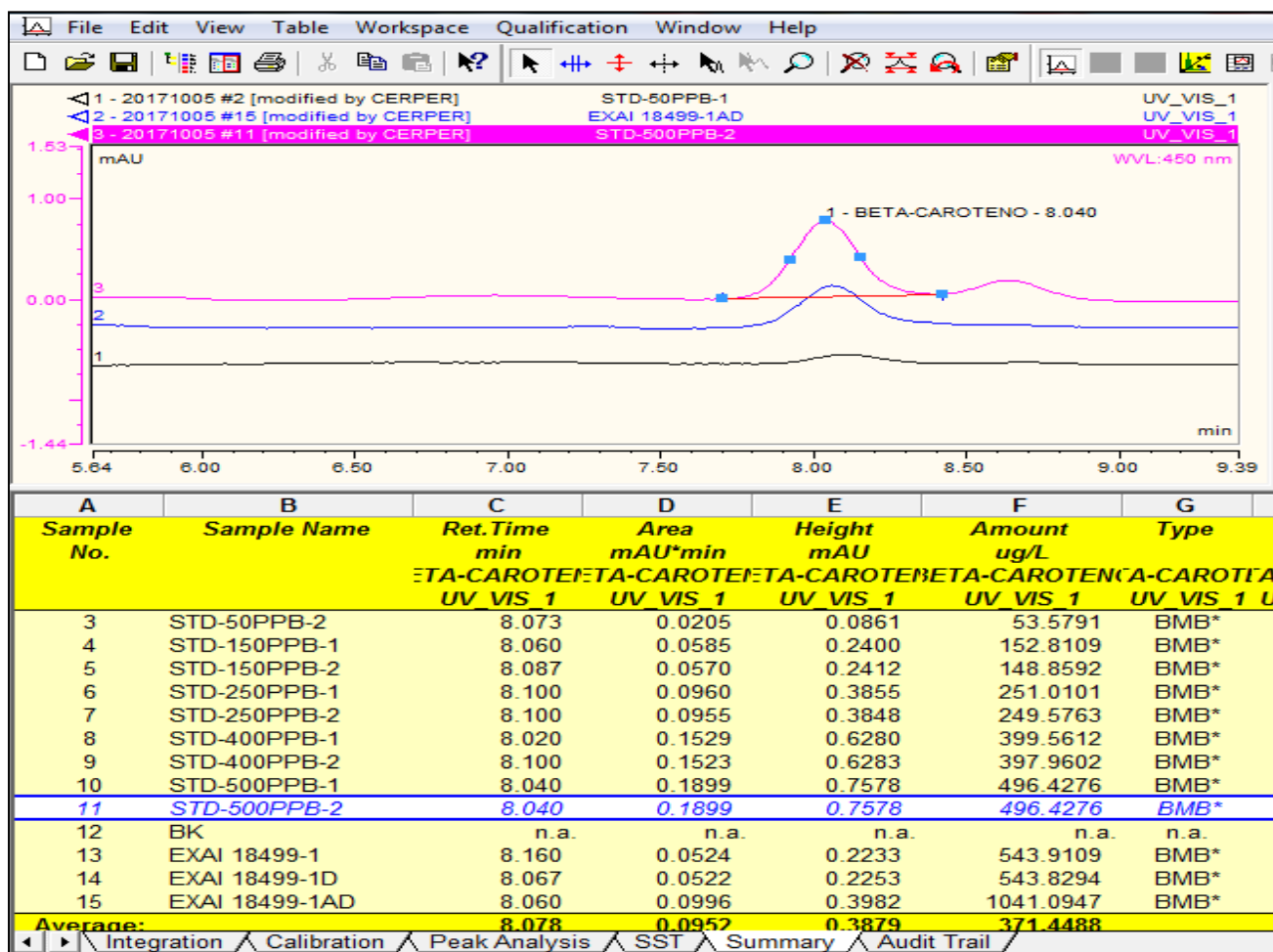


Figura 39: se observa la superposición de los cronogramas del punto bajo de la curva de 50 ppb (Negro), la adición (Azul) y el punto alto de la curva de 500 ppb (Guinda).

- Luego de haber pasado los 30 días de almacenamiento de las harinas de pescado con las diferentes cantidades de 0 µl, 250 µl, 500 µl, 1000ul de extracto de β-caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* de una concentración de 543.87 ppb. Se realizó el análisis de proteína, teniendo en cuenta que es una harina de pescado Premium de 72.60 g/100 g, se Obtuvieron los siguientes resultados observados en la figura 40.

Resumen de datos (Element %)

