

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI



FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Tema: “Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) como colorante natural usado en la industria alimentaria”

Trabajo de titulación previa la obtención del
título de Ingeniero en Alimentos

AUTOR: Pineda Peñafiel Daniel Francisco

TUTOR: MSc. Torres Mayanquer Freddy Giovanni

Tulcán, 2021

CERTIFICADO JURADO EXAMINADOR

Certificamos que el estudiante Pineda Peñafiel Daniel Francisco con el número de cédula 100408609-4 ha elaborado el trabajo de titulación: “Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) como colorante natural usado en la industria alimentaria”

Este trabajo se sujeta a las normas y metodología dispuesta en el Reglamento de Titulación, Sustentación e Incorporación de la UPEC, por lo tanto, autorizamos la presentación de la sustentación para la calificación respectiva.



Firmado electrónicamente por:
FREDDY GIOVANNY TORRES
MAYANQUER - 1002329983

f.....

MSc. Torres Mayanquer Freddy Giovanni
TUTOR



Firmado electrónicamente por:
ANA LUCIA
RODRIGUEZ
MACHADO

f.....

MSc. Rodríguez Machado Ana
LECTORA

Tulcán, febrero de 2021

AUTORÍA DE TRABAJO

El presente trabajo de titulación constituye requisito previo para la obtención del título de **Ingeniero** en la Carrera de ingeniería en alimentos de la Facultad de Industrias Agropecuarias y Ciencias Ambientales

Yo, Pineda Peñafiel Daniel Francisco con cédula de identidad número 100408609-4 declaro: que la investigación es absolutamente original, auténtica, personal y los resultados y conclusiones a los que he llegado son de mi absoluta responsabilidad.

Pineda Peñafiel Daniel Francisco
AUTOR

Tulcán, febrero de 2021

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Pineda Peñafiel Daniel Francisco declaro ser autor/a de los criterios emitidos en el trabajo de investigación: “Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) como colorante natural usado en la industria alimentaria” y eximo expresamente a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Pineda Peñafiel Daniel Francisco

AUTOR

Tulcán, febrero de 2021

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mis padres, especialmente mi madre por todo el esfuerzo y confianza depositada en mí durante estos últimos años, a la prestigiosa Universidad Politécnica Estatal del Carchi por brindarme la oportunidad de formarme como un excelente profesional manteniendo nuestros principios y valores personales, a mi tutor el MSc. Freddy Torres gran profesional, por compartirme sus conocimientos, apoyo y guía durante todo el proceso de investigación.

DEDICATORIA

Con mucho esfuerzo y afecto dedico esta investigación a mis padres,
Viviana Peñafiel y Paco Pineda quienes son y serán mi mayor orgullo.
A mi tía Inesita por todo su cariño y apoyo incondicional durante toda mi instrucción
académica.

ÍNDICE

I. PROBLEMA	14
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	15
1.3. JUSTIFICACIÓN	15
1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16
1.4.1. Objetivo General.....	16
1.4.2. Objetivos Específicos	16
1.4.3. Preguntas de Investigación	16
II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	17
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	17
2.2. MARCO TEÓRICO	19
Zanahoria	19
Producción de la Zanahoria	19
Salud del suelo.....	19
Cosecha y Almacenamiento.....	20
Contenido de b-caroteno en la zanahoria.....	20
Carotenoides	20
Química de los carotenoides	21
Estabilidad de los carotenoides.....	22
B-caroteno (C ₄₀ H ₅₆)	23
Conversión de b-caroteno en vitamina A	23
Identificación de B-caroteno.....	23
Extracción de carotenoides con disolvente	25
Aditivos Alimentarios.....	26
Buenas prácticas de fabricación.....	26

Dosis máxima de uso de un aditivo	26
Justificación del uso de aditivos	27
Colorantes	27
III. METODOLOGÍA	28
3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO	28
3.1.1. Enfoque	28
3.1.2. Tipo de Investigación	28
3.2. HIPÓTESIS	29
3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	29
3.3.1. Variables independientes:	29
3.3.2. Variable dependiente:	29
3.4. MÉTODOS UTILIZADOS	32
3.4.1 Materiales y reactivos	32
3.4.2 Obtención del Colorante	33
3.4.3. Método de Extracción en equipo soxhlet semiautomático RAYPA SX-6	35
3.4.4. Caracterización de pigmento	36
3.4.5. Estabilidad del colorante	36
3.4.6. Análisis Estadístico	37
3.4.7. Procesamiento y análisis de datos	39
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. RESULTADOS	40
4.1.1. EXTRACCIÓN DEL COLORANTE A PARTIR DE ZANAHORIA	40
4.1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL PIGMENTO NATURAL OBTENIDO A PARTIR DE ZANAHORIA	41
4.1.3. ESTABILIDAD DEL PIGMENTO NATURAL EXTRAÍDO A PARTIR DE ZANAHORIA A DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	41
4.2. DISCUSIÓN	51
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	53

5.1. CONCLUSIONES.....	53
5.2. RECOMENDACIONES	54
IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
V. ANEXOS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química b-caroteno	22
Figura 2: Diagrama de Flujo de extracción del colorante.....	33
Figura 3 Efecto del pH sobre la estabilidad del pigmento	43
Figura 4: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del pigmento	45
Figura 5: Efecto de la exposición sobre la estabilidad del pigmento.....	46
Figura 6: Efecto del tiempo sobre la estabilidad del pigmento.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de carotenoides de algunos alimentos y vegetales (mg/100g)	20
Tabla 2. Coeficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoides.....	24
Tabla 3. Coeficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoide. (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009).....	24
Tabla 4. Absorción máxima de los carotenoides para el espectro visible usando hexano como solvente.	24
Tabla 5. Operacionalización de variables.	31
Tabla 6. Modelo matemático para el diseño completamente al azar (DCA)	38
Tabla 7. Esquema del experimento.....	38
Tabla 8. Resultado de la caracterización fisicoquímica del pigmento.....	41
Tabla 9. Análisis de varianza del porcentaje de retención del extracto de zanahoria a diferentes condiciones de ambiente y almacenamiento	42
Tabla 10. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto al pH.....	42
Tabla 11. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto al pH.....	43