Select Result Editar Ver Print Help

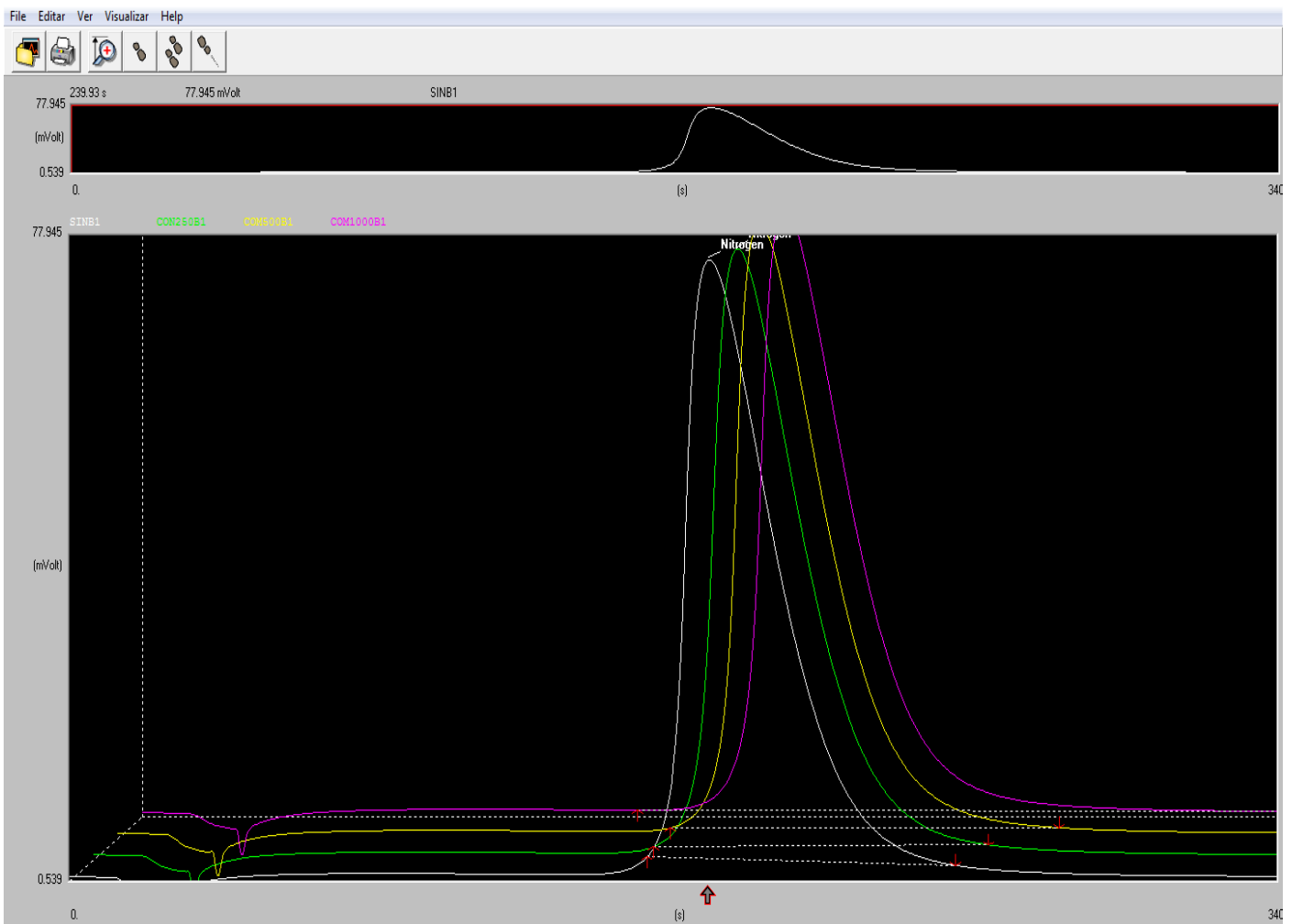
Comparar con: N       Comp. más cercano: N  
 Atropine     

Grupo	Nombre de muestra	Fichero	Fecha Inyec.	Tipo	Peso (mg)	Protein Factor	Humidity %	AS	Vial	Nitrogen	Protein (%)
0	BK	BK	24/11/2017	11:22						0	0
0	L1	L1	24/11/2017	11:27	100.5	6.25	0			15.19999981	0
0	L2	L2	24/11/2017	11:33	100.5	6.25	0			15.19999981	0
0	L3	L3	24/11/2017	11:39	100.5	6.25	0			15.19999981	0
0	BYPASS	bypass	24/11/2017	11:45						0	0
0	QC1	QC1	24/11/2017	11:50	100.4	6.25	0			15.24279881	95.2674942
0	SINB1	SINB1	24/11/2017	11:56	100	6.25	0			11.14366055	69.64788055
0	SINB2	SINB2	24/11/2017	12:02	100.2	6.25	0			11.12415314	69.5259552
0	SINB3	SINB3	24/11/2017	12:08	100.6	6.25	0			11.09077358	69.31733704
0	CON250B1	CON250B1	24/11/2017	12:13	100	6.25	0			11.27956772	70.49729919
0	CON250B2	CON250B2	24/11/2017	12:19	100.1	6.25	0			11.24798775	70.29992676
0	CON250B3	CON250B3	24/11/2017	12:25	100.1	6.25	0			11.2610054	70.38128662
0	COM500B1	COM500B1	24/11/2017	12:31	100.5	6.25	0			11.44115829	71.5072403
0	COM500B2	COM500B2	24/11/2017	12:36	100.5	6.25	0			11.42706203	71.41913605
0	COM500B3	COM500B3	24/11/2017	12:43	100.3	6.25	0			11.45350742	71.58441925
0	COM1000B1	COM1000B1	24/11/2017	13:23	100.4	6.25	0			11.55432892	72.21455383
0	COM1000B2	COM1000B2	24/11/2017	12:54	100.6	6.25	0			11.55315208	72.2071991
0	COM1000B3	COM1000B3	24/11/2017	13:00	100.2	6.25	0			11.60278225	72.51738739
0	QC2	QC2	24/11/2017	13:06	100.5	6.25	0			15.23066521	95.19165802

Figura 40: Reporte de resultados de proteínas de las harinas de pescado fortificadas del equipo Dumas, Thermo Scientific Flash 2000. Donde se utiliza la lisina como estándar interno (QC) con valor teórico de nitrógeno 15.2

Como se observa en la figura 40, la cantidad de proteína se conserva en función a la cantidad de  $\beta$ -caroteno que se agregó de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* de una concentración de 243.87 ppb, donde la harina de pescado sin  $\beta$ -caroteno tiene un promedio de 69.50 g/100g de proteína, la harina de pescado con 250  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno tiene un promedio de 70.39 g/100g, la harina de pescado con 500  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno tiene un promedio de 71.50 g/100g y la harina de pescado con 1000  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno tiene un promedio de 72.31 g/100g, donde en esta última, no ha variado significativamente el valor proteico de esta harina de pescado.

En la siguiente imagen se observa la superposición de los cromatogramas de las respectivas muestras de harina de pescado con las correspondientes cantidades agregadas



**Figura 41:** Cromatogramas de las diferentes harinas de pescado con cantidades caroteno de 0  $\mu$ l (Blanco), 250  $\mu$ l (Verde), 500  $\mu$ l (Amarillo) y 1000  $\mu$ l (Guinda) de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*.

- En el análisis de TVN de la harina de pescado se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 5:

*Resultado del análisis de TVN de las 4 muestras de harina de pescado*

Cantidad de 243.87 ppb	Sin $\beta$ -Caroteno	Con 250 $\mu$ l $\beta$ -Caroteno	Con 500 $\mu$ l $\beta$ -Caroteno	Con 1000 $\mu$ l $\beta$ -Caroteno
TVN	150.5 mg/100g	130.0 mg/100g	123.0 mg/100g	115.5 mg/100g

- En el análisis de Histamina de la harina de pescado se obtuvieron como resultado para la harina de pescado sin  $\beta$ -caroteno 75.11 mg/kg de histamina, para la harina de pescado con 250  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno 76.07 mg/Kg de histamina, para la harina de pescado con 500  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno 40.53 mg/kg de histamina y para la harina de pescado con 1000  $\mu$ l de de  $\beta$ -caroteno 7.73 mg/kg de histamina, como se observa en la figura 42:

PRODUCTO: Harina de pescado						
ANALISTA : Jorge A	EQUIPOS : CODIGO:					
O/E : HIST- harina pes	HPLC 2267					
SECUENCIA : 2017-12-11tss.seq	BALANZA : 2230					
	BAÑO DE AGUA 1790					
FECHA DE ENSAYO :	Firma analista:					
INICIO : 11/12/2017						
TERMINO : 11/12/2017						
PRECISIÓN :	VoBo Supervisor:					
	Fecha de entrega: 11/01/2018					
N° Muestra	Peso de Muestra (g)	F. Dilución	Area	Concentración (mg/Kg)	Promedio (mg/Kg)	U (+/-)
CONB1000	2.5001	10	91553	7.73		
CONB500	2.5002	10	529311	40.53		
CONB250	2.5000	10	603208	46.07		
SINB	2.5000	10	990896	75.11		

*Figura 42:* Como se observa en este reporte de resultados la cantidad de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* agregada en la harina de pescado es inversamente proporcional al contenido de histamina presentes en cada una de ellas.



- En los siguientes cromatogramas se observan el pico característico de la histamina presente en la harina de pescado sin fortificar y la harina de pescado fortificada con 1000  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus*.

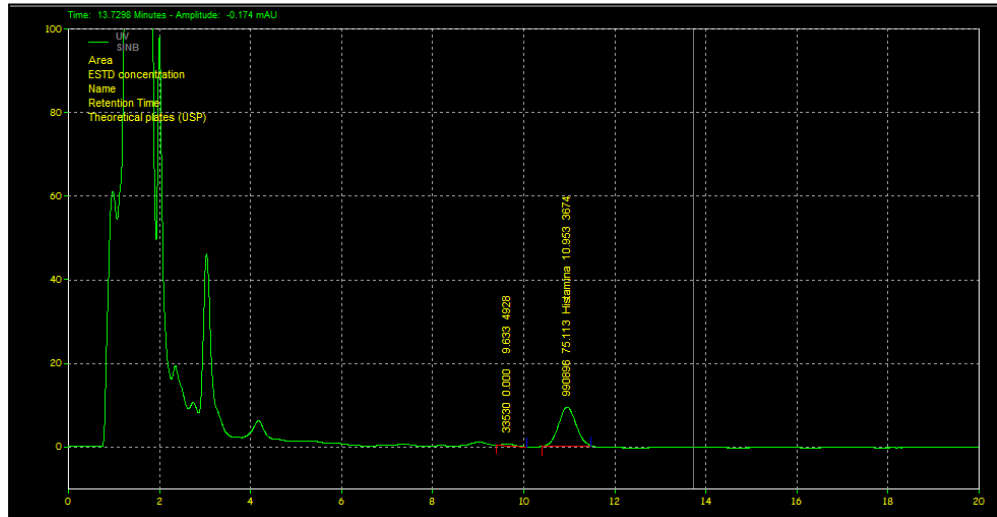


Figura 43: Cromatograma de la muestra de harina de pescado sin  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* de 243.87 ppb.