Tabla 12. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la temperatura.....	44
Tabla 13. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto a la temperatura.....	44
Tabla 14. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la exposición.....	45
Tabla 15. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto a la exposición.....	45
Tabla 16. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción pH vs temperatura.....	47
Tabla 17. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción exposición vs temperatura.....	47
Tabla 18. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción exposición vs pH.....	48
Tabla 19. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción pH vs temperatura y exposición.....	49
Tabla 20. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto al tiempo ...	50

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Certificado o Acta del Perfil de Investigación.....	59
Anexo 2: Certificado del abstract por parte de idiomas.....	60
Anexo 3: Preparación de la Zanahoria.....	61
Anexo 4: Rebanado de la Zanahoria.....	62
Anexo 5: Zanahoria deshidratada.....	63
Anexo 6: Molienda de la zanahoria deshidratada.....	63
Anexo 7: Extracción de pigmento.....	64
Anexo 8: Pigmento obtenido.....	64
Anexo 9: Determinación cuantitativa de b-caroteno por espectrofotometría UV-Visible.....	65
Anexo 10: Caracterización Físicoquímica del pigmento obtenido.....	65
Anexo 11: Preparación de los tratamientos.....	66
Anexo 12; Identificación y preparación de los 54 tratamientos.....	66
Anexo 13: Muestras en la estufa 68°C y refrigeración 4°C.....	67
Anexo 14: Toma de los datos.....	67

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) al ser expuesto a diferentes factores y condiciones. La extracción se realizó mediante la aplicación de un equipo soxhlet semi automático, como solvente se utilizó etanol a 96° de pureza y una vez obtenido el pigmento se evaluó su estabilidad en cuanto a la interacción de estos factores; temperatura (4, 14, 68°C), pH (4, 5, 6), ambientes de almacenamiento (luz, oscuridad), durante cuatro semanas donde se realizó un monitoreo y toma de datos los mismos que fueron tabulados y analizados en un software estadístico denominado InfoStat. De esta evaluación determinamos que el pigmento al ser expuesto a la interacción de dichos factores si influenciaron significativamente en la estabilidad pigmento obtenido, sin embargo, los resultados alcanzados en esta investigación se muestran favorables en comparación a diferentes pigmentos naturales que fueron sometidos a mismas condiciones.

Palabras claves: extracción, betacaroteno, carotenoides, pigmento, estabilidad.

ABSTRACT

The aim of the present research project was to evaluate the stability of the natural pigment obtained from carrot (*Daucus carota*) when being exposed to different factors and conditions. The extraction was carried out by means of the application of a semi-automatic soxhlet equipment and the use of ethanol at 96 ° purity as solvent. Once the pigment was obtained, its stability was evaluated in terms of the interaction of factors such as temperature (4, 14, 68°C), pH (4, 5, 6) and storage environments (light, dark). This process was run for about four weeks with the purpose of monitoring and data collection. The data was tabulated and analyzed in statistical software named InfoStat. From this evaluation, it was determined that the pigment when being exposed to the interaction of these factors did significantly influence the stability of the pigment obtained. Nonetheless, the results achieved in this investigation are favorable compared to different natural pigments that were subjected to the same conditions.

Keywords: extraction, beta carotene, carotenoids, pigment, stability.

INTRODUCCIÓN

Esta investigación está centrada en la obtención de un pigmento natural, el cual fue sometido a una evaluación de su estabilidad al ser expuesto a condiciones y factores (temperatura, pH y exposición luz y oscuridad) que pueden presentarse en la mayoría de los productos antes o después de su consumo. La zanahoria (*Daucus carota*) posee un gran contenido de b-caroteno el mismo que presenta características adecuadas para convertirse en una alternativa al uso de colorantes artificiales los mismos que han demostrado poseer niveles tóxicos para nuestra salud provocando enfermedades a quienes los consumen, por lo antes mencionado su importancia en el estudio de su estabilidad con el fin de analizar el nivel de degradación que puede llegar a tener el pigmento natural después de ser analizado en laboratorio de forma experimental.

De esta manera se evaluó la estabilidad que posee el betacaroteno obtenido a partir de la zanahoria al estar expuesto a la interacción de diferentes factores tales como pH, temperatura y condiciones de luz y oscuridad a los cuales están generalmente expuestos los alimentos, para ello se realizó un monitoreo durante cuatro semanas, tiempo en que los tratamientos fueron sometidos a un análisis espectrofotométrico una vez por semana con el objetivo de determinar el porcentaje de pigmento retenido a las condiciones planteadas en el estudio. La extracción del pigmento se realizó mediante la aplicación de un método de extracción sólido-líquido mediante el uso de equipo soxhlet semiautomático dentro del campus de la UPEC.

El color es uno de los atributos que el consumidor aprecia en cuanto a su apariencia y calidad de un producto, por lo tanto, de este dependerá el grado de aceptación de este. Por lo que si el producto presenta una apariencia natural este será evaluado de forma agradable o positiva, por otra parte, si el alimento presenta un color extraño la respuesta del consumidor será negativa. (Mínguez, Pérez, y Hornero, 2005)

Actualmente existe una gran tendencia en los consumidores por el consumo de productos naturales, es por ello por lo que los fabricantes alrededor del mundo buscan la manera de satisfacer a sus clientes, generando productos más naturales y con ello más sanos, de igual forma el uso de colorantes naturales ha ido aumentando, siendo una alternativa para el uso de colorantes artificiales los cuales son altamente contaminantes. (González, 2013)

I. PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de aditivos artificiales está estrictamente regulado en la Unión Europea, los Estados Unidos y muchos otros países del mundo. Existe una creciente preocupación por la seguridad de algunos colorantes alimentarios legales de uso común y existe una tendencia a reemplazar las formas sintéticas con productos de origen naturales. Además, se ha demostrado que varios colorantes con propiedades genotóxicas o cancerígenas conocidas o sospechadas se agregan ilegalmente a los alimentos. (Oplatowska-Stachowiak & Elliot, 2015)

Un estudio realizado por la Universidad de Southampton y solicitado por la FSA del Reino Unido (Food Standards Agency) impulsó la tendencia creciente hacia la producción de colorantes de origen natural. El propósito del estudio fue evaluar el efecto de seis colorantes artificiales con benzoato de sodio, utilizados continuamente en bebidas refrescantes y otros productos, los cuales eran consumidos principalmente por niños, el estudio tuvo el objetivo de comprobar si el uso de dichos aditivos estaba asociado con consecuencias adversas sobre la hiperactividad y la atención en los niños. (Schweiggert, 2018)

El resultado obtenido por la investigación demostró que la hiperactividad infantil se podría ver exacerbada por el uso de esta mezcla. Desde el 2010, el uso de estos colorantes artificiales ha inducido en la obligación de incluir una etiqueta de advertencia (puede tener un efecto adverso sobre la actividad y la atención en los niños) en el producto alimenticio cuando se comercializa. (Schweiggert, 2018)

“Esta tendencia aún continúa hasta la fecha, porque las nuevas ideas científicas y los escándalos públicos han alimentado las preocupaciones sobre los colorantes alimentarios artificiales en las últimas 2 décadas” (Schweiggert, 2018). De tal forma que hoy en día, el uso de colores como aditivos alimentarios alrededor del mundo son estrictamente controlados por la legislación o por organizaciones de control, debido a que muchos de los compuestos sintéticos mostraron ser tóxicos y perjudiciales para los seres humanos. (Oplatowska-Stachowiak & Elliot, 2015, pág. 5)

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es posible obtener un colorante natural estable a partir de la zanahoria (*Daucus carota*), para uso alimenticio?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La Unión Europea define a los colorantes como sustancias que se agregan para restaurar el color en un alimento que incluyen componentes naturales de los alimentos y fuentes naturales que normalmente no se consumen como alimentos como tales y que normalmente no se usan como ingredientes característicos de la comida. Preparaciones obtenidas de alimentos y otros comestibles naturales, obtenidas por extracción física y / o química que dan como resultado un pigmento. La extracción de los pigmentos en relación con los componentes nutritivos o aromáticos son colores dentro del significado de este Reglamento (CE) N° 1925/2006 del Parlamento Europeo. (Schweiggert, 2018)

Existe una diferencia entre los aditivos de color (que están cubiertos por los Reglamentos en aditivos alimentarios) y lo que se conoce como foodproducts, colorantes alimenticios que son ingredientes alimenticios con propiedades colorantes. Estos son alimentos que se utilizan durante la fabricación de un producto el efecto secundario es la coloración. (Schweiggert, 2018)

Ejemplos interesantes de sustancias de color que pueden tener dos funciones en los alimentos son betacaroteno (E 160) y riboflavina (E-101). El b-caroteno es precursor de la vitamina A y riboflavina es vitamina B2. Estos dos colores proporcionan un valor nutritivo adicional a los productos que se agregan. Aparte de ser incluido en la regulación de los colorantes alimentarios que también están cubiertos por Reglamento (CE) N° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. (Schweiggert, 2018)

En 2005 Nestlé tomo la decisión de sustituir en gran parte todos los colores sintéticos de sus productos debido a las preocupaciones sobre sus efectos adversos para la salud. Como resultado, las variantes teñidas de azul de algunos dulces populares fueron eliminado ya que no había reemplazo para un color sintético azul brillante E133, sin embargo, fueron

reintroducidos en 2008 siendo coloreados esta vez con un pigmento azul-verde de origen natural obtenido de extracto de espirulina (algas), un ingrediente saludable permitido. (Schweiggert, 2018)

1.4. OBJETIVOS Y PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1.4.1. Objetivo General

Evaluar la estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*) como colorante natural usado en la industria alimentaria.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Extraer betacaroteno de la zanahoria (*Daucus carota*) mediante un método de extracción simple y fiable.
- Caracterizar el colorante obtenido.
- Medir la estabilidad del colorante obtenido de la zanahoria.

1.4.3. Preguntas de Investigación

- 1.- ¿Cuál es el método más idóneo para extraer un colorante natural de la zanahoria?
- 2.- ¿Qué métodos fisicoquímicos se emplean para caracterizar un colorante?
- 3.- ¿El colorante obtenido a partir de zanahoria será estable en varias condiciones?

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

(Ortiz & Mamami, 2015) de la facultad de tecnología carrera de química industrial de la Universidad Mayor de San Andrés desarrolló su trabajo de investigación el mismo que se denominó; OBTENCIÓN DEL BETA-CAROTENO A PARTIR DE LA ZANAHORIA Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA, la extracción de un colorante natural aplicando un método de extracción sólido-líquido mediante el uso de hexano puro como solvente, el colorante obtenido fue sometido a diversas pruebas de caracterización e identificación de betacaroteno en comparación con un testigo y su aplicación en un alimento como fue una pasta, estos autores llegaron a la conclusión que el colorante obtenido es fiable en el uso dentro de la industria alimenticia.

(Poveda & Granados, 2016) de la universidad de Zamorano de la carrera de agroindustria alimentaria indica en su estudio acerca de la “Evaluación de la estabilidad de β -carotenos en una papilla de harina de camote biofortificado con dos tiempos y dos temperaturas de cocción” los factores que tomó en cuenta al momento de evaluar la estabilidad de β -carotenos fueron la determinación de tiempos y temperaturas de cocción en donde identifico el mayor contenido de β -carotenos en harina de camote biofortificado (HCBF) y la preferencia de una papilla como alimento complementario a partir de HCBF, luego de ser expuesto a dichos factores, utilizo un diseño completamente alzar, con cuatro tratamientos (dos temperaturas 56-62 °C y 72-80 °C y dos tiempos de cocción 6-8 minutos, 12-14 minutos) y tres repeticiones. Para el análisis sensorial utilizó un Bloque Completo al Azar (BCA) con prueba de aceptación dirigida principalmente a madres hondureñas evaluando tres atributos color, olor y sabor de las papillas, los resultados que obtuvo en su estudio fue que la estabilidad de los β -carotenos se vio afectada directamente por las altas temperaturas y los tiempos aplicados en la cocción. El tratamiento dos fue el que tuvo mayor grado de aceptación.