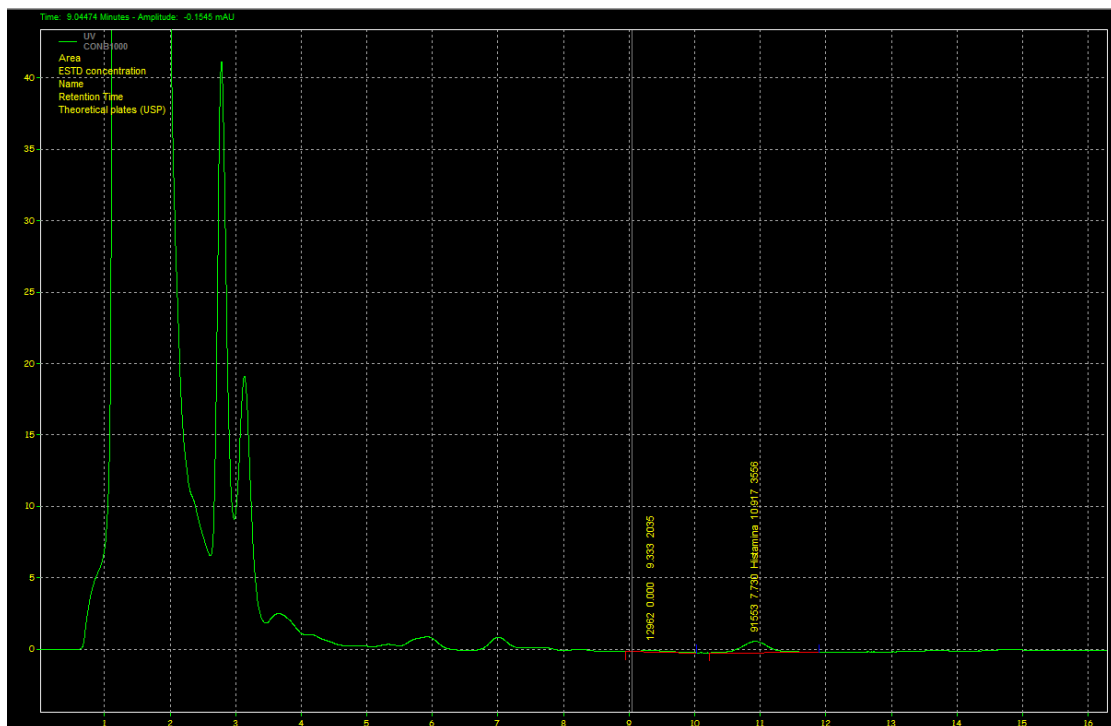
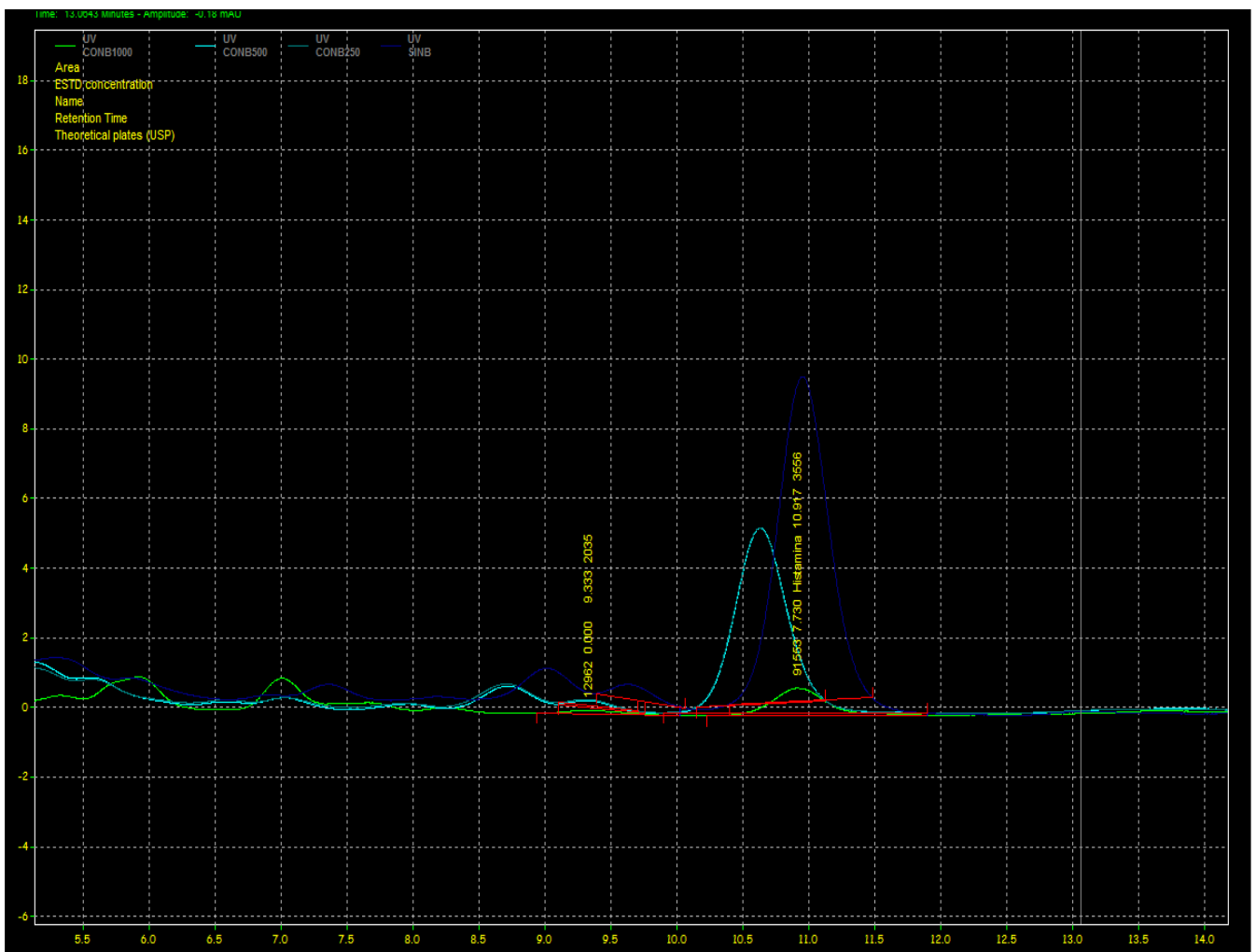


Figura 44: Cromatograma de la muestra de harina de pescado fortificada con 1000  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la *Cynara scolymus* de 243.87 ppb.

- En el siguiente cromatograma de la figura 45, se observa la superposición de los cromatogramas de las muestras analizadas, el cromatograma de color verde es la harina de pescado fortificada con  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la **Cynara scolymus** con una cantidad de 1000  $\mu\text{l}$  que presenta el pico de histamina más pequeño; los cromatogramas de color turquesa y turquesa más oscuro no se observa muy definida la diferencia de ambos debido a que presentan histamina de 40.53 y 46.07 y son bastante parecidos, se agregaron 500  $\mu\text{l}$  y 250  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la **Cynara scolymus** respectivamente; el cromatograma de color azul es de la harina de pescado sin fortificar presentando el pico de histamina más alto.



*Figura 45:* superposición de los diferentes cromatogramas de histamina de las muestras de harina de pescado fortificadas con  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la **Cynara scolymus** en diferentes cantidades.