(Yanchapanta, 2011) indica en su estudio acerca de la OBTENCIÓN DE UN COLORANTE NATURAL LA BETALAINA A PARTIR DE LA REMOLACHA (*Beta vulgaris*) PARA SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS Y BEBIDAS, SIN QUE SUS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS (SABOR Y OLOR) AFECTEN SU UTILIDAD la cual se llevó a cabo mediante métodos de obtención de cristalización y fermentación

utilizando remolacha fresca, donde se obtuvo que el mejor tratamiento fue correspondiente al tratamiento de cristalizado, en el cual la evaluación sensorial del producto no se obtuvieron diferencias significativas por lo tanto afirma que el colorante natural obtenido es una alternativa para el consumo de la ciudadanía.

(Córdoba, 2014) presentó en su trabajo de tesis denominado OBTENCIÓN DE UN COLORANTE ORGÁNICO PARA LA INDUSTRIA ALIMENTARIA A PARTIR DEL FRUTO PITAHAYA (*Hylocereus undatus*), EN EL LABORATORIO N° 107 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA (UNAN-MANAGUA). ENERO – JUNIO 2014, empleo un método de encapsulado con almidón obteniendo un colorante natural en polvo, de igual forma afirma que no existió un efecto negativo entre el extracto y el agente que fueron encapsulados, considerándolo aceptable como un colorante potencial en la industria de bebidas y productos alimentarios.

(Ordóñez & Saavedra, 2016) en su trabajo de investigación sobre la EXTRACCIÓN Y USO DEL COLORANTES NATURAL DE LA FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) COMO ALTERNATIVA PARA LA ELABORACIÓN DE SALCHICHA Y YOGUR, desarrollada en la facultad de ciencias químicas de la universidad de Cuenca, dicha investigación tuvo la finalidad de dar a conocer una alternativa en el uso de un colorante natural a partir de la flor de jamaica aplicado en productos alimenticios los mismos que fueron salchicha tipo Viena y yogurt, en la extracción y purificado del colorante se utilizó el equipo soxhlet, en cuanto a su evaluación sensorial obtuvieron buenos resultados en la aplicación en la salchicha con una dosis de 1ml de colorante de igual forma en el caso del yogurt con una dosis de 6ml de colorante.

(Vázquez, 2014) de la facultad de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, desarrollo su trabajo de investigación denominado EXTRACCIÓN Y USO POTENCIAL DE LAS ANTOCIANINAS DEL BAGAZO DE CAFÉ (*Coffea arábica* sp.) COMO COLORANTES EN BEBIDAS, para el desarrollo del mismo se utilizó la maduración temprana de la nativa del café “bourbon”, la extracción se llevó a cabo aplicando alcohol etílico en agua acidificado con ácido láctico al 85%, obteniendo un colorante con un tono rojo brillante constituyendo un sustituto potencial y atractivo para la industria.

2.2. MARCO TEÓRICO

Zanahoria

Zanahoria (*Daucus carota*) es un importante de alimento con una baja sensibilidad al sistema de cultivo, que hace que sea muy adecuado para su producción. Las zanahorias pueden consumirse crudas o cocidas o transformados en subproductos. La calidad de consumo de zanahorias es determinada por la variedad, la fertilización, la ubicación geográfica y el clima. (Bach, Kidmose, Kristensen, & Edelenbos, 2015, pág. A)

Producción de la Zanahoria

Salud del suelo

Un suelo sano es la base de la agricultura ecológica. adiciones periódicas de materia orgánica en forma de cultivos de cobertura, compost, o estiércol crear un suelo que es biológicamente activo, con buena estructura y capacidad de nutrientes de carga y el agua. La descomposición de materiales vegetales se activará una piscina diversa de microbios, incluyendo los que, de la materia orgánica en nutrientes disponibles para las plantas, así como otros que compiten con los patógenos de las plantas sobre la superficie de la raíz. (Seaman, 2016, pág. 2)

“Las zanahorias necesitan aire bueno y el drenaje del suelo para la gestión de la enfermedad. La obtención de largo, recto, raíz lisa es difícil. Se prefieren suelos de textura ligera que contienen algunas piedras o suelos bien drenados” (Seaman, 2016, pág. 8).

Para producir un cultivo sano, nutrientes solubles, debe haber suficiente del suelo para cumplir con los requisitos mínimos para toda la planta. Las necesidades de nutrientes totales de un cultivo son mucho mayores que sólo los nutrientes que se extraen del campo cuando se cosecha ese cultivo. Todas las raíces, tallos, hojas y otras partes de las plantas requieren nutrientes en momentos específicos durante el crecimiento y desarrollo de las plantas. El suelo debe por lo menos poseer el 3% de materia orgánica para considerarse un productivo (fosforo, potasio y nitrógeno). (Seaman, 2016, pág. 10)

Cosecha y Almacenamiento

Existen máquinas cosechadoras que se utilizan para el cultivo de procesamiento. Es importante mantener hojas de la zanahoria saludables para que la cosechadora puede arrancar las raíces, de igual forma se puede realizar la cosecha de forma manual halando desde sus hojas. (Seaman, 2016, pág. 14)

Las zanahorias se pueden almacenar durante varios meses a 0 ° C a 90-95% de humedad relativa. Si se permite que la temperatura suba, se producirá la brotación. Si la humedad relativa es demasiado baja, las raíces se secan. Las zanahorias se pueden almacenar en el campo sólo si existen excelentes condiciones del suelo. (Seaman, 2016, pág. 14)

Contenido de b-caroteno en la zanahoria

La zanahoria, entre las verduras, ha sido considerada como el héroe nutricional, ya que almacena una mina de oro de nutrientes. Ninguna otra verdura o fruta contiene tanta β -caroteno como las zanahorias. Los carotenoides prevalentes en sangre y tejidos humanos son α -caroteno, β -caroteno, luteína, licopeno, de estos, el β -caroteno representa aproximadamente el 50% de los niveles totales de carotenoides en la sangre. (Natarajmurthy , Askari, Pullabhatla, & Dharmesh, 2016, pág. 4)

En la tabla 1 se describe el contenido de carotenoides en algunos alimentos y vegetales.