- Compilación de los resultados obtenidos de los diferentes análisis en harinas de pescado fortificadas con  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) para la evaluación de la actividad antioxidante donde se observa en la tabla 6:

Tabla 6:

*Resultados finales de los análisis de Histamina, TVN y proteína de las muestras de harina de pescado fortificadas con  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa)*

Almacenado por 30 días	Sin $\beta$ -caroteno	Con 250 $\mu$ l $\beta$ -caroteno	Con 500 $\mu$ l $\beta$ -caroteno	Con 1000 $\mu$ l $\beta$ -caroteno
<b>Histamina</b>				
	75.11 mg/Kg	46.07 mg/Kg	40.53 mg/Kg	7.73 mg/Kg
<b>TVN</b>	150.5 mg/100g	130.0 mg/100g	123.0 mg/100g	115.5 mg/100g
<b>Proteína</b>	69.5 g/100g	70.39 g/100g	71.50 g/100g	72.31 g/100g

- Las absorbancias obtenidas por triplicado, cuando se realizaron las pruebas de actividad antioxidante para determinar el porcentaje de inhibición del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) en medio metanólico por la técnica de 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), usando metanol como blanco en cero, treinta y sesenta minutos después de la reacción, como se observa en la tabla 7, tabla 8 y tabla 9:

Tabla 7:

Se observa las absorbancias por triplicado para la determinación de la capacidad antioxidante en 0, 30 y 60 minutos a una longitud de onda de 517 nm.

Tiempo			
0 (min)	30 (min)	60 (min)	
1.790	1.784	1.778	DPPH-1
1.783	1.782	1.782	DPPH-1D
1.789	1.780	1.778	DPPH-1T
0.317	0.328	0.330	DPPH + $\beta$ -caroteno-1
0.312	0.323	0.335	DPPH + $\beta$ -caroteno-1D
0.316	0.327	0.332	DPPH + $\beta$ -caroteno-1T

Tabla 8:

Los valores representan la media de las absorbancias realizadas por triplicado  $\pm$  la desviación estándar en los tiempos de 0, 30 y 60 minutos a una longitud de onda de 517 nm

Tiempo			
0 (min)	30 (min)	60 (min)	
1.787 $\pm$ 0.004	1.782 $\pm$ 0.002	1.779 $\pm$ 0.002	DPPH
1.325 $\pm$ 0.001	1.301 $\pm$ 0.001	1.263 $\pm$ 0.001	DPPH + $\beta$ -caroteno

Tabla 9:

Porcentajes de la actividad antioxidante del de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la **Cynara scolymus** (alcachofa)

Tiempo			
0 (min)	30 (min)	60 (min)	
74.15 $\pm$ 0.14	73.01 $\pm$ 0.07	71.00 $\pm$ 0.06	Porcentaje de inhibición o porcentaje de capacidad antioxidante (%IC50) del $\beta$ -caroteno de la <b>Cynara scolymus</b>

## 12 DISCUSION DE RESULTADOS

- En el presente estudio se desarrolló diferentes pruebas para la elaboración de un método de extracción de  $\beta$ -carotenos, según los estudios realizados por Fahy *et al* (2005), es necesario hacer una reacción de saponificación para poder separar los terpenoides saponificables de los insaponificables y tener una mejor selectividad, pero el problema que se presentó es que al terminar la reacción de saponificación formo un compuesto pastoso que dificulto la separación, debido a esto se centrifugo, pero en los resultados finales no se obtuvo un porcentaje de recuperación aceptable de la adición de la muestra. Se tomó en cuenta lo realizado por Lee MT, Chen BH (1998) que al someter a los  $\beta$ -carotenos entre 60°C y 120°C, podría formar isómeros *cis* (9-*cis*, 13-*cis*, 15-*cis*, 13,15-di-*cis*-  $\beta$ -caroteno, por ello se descartó la extracción por saponificación, y se realizó el siguiente método de extracción por afinidad, primero se estudió la naturaleza del  $\beta$ -caroteno, al ser una molécula con 8 unidades de isopreno y suma un total de 40 carbonos como se muestra en la figura 4, tiene un comportamiento apolar, haciendo pruebas con solventes de medianamente polar hasta solventes muy apolares, obteniendo una mejor separación y resolución al extraer con acetona y hexano a una proporción de (4:6) respectivamente, como se muestra en la figura 37. luego de extraer se llevó a sequedad con nitrógeno y se reconstituyo con metanol, debido a que se trabajó en fase reversa usando el metanol como medio final del  $\beta$ -caroteno extraído.
- Cuando se realizó la cuantificación de los  $\beta$ -carotenos de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), se preparó inicialmente una curva que no estuvo idónea para la concentración de la muestra de  $\beta$ -caroteno, debido a que el punto inferior de esta curva sobrepasaba la concentración de  $\beta$ -caroteno encontrada en la bráctea interna de ***Cynara scolymus***, por lo tanto, se desarrolló una curva de rango bajo en ppb para poder evaluar correctamente los resultados haciendo una superposición de los cromatogramas de la adición con los puntos de curva de 50 ppb y 500 ppb como se muestra en la figura 39 con un coeficiente de determinación de 0.999506 como se muestra en la figura 38.
- Después de la fortificación de las harinas de pescado con 0  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 500  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l de extracto de  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** como se muestra en la figura 27, de una concentración de 543.87 ppb, como se muestra en la figura 37, y dejarlo por treinta días en almacenamiento a temperatura ambiente y en

oscuridad, se observa la variación de las proteínas de las muestras de pescado es directamente proporcional a la cantidad de  $\beta$ -caroteno fortificado como se puede observar en la figura 40 y en la comparación de los cromatogramas de las muestras fortificadas como se observa en la figura 41. Esto es debido a que con el tiempo de almacenaje de las harinas de pescado aumenta el contenido de aminos volátiles y la formación de aminos biogénicos perdiendo nitrógeno proteico, es por ello que la muestra de 1g de harina de pescado que ha sido fortificada con 1000 $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno presento 72.31 g/100g, en comparación con la que no tiene fortificación de  $\beta$ -caroteno que presento 69.50 g/100g como se muestra en la tabla 6, teniendo en cuenta que el valor proteico de esta harina de pescado Premium es de 72.60 g/100g, esto confirma lo realizado por Mortensen A, Skibsteb L (1997) que mencionaron la reactividad de los antioxidantes con los radicales libres según la cantidad de enlaces dobles coplanares, siendo el  $\beta$ -caroteno menos antioxidante en comparación con el licopeno, debido a que dos de sus enlaces dobles no son coplanares, asimismo a mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno adicionado, mayor actividad antioxidante. Se utilizó lisina como estándar interno (QC) para asegurar que se recuperó de forma confiable los resultados, con un valor teórico de nitrógeno de 15.2.

- En los análisis de TVN e histamina de las muestras de harina de pescado fortificadas con  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** después de los treinta días en almacenamiento a temperatura ambiente y en oscuridad, Se observó que los niveles de ambos analitos aumenta inversamente proporcional a la cantidad de  $\beta$ -caroteno fortificadas como se observa en la tabla 6, y en el caso de la histamina en la harina de pescado sin fortificar con  $\beta$ -caroteno se observa una mayor concentración de histamina en comparación con las otras muestras fortificadas con  $\beta$ -caroteno como se puede observar en la figura 43, con una concentración de 75.11 mg/Kg como se observa en el reporte de la figura 42. Esto comprobó los estudios realizados por Wagner y warthesen (1995) que menciona la degradación de los antioxidantes  $\beta$ -caroteno sigue una cinética de primer orden, esto se refiere a que la actividad antioxidante va depender mucho de la concentración de  $\beta$ -caroteno adicionado. Posteriormente se realizo la superposición de los cromatogramas del análisis de histamina de todas las muestras de harinas de pescado fortificadas con  $\beta$ -caroteno obteniendo menor histamina en la muestra fortificada con 1000ul de  $\beta$ -caroteno como se muestra en la figura 44 y 45. Siendo el TVN e histamina indicadores de la descomposición de las harinas de pescado, en primera instancia por la descomposición bacteriana de la histidina a histamina por enzimas descarboxilazas en el proceso de oxidación y luego se produce la rancidez a partir

de la ruptura de los peróxidos a cierta concentración, formándose diferentes compuestos generando olor y sabor desagradables.

- La capacidad antioxidante o índice de inhibición determinado del  $\beta$ -caroteno de de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) fue  $74.15\% \pm 0.14$ , en comparación con el isómero 9- cis  $\beta$ -caroteno según Levin G, Mokady S, (1994) es menos reactivo a los radicales libres, pero se observó en los análisis realizados con los estándares correspondientes que si cumple con la capacidad antioxidante en la harina de pescado.

### 13 CONCLUSIONES

- El efecto antioxidante del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus***, disminuye el proceso de descomposición de la harina de pescado en función al tiempo y la cantidad fortificada, sin cambiar la naturaleza ni propiedades de la harina de pescado, siendo una alternativa natural como preservante en harinas de pescado.
- El método de extracción por afinidad de solvente del  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa), se puede utilizar para otro tipo de frutas y vegetales.
- La ***Cynara scolymus*** (alcachofa), tiene una cantidad de  $543.8701 \mu\text{g}/100\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno en la bráctea interna.
- El  $\beta$ -caroteno de la bráctea interna de la ***Cynara scolymus*** puede utilizarse como preservante en otro tipo de matrices, debido a que presenta una capacidad antioxidante del  $74.15\% \pm 0.14$ , como por ejemplo en alimentos para consumo humano, donde también podría servir como aditivo nutricional debido a que es precursor de la vitamina A.

## 14 RECOMENDACIONES

- Promover y Buscar nuevas formas de alternativas naturales para el procesamiento y conservación de los alimentos ya sea para consumo animal o humano en reemplazo de aditivos sintéticos que podrían ser nocivos para la salud.
- Se debe fortalecer la investigación de metabolitos secundarios, no solo en el caso del  $\beta$ -catoreno de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) como antioxidante en harinas de pescado, sino también como aditivo en diferentes alimentos para consumo humano, debido a que el  $\beta$ -catoreno también es conocido como retinol y es precursor de la vitamina A, esto quiere decir que al consumirlo el organismo lo metaboliza a vitamina A.
- Se recomienda promover el uso de preservantes naturales en alimentos, como en el caso de la harina de pescado se usa comercialmente la etoxiquina como antioxidante artificial, aunque actualmente la Unión europea ha suspendido el uso de etoxiquina como aditivo en piensos para todas las especies y categorías animales, pero la EPA sí permite el uso, esto es debido a que no hay ninguna evaluación sobre la nocividad de la etoxiquina en los animales, humanos y medio ambiente pero p-Fenetidina, una impureza del aditivo etoxiquina, está reconocida como posible agente mutágeno. Es por ello que el uso del  $\beta$ -catoreno de la ***Cynara scolymus*** (alcachofa) es una buena alternativa de antioxidante natural ya comprobado en el presente trabajo monográfico.
- Promover e investigar el uso de carotenoides como antioxidantes de otras plantas, frutos o vegetales, debido a que hay carotenoides más reactivos en la captación de radicales libres, como por ejemplo: licopeno, compuestos fenólicos,  $\beta$ -criptoxantina.
- Se recomienda el uso del método de extracción del  $\beta$ -catoreno por afinidad con solventes realizado en la presente investigación, debido a que es más rápido y se obtienen mejores resultados en los controles de calidad.



## **15 APORTES DESTACABLES A LA EMPRESA.**

El aporte realizado a la empresa fue la creación, investigación e implementación de un nuevo método de ensayo para el análisis de  $\beta$ -caroteno en las diferentes variedades de frutas y vegetales, así como el apoyo en el desarrollo de una forma de extracción de vitamina D en alimentos, también se participó en ensayos de aptitud por comparación de interlaboratorios a nivel internacional en los ensayos de proteína, Nitrógeno Total Volátil y Digestibilidad en Harinas de pescado, Obteniendo resultados confiables.

## 16 BIBLIOGRAFIA

AOAC-990.03; (2005) *proteína (cruda) en alimentos pecuarios*. Método de combustión, primera acción 1990, acción final 2002. Version 20th Ed 2016 Pág. 1, 2.

Abushita AA, Daood HG, Biacs PA, (2000). *Change in carotenoids and antioxidant vitamins in tomato as a function of varietal and technological factors*. J Agri Food Chem 48:2075-2081.