Tabla 1. *Contenido de carotenoides de algunos alimentos y vegetales (mg/100g)*

Alimento	b-caroteno	a-caroteno	Luteína	b-criptoxantina
Espinacas, ERC	5500	0	12600	0
Brócoli, ERC	1300	1	1800	0
Zanahorias, ERC	9800	3700	260	0
Maíz, amarillo	51	50	780	0
Mangos, crudo	1300	0	0	54
Papaya, crudo	99	0	0	470
Melón	3000	35	0	0

Fuente: (Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016)

Carotenoides

Los carotenoides son una clase de pigmentos naturales conocidos por todos a través de los colores rojo-anaranjado de alimentos populares como las naranjas, los tomates y las

zanahorias y el color amarillo de muchas flores. Han sido estudiados por un número de años a causa de sus diversos papeles en fotobiología, la fotoquímica. Los carotenoides también se añaden como colorantes a muchos alimentos manufacturados, bebidas y alimentos para animales, ya sea en las formas de extractos naturales o como compuestos puros fabricados por síntesis química. (Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016, pág. 25)

Los carotenoides se describen a menudo como provitaminas A, debido a que esta vitamina en particular es un producto del metabolismo de carotenoides. La distribución de los carotenoides entre los diferentes grupos de plantas no muestra ningún patrón esperado. β -caroteno es el más abundante en los vegetales de hoja verde, aunque el color está enmascarado por su coexistencia con la clorofila, carotenoides y esto tiene la mayor actividad de la vitamina A. La zeaxantina, α -caroteno y antheraxantina también están presentes en pequeñas cantidades. En el tomate, el licopeno es el principal carotenoide, mientras que las frutas contienen proporciones variables de criptoxantina, luteína y antheraxanthin. (Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016, pág. 25)

Los carotenoides se han utilizado ampliamente en la industria alimentaria como colorantes en la producción de muchos alimentos. Se utilizan en la coloración de alimentos a base de grasas como la margarina, mantequilla, manteca, queso y aderezos fritos, formas dispersables en agua de carotenoides se han desarrollado para la coloración de alimentos a base de agua, tales como bebidas de tipo naranja. (Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016, pág. 27)

Química de los carotenoides

La estructura general de los carotenoides contiene una cadena principal molecular derivado de una cadena de cuarenta carbonos con dobles enlaces conjugados y los anillos de carbono terminales. Las propiedades distintivas de cada tipo de carotenoide se derivan de los grupos hidrocarbonados cíclicos y los grupos funcionales que contienen oxígeno unidos a su esqueleto molecular. (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018)

De acuerdo con los grupos funcionales constituyentes y la estructura química básica, los carotenoides pueden clasificarse como carotenos y xantofilas. Carotenos tales como β -caroteno ($C_{40} H_{56}$) son carotenoides puramente de hidrocarburo como carotenos y xantofilas mientras que xantofilas tales como astaxantina ($C_{40} H_{52} O_4$). (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018)

En la figura 1 se muestra la estructura química correspondiente al b-caroteno (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018)

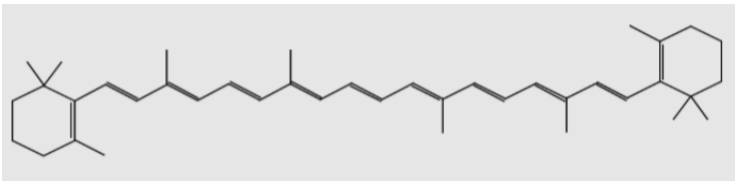
Carotenoide	Estructura química	Nombre IUPAC
β -caroteno		β , β -caroteno

Figura 1: Estructura química b-caroteno

Estabilidad de los carotenoides

Los carotenoides son propensos a la degradación, con isomerización, fragmentación y oxidación siendo parte de la degradación. Degradación de carotenoides por la oxidación es causada por la interacción con oxígeno activo especies, oxígeno singlete, superóxidos, peróxidos, hidroxilo radicales y metales de transición; que se catalizan en la presencia de calor y luz. (Fahmi Wan Mohamad , McNaughton , Buckow, & Augustin, 2017)

El betacaroteno, un tipo de pigmento natural comestible soluble en lípidos, se usa ampliamente en aditivos alimentarios y suplementos alimenticios para prevenir la deficiencia de vitamina A. Con un alto contenido de enlaces dobles conjugados, los carotenoides son muy sensibles al estrés ambiental durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos, como el calor, la luz y el oxígeno. Además, el microambiente de la matriz alimentaria también puede afectar la estabilidad del betacaroteno. (Zhou, y otros, 2018)

Por lo antes mencionado es importante tomar en cuenta varios aspectos que pueden provocar su degradación mismos que han sido evaluados en otros estudios como fue el caso de (Torres, 2015), quien evaluó la estabilidad de un pigmento natural en cuanto el efecto de ciertos factores y condiciones de almacenamiento como; pH, temperatura, y exposición durante cuatro semanas, tiempo en el cual obtuvo un valor de retención del 61.33% en la semana final de su investigación. De esta manera logra expresar la importancia de medir la

estabilidad de los pigmentos naturales bajo el efecto e interacción de los factores antes mencionados.

B-caroteno (C₄₀ H₅₆)

El β-caroteno es un importante pigmento vegetal natural y tiene varias funciones fisiológicas en los organismos. Con la propuesta de la biología sistemática y el progreso en la biosíntesis de carotenoides desde la década de 1960, la ingeniería metabólica ha jugado un papel importante en la mejora de la producción de carotenoides. (Wang, Xing, & Chen, 2017)

El b-caroteno además de ser un antioxidante, sirve como un precursor para la biosíntesis de la vitamina A en el cuerpo humano, previene la disminución de los glóbulos blancos y plaquetas causadas por radiación iónica, aumentando así el sistema de inmunidad y proporcionar protección contra la exposición a las radiaciones indeseables. (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018, pág. 8)

Conversión de b-caroteno en vitamina A

Betacaroteno y otros carotenoides conocidos también como provitamina A estaría disponible para la conversión a la vitamina A. La entrega de los carotenoides a tejido extrahepático se logra mediante la interacción de partículas de lipoproteína con los receptores y su posterior degradación por enzimas extrahepáticos como lipoproteína lipasa. Tejidos adiposos y el hígado aparecen cuantitativamente a ser los principales sitios de almacenamiento, mientras que la glándula suprarrenal, riñón y testículos también contienen una alta concentración por gramo. Se encontró, que la cocción suave y la ingestión adicional de grasas en la dieta mejora la absorción de carotenoides. (Kiokias, Proestos, & Varzakas, 2016, pág. 27)

Identificación de B-caroteno

En general, los carotenoides absorben la luz en longitudes de onda de 400-550 nm, de esta forma el a,b-carotenos pueden identificarse mediante una longitud de onda máxima entre 446 a 450 nm, mediante el método espectrofotométrico. (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), menciona que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el método analítico de elección para la separación, cuantificación y caracterización estructural

de los carotenoides de origen natural y sintéticos, así como para sus productos metabólicos. Comparaciones directas entre los métodos de CCA (cromatografía de columna abierta) y HPLC mostraron que cualquiera de estas técnicas puede ser usada para la determinación de las provitaminas A o los principales carotenoides. (Rodríguez Amaya, 2015)

Como se puede observar en la tabla 2 y 3 diferentes autores han establecido coeficientes de absorción específica para la identificación y cuantificación de ciertos carotenoides, aplicando el uso de solventes apolares, de igual manera (Rodríguez Amaya, 2015) establece que los mismos pueden ser normalmente extraídos con solventes orgánicos miscibles en agua como es el caso de etanol, acetona, y metanol.

Tabla 2. *Coficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoides.*

Carotenoide	$\lambda_{\text{máx.}}$ nm	Solvente (sugerido)
α -caroteno	444 nm	Petróleo ligero
β -caroteno	449 nm	Petróleo ligero
γ -caroteno	462 nm	Petróleo ligero
ϵ -caroteno	440 nm	Petróleo ligero
ζ -caroteno	400 nm	Hexano

Fuente: (Hurst, 2002)

Tabla 3. *Coficiente de absorción específica usados para la cuantificación de carotenoide. (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009)*

Carotenoide	$\lambda_{\text{máx.}}$ nm	Solvente
Violaxantina	424 nm, 449 nm	hexano, petróleo
β -criptoxantina	449 nm	ligero, dietiléter,
B-caroteno	449 nm	metanol y etanol.

Fuente: (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009)

En la tabla 4 se observan los coeficientes de absorción obtenidos respecto a la cuantificación de carotenoides en diferentes alimentos.

Tabla 4. *Absorción máxima de los carotenoides para el espectro visible usando hexano como solvente.*

Fruta o verdura analizada	Absorción máxima ($\lambda_{\text{máx}}$ nm)
Papaya	470.85
Maíz dulce	445.37

Zanahoria	449.15
Maracuyá	424.94
Mango	439.86

Fuente: (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009)

“El β -caroteno, el carotenoide más característico encontrado en la zanahoria absorbe a una longitud de onda máxima de 449 nm” (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009, pág. 91).

Extracción de carotenoides con disolvente

La extracción con disolvente es una técnica relativamente simple y adecuada utilizados convencionalmente para extraer carotenoides. Sin embargo, el proceso puede convertirse en un inconveniente si los disolventes orgánicos son caros, peligrosos o se utiliza en grandes cantidades. (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018, pág. 9)

La extracción con disolventes típicamente requiere múltiples etapas de extracción para lograr el nivel deseado de recuperación de carotenoides, por lo que es un método que consume tiempo. El pretratamiento se emplea para la interrupción de la membrana celular, la mejora de la movilidad de los carotenoides en el disolvente de extracción, mejorando así la eficiencia de la extracción. El tratamiento previo consiste en métodos mecánicos incluyendo molienda, molienda con perlas, ultrasonidos y homogeneización a alta presión; y métodos no mecánicos incluyendo hidrólisis enzimática o química. (Rammuni, Ariyadasa, Nimarshana, & Attalage, 2018)

“Los carotenoides en el caso de un extracto se logra cuantificar con una disolución en un volumen conocido (1g en 100ml) de un solvente apropiado, el mismo que puede llegar a ser; hexano, éter de petróleo ligero, acetona o etanol” (Hurst, 2002).

Los solventes con baja polaridad afectan mínimamente en la posición del coeficiente de absorción específica para su cuantificación e identificación expresados en la longitud de onda máxima (nm), donde los valores de abs, serán en su mayoría idénticos en solventes como petróleo líquido ligero, hexano, metanol o etanol. Sin embargo, se tiende a apreciar o esperar pequeñas variaciones entre los datos demostrados en otras investigaciones como aquellos obtenidos de forma experimental por lo que es importante establecer que el B-caroteno son carotenoides presentes en ciertos productos aun cuando los valores de longitudes de onda

máxima experimentales no sean exactamente iguales a los teóricos. (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009, pág. 87)

Aditivos Alimentarios

Se entiende por aditivo alimentario a cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al alimento sea con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente sea (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye "contaminantes" o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales. (FAO/ Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015)