Bao B, Chang KC,( 1994). *Carrot pulp chemical composition, color, and water-holding capacity as affected by processing conditions*. J Food Sci 59(6):1155-1158.

Britton G; (1997). *Carotenoids and Colors in Fruits and vegetables. Phytochemistry of fruit and vegetables, eds*. Clarendon Press, Oxford, pp.11 -27.

Britton, G., Armit, G., Lau, S. Y. M., Patel, A. K., and Shone, C. C. (1982). In: Britton, G., and Goodwin, T. W. (Eds). *Carotenoid Chemistry and Biochemistry*. Pergamon Press. London, pp. 237.

Baloch AK,Buckle KA, Edwards RA, (1977), *Stability of  $\beta$ -carotene in model systems containing sulphite*. J Foods Tech 12:309-316.

Burton GW; (1989). *Antioxidant action of carotenoids*. J Nutr; 119:109-111.

Brand Williams W, Cuvelier ME, Berset C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. Food Sci Technol. 28:25-30.

- Corporación Pesquera Inca (Copeinca), (2017). *Diagrama de Flujo del proceso de obtención de la harina de pescado.*
- Chasquibol S., José Luis López G., Robert Cárdenas; Maribel Rodríguez V; (2006). *Estudio y cuantificación de carotenoides por métodos espectroscópicos del fruto del níspero de la sierra y su valoración como alimento funcional Nancy* 9:3-9.
- Cole ER, Kapur NS, (1957). *The stability of lycopene; Degradation by oxygen.* J Sci Food Agri 8:360-365.
- Carnevale J, Cole ER, Crank G, (1979). *Fluorescent light catalyzed autoxidation of  $\beta$ -carotene.* J Agr Food Chem 27:462-463.
- Chen BH, Chen TM, Chien JT, (1994). *Kinetic model for studying the isomerization of  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene during heating and illumination.* J Agr Food Chem 42:2391-2397.
- Choi MH, Kim GH, Lee HS, (2002). *Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (Citrus sinensis) juice during refrigerated storage.* Food Research International 35:753-759.
- Carotenoides; (2012), recuperado de: <http://www.sanautricion.org.ar/files/upload/files/-carotenoides.pdf>.
- Empresa de Certificaciones del Perú S.A. (CERPER), (2017). *Normas y Técnicas de Análisis para el control de calidad de la harina de pescado.*

Empresa de Certificaciones del Perú S.A. (CERPER); (2017). Manual de instrucciones de laboratorio de ensayo, Código: 6042-1. *Determinación de Nitrógeno Amoniacal Total (TVN)*; Versión 02/2017, pp. 1.

Eliana M. Cardona, Luis A.Rios, Gloria M.Restrepo; (2006). *Extraction of the Carotenoid Lycopene from Chonto Tomato (Lycopersicum esculentum)*, pp.44-53.

Elisa Medina Delgado; (1989). *Evaluación Técnico - Económico de la Sustitución del Antioxidante Etoxiquina ( 6-Etoxi-1, 2, dihidro, 2-2-4-Trimetilquinoleína) por el Antioxidante Sinergista Oxyking - Súper, en la Conservación de la Harina de Pescado "*

Eoin Fahy, Shankar Subramaniam, H. Alex Brown, Christopher K. Glass, Alfred H. Merrill, Robert C. Murphy, Christian R. H. Raetz, David W. Russell, Yousuke Seyama, Walter Shaw, Takao Shimizu, Friedrich Spener, Gerrit van Meer, Michael S. Van Nieuwenhze, Stephen H. White, Joseph L. Witztum and Edward A. Dennis; (2005). *A comprehensive classification system for lipids*; Journal of lipid research, vol 46; Pág 839:840-861.

Food Chemical Codex. Committee on Codex Specifications; (1981). *Food & Nutrition Board. National Academy Press*; Washington, D.C.

Fennema OR (1993) *Química de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, S, A.Rodriguez Amaya DB; (1997). *Carotenoids and Food preparation: the retention of*

*provitamin A carotenoids is prepared, processed and store foods.* Washington.  
D.C.: OMNI/USAID.

Food and Nutrition Board, institute of Medicine; (2000). *Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.* National Academy Press, Washington, OC.

Goodwin, T. W. (1965). *The biosynthesis of the carotenoids.* In: Goodwin, T. W. (Eds). *Chemistry and biochemistry of plant pigments.* Academic Press. London, pp.143-173.

Goodwin, T. W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids.* Vol. I Plants. 2nd. ed. Chapman and Hall. London and New York, pp. 377.

García Garibay, Quintero Ramírez, López Monguía; (2004). *Biotechnología Alimentaria,* pp.496, 497.

Goodwin, T.W. (1971). *Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry.* Academic Press, Londres.

Howard LR, Braswell DD, Aselage J. *Chemical composition and color of strained carrots as affected by processing* J Food Sci 61(2):Pág. 327-330.

Henry LK, Puspitassari-Nienaber NL, Jare-Galan M, Van Breemen RB, Caligmani GL, Schwartz SJ; (2000). *Effects of ozone and oxygen on the degradation of carotenoids in an aqueous model system.* J Agri Food Chem; 48:5008-5013.

- Henry LK, Catignani GL, Schwartz SJ, (1998), *Oxidative Degradation Kinetics of lycopene, lutein 9-cis and all-trans- $\beta$ -carotene*. JAOCS 75:823-829.
- ITOSU WAUKE, JUAN - SAGAWA MOMY, JUAN; (1969). *Empleo del Antioxidante BHT en harina de anchoveta Tesis de ingeniero Pesquero U.N.F.V.*
- Johnson, A. E., An, G. H. (1991) *Astaxanthin from microbial sources*. Critical reviews in Biotechnology. 11(4):247-326.
- Jimenez C, Pick U, (1993). *Differential reactivity of  $\beta$ -carotene isomers from Dunaliella bardawil toward oxygen radicals*. Plant Physiol 101:385-390.
- Jiménez Monreal A.M., Sánchez Manzanera M., Martínez Tomé, M. (2012). *optimización del método captación del radical 2,2- Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café*. AN. VET. (MURCIA) 28:67-78.
- Klein, R. M., y Cronquist, A. (1967). *A consideration of the evolutionary and taxonomic significance of some biochemical, micromorphological and physiological characters in the thallophytes*. Quaterly Revue of Biology. 42:105-296.
- Liaaen-Jensen, S. (1990). *Marine carotenoids selected topics*. New Journal of Chemistry 14:747-759.
- Liu MH, Chen BH; (1998). *Relationship between chlorophyll a and  $\beta$ -carotene in a lipid-containing model system during heating*. Food Chem; 61:41-47.