Buenas prácticas de fabricación

Por buenas prácticas de fabricación (BPF) en el uso de aditivos alimentarios se entiende que la cantidad de aditivo añadida al alimento no excede de la cantidad razonablemente necesaria para obtener el efecto físico, nutricional o técnico que se trata de obtener en el alimento, la cantidad de aditivo que pasa a formar parte del alimento como consecuencia de su uso en la fabricación, elaboración o envasado de un alimento y que no tiene por objeto obtener ningún efecto físico o tecnológico en el mismo alimento, el aditivo es de calidad alimentaria apropiada y está preparado y manipulado de la misma forma que un ingrediente alimentario. La calidad alimentaria se consigue ajustándose a las especificaciones en su conjunto y no simplemente a criterios individuales respecto de la inocuidad. (FAO/ Organización Mundial de la Salud (OMS), 2015)

Dosis máxima de uso de un aditivo

Es la concentración más alta de este respecto de la cual la Comisión del Codex Alimentarius ha determinado que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y ha acordado que es inocua. Por lo general se expresa como mg de aditivo por kg de alimento. La dosis de uso máxima no suele corresponder a la dosis de uso óptima, recomendada o normal. De conformidad con las buenas prácticas de fabricación, la dosis de uso óptima, recomendada o normal difiere para cada aplicación de un aditivo y depende del efecto técnico previsto y del alimento específico en el cual se utilizaría dicho aditivo, teniendo

en cuenta el tipo de materia prima, la elaboración de los alimentos y su almacenamiento, transporte y manipulación posteriores por los distribuidores, los vendedores al por menor y los consumidores. (Codex Alimentarius , 1995)

Justificación del uso de aditivos

El uso de aditivos alimentarios está justificado únicamente si ello ofrece alguna ventaja, no presenta riesgos apreciables para la salud de los consumidores, no induce a error a éstos, y cumple una o más de las funciones tecnológicas establecidas por el Codex y los requisitos que se indican en la norma y únicamente cuando estos fines no pueden alcanzarse por otros medios que son factibles económica y tecnológicamente. (Codex Alimentarius , 1995)

Colorantes

Los colores de los alimentos se agregan a diferentes tipos de productos para aumentar su atractivo visual o para compensar las variaciones de color natural. El uso de estos aditivos está estrictamente regulado en la Unión Europea, los Estados Unidos y muchos otros países del mundo. (Oplatowska-Stachowiak & Elliot, 2015)

El color de los alimentos a menudo se asocia con el flavor, la seguridad y la nutrición del producto. Los colorantes alimentarios sintéticos se han utilizado debido a su alta estabilidad y bajo costo. Sin embargo, la percepción y la demanda del consumidor impulsó el reemplazo de colorantes sintéticos con alternativas derivadas naturalmente. (Sigurdson, Tang, & Giusti, 2017)

Según la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), un aditivo de color es cualquier material, que es un tinte, pigmento u otra sustancia hecha por un proceso de síntesis o extraído, aislado o derivado de otro modo, con o sin cambio de identidad intermedio o final, de una fuente vegetal, animal, mineral u otra y que, cuando se agrega o aplica a un alimento, medicamento o cosmético o al cuerpo humano o cualquier parte del mismo, es capaz (solo o por reacción con otra sustancia) de impartir un color al mismo. (CFR, 2016)

III. METODOLOGÍA

3.1. ENFOQUE METODOLÓGICO

3.1.1. Enfoque

El presente proyecto de investigación tiene un enfoque cuantitativo, del mismo se logró determinar diferentes parámetros del colorante obtenido como son; método de extracción, características físicoquímicas y la estabilidad que presento a la interacción de ciertos factores como; pH, temperatura y exposición a condiciones de almacenamiento a las cuales estuvo expuesto el pigmento, los mismos que fueron tabulados y analizados mediante un software estadístico InfoStat.

3.1.2. Tipo de Investigación

Una investigación experimental es un proceso sistemático donde el investigador o autor de la investigación será quien maneja y controle las variables de estudio de esta forma podrá medir cualquier cambio respecto a los factores a las cuales están expuestas las variables, en este caso el estudio se vio enfocado en evaluar la estabilidad que tuvo el pigmento.

Los tratamientos obtenidos se medirán bajo un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial ($A \times B \times C$), Se realizó también una prueba de significancia Tukey de $p < 0,05$ (95 % de probabilidad y 5 % como margen de error).

La investigación bibliográfica es fundamental e indispensable en un estudio investigativo a través de la revisión de documentos como; publicaciones científicas, artículos científicos, investigaciones de organismos nacionales e internacionales, etc, de esta manera las diferentes fuentes de información es una base muy relevante para el desarrollo de este estudio las mismas que sirvieron de soporte durante la realización del estudio investigativo.

3.2. HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa (Ha): La temperatura, pH y luz influyen en la estabilidad del pigmento obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*).

Hipótesis Nula (Ho): La temperatura, pH y luz no influyen en la estabilidad del pigmento obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*).

3.3. DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. Variables independientes:

Factores que influyen sobre la estabilidad del colorante;

- pH: 4, 5, 6
- Temperatura: 4, 14 y 68 °C
- Exposición: luz y oscuridad

3.3.2. Variable dependiente:

Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (*Daucus carota*).

Variable	Dimensión	Indicadores	Técnica	Instrumento
Factores que influyen sobre la estabilidad del colorante	Exposición del pigmento a ambientes y condiciones determinadas.	pH: 4, 5, 6 Temperatura: 4, 14 y 68 °C Exposición: luz y oscuridad	Se establecen los tratamientos con sus respectivas repeticiones los cuales son observados e inspeccionados con el propósito de cumplir con los factores a los cuales están siendo expuestos.	NTE INEN-ISO 1842:2013
Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (<i>Daucus carota</i>).	Porcentaje de retención de pigmento al ser expuesto en ambientes y condiciones determinadas.	Extinción (en Abs) y Transmisión (en %), registrar los datos.	Se realizó un monitoreo durante cuatro semanas, mediante análisis espectrofotométrico determinando el porcentaje de pigmento retenido en los tratamientos sometidos a las condiciones planteadas en este estudio.	Espectrofotómetro UV-Visible Lovibond NTE INEN-ISO 787-16 (Torres, 2015)

Tabla 5. Operacionalización de variables.