- Lee MT, Chen BH, (2002), *Stability of lycopene during heating and illumination in a model system*. Food Chem 78:425-432.
- Lee HS, Coates GA, (2003). *Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments*. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie- Food Science and Technology 36:153-156.
- Levin G, Mokady S, (1994). *Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans  $\beta$ -carotene in vitro*. Free Radical, Bio Med 17:77-8.
- Merejkowsky, C. (1883). *Histoire du developpement de la meduse Obelia*. Bull. Soc. Zool. Fr. 8:98-129.
- Miller NJ, Sampson J, Candeias LP, Bramley PM, Rice-Evans CA. (1998). *Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls*, FEBS Lett 384:240-242.
- Mortensen A, Skibsted L, (1997), *Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions*, J Agr Food Chem 45:2970-2977.
- Mayer Miebach E, Spieb WEL. *Influence of cold storage and blanching on the carotenoid content of kintoki carrots*. J Food Eng 56:211-213.
- Margarita Salazar González; (2000). *Carotenoides: distribución en el mundo vegetal y animal*. Depto. de Biotecnología. U A M-I. A pdo. Pág. 55-535. Mexico.D. F. 09340. Recuperado de: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/-n37ne/caroteno.pdf>

- Mingues Mosquera MI, (1997), *Clorofilas y carotenoides en tecnología de los alimentos*. Sevilla: Secretariado de publicaciones de la universidad de Sevilla.
- Norma Técnica Peruana NTP 201.32, (1982), Revisada 2015. *Carne y productos cárnicos. Determinación de contenido de nitrógeno Amoniacal*. 1º Edición, pp.1, 2, 3, 4,5.
- Norma Chilena Oficial. nch 2637; (2001). *Productos hidrobiológicos – método HPLC con detector UV*, Primera edición 2001.
- Noeliza Hernández Rojas, Rafael Carreño Díaz; (1967). *Caracterización de los carotenos del melón*. Recuperado de:  
[http://www.sian.inia.gob.ve/revistas\\_ci/Agronomia%20Tropical/at2704/arti/hernandezn.htm](http://www.sian.inia.gob.ve/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at2704/arti/hernandezn.htm).
- Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; (1980).  
Editor: William Horwitz, Décimo Tercera Edición.
- Olcott, H.S. and Van Der Veen; (1968). *J. Role of Individual Phospholipids as Antioxidants, Department of Nutritional Sciences, Institute of Marine Resources, University of California, Berkeley, 4, California*.
- Oruña Concha MJ, Gonzales Castro MJ, Lopez Hernandez J, Simal Lozano J, (1997). *Effects of freezing on the pigment content in green beans and patrón peppers*.  
Z lebensm Unters Forsch 205:148-152.
- Pomarpede, M. (1990). *Les couleurs des oiseaux et ses mysteres*. Armand Colin.



Perez Galvez A, Minguez Mosquera MI; (2002). *Degradation of non esterified and esterified xanthophylls by free radicals*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569:31-34.

Pinheiro Sant'Ana HM, Stringheta PC, Cardoso Brandao SC, Monteiro cordeiro de azeredo R. *Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (Daucus carota L) prepared by food service*, *Food Chem* 61(1/2):145-151.

Roos R, (1982), *wissenwerts ueber antioxidanten*, Maarden Technical Publication, Hamburg, pp.22, 23.

Ruperez, P; (2001). *In Antioxidant activity of sulphated polysaccharides from the Spanish marine seaweed Nori. Proceedings of the COST 916 European Conference on Bioactive compounds in plant foods*, pp.114, Tenerife, Canary Islands, Spain: Heal Effects and Perspectives for the Food Industry.

Raymond E. Kirk & Donald Othmar; (1961). *Enciclopedia, Tecnología química* Tomo Primera Edición en Español; Unión Tipográfica. Editorial Hispano-Americana.

Spark, A.A; (1982). *Ethoxiquin in fish meal, Fishing Industry Research Institute, University of Cape Town Private Bag, Ron debosch 7700, South Africa* *JAOCS*, Vol. 59,Nº 4, pp.187

Solomons Graham TW, Craig Fryhle. (2009). *Organic Chemist*, 10: 1258-1258.

Soto Rodríguez E, (1966). *Estudio del enranciamiento de grasas*. Centro de investigación del servicio de piensos compuestos; Madrid.

- Selim K, Tsimidou M, Biliaderis CG; (2000). *Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrices*, *Foods Chem*; 71:199-206.
- Sulaeman A, Keeler L, Giraud DW, Taylor SL, Wehling RI, Driskell JA, (2001). *Carotenoid content and physicochemical and sensory characteristics of carrot chips deep-fried in different oils at several temperatures*. *J Food Sci* 66(9):1257-1264.
- Tang YC, Chen BH, (2001). *Pigment change of freeze-dried carotenoid powder during storage*, *Food Chem* 69:11-17.
- Woodall AA, Lee SW, Weesie RJ, Jackson MJ, Britton G, (1997). *Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity*. *Biochim Biophys Acta* 1336:33-42.
- Wagner LA, Warthesen JJ,(1995). *Stability of spray dried encapsulated carrot carotenes*. *J Food Sci* 60:1048-1162.
- Young, A., y Britton, G. (1993). *Carotenoid in photosynthesis*. 1st ed. Chapman and Hall. London Pàd, pp.498.