3.4. MÉTODOS UTILIZADOS

3.4.1 Materiales y reactivos

Materiales

- Cuchillo acero inoxidable
- Vasos de precipitado 1000ml
- Tubos de ensayo
- Papel filtro Whatman #1
- Termómetro
- Papel aluminio
- Espátula

Equipos

- Balanza aproximación de 0.01g
- Agitador Magnético
- Deshidratador GOURMIA GDF1850
- Refrigerador
- Estufa Ecocell
- Molinillo Hamilton Beach
- Espectrofotómetro UV-Visible Lovibond
- Potenciómetro Metter Toledo
- Equipo soxhlet semiautomatizado RAYPA SX-6.
- Refractómetro manual: 58 a 92°Brix
- Rebanador semi industrial

Materia Prima

- Zanahoria

Reactivos

- Etanol 96°C
- Hexano
- Agua destilada

3.4.2 Obtención del Colorante

El diagrama de flujo de extracción de colorante se indica en la figura 2.

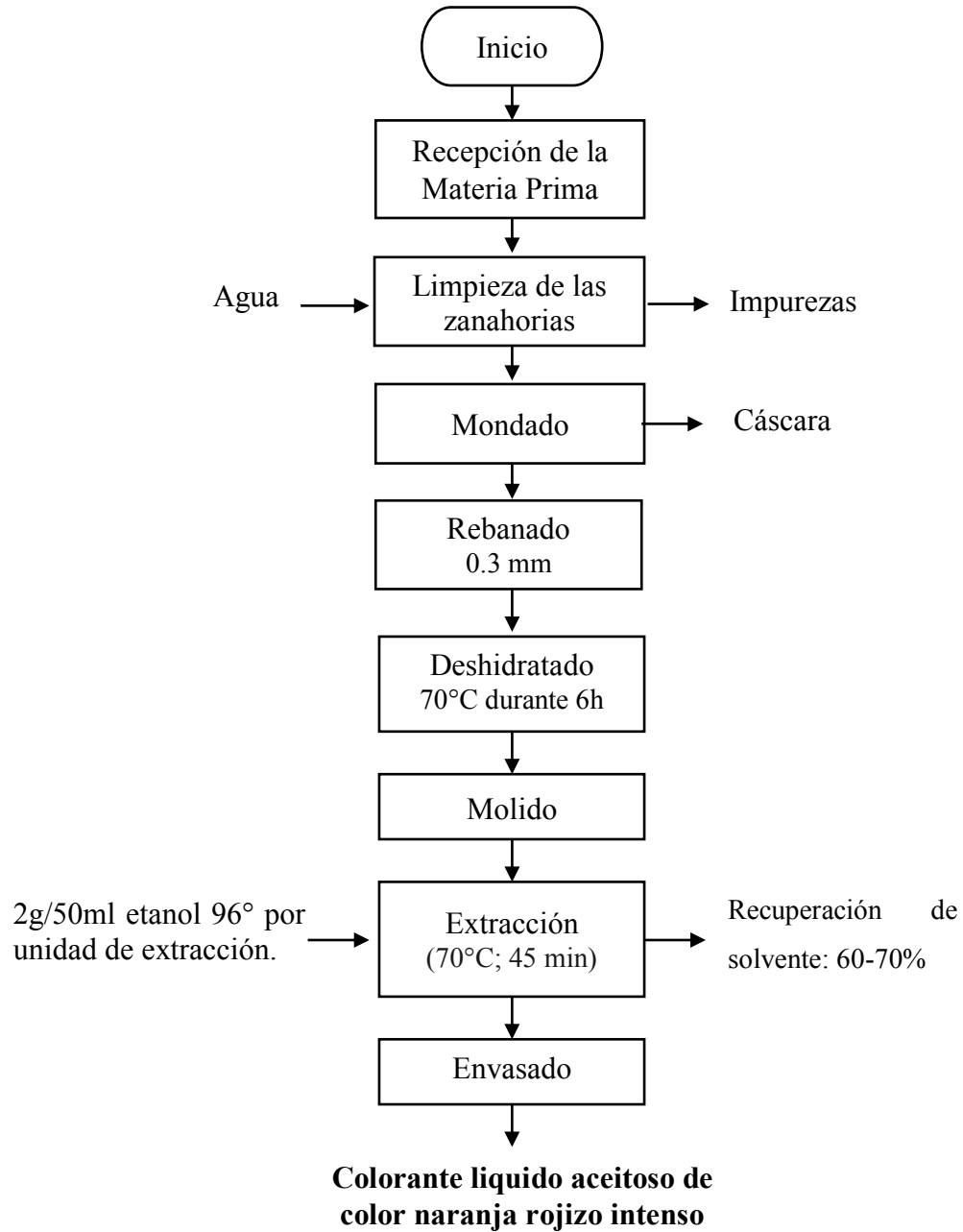


Figura 2: Diagrama de Flujo de extracción del colorante

Se utilizó el método aplicado en el estudio de Ortiz y Mamani (2015), el mismo que trata de la extracción por solvente, aplicando un método sólido-líquido mediante el uso de un equipo soxhlet, el cual es un método simple y confiable.

Recepción de la materia prima

La zanahoria fue adquirida en el mercado central de la ciudad de Tulcán y posteriormente llevada a los laboratorios de la universidad.

Limpieza de la zanahoria

Con la limpieza se eliminó en su totalidad las impurezas que acompañan a las zanahorias; se lo realizó manualmente retirando los restos de partículas físicas que pudieran afectar el proceso, este lavado fue realizado con agua potable.

Mondado de la zanahoria

En esta operación se retiró partes de la capa externa semi delgada de la zanahoria con el propósito de eliminar cualquier partícula que pudiese alojarse en la hortaliza.

Rebanado (Rebanador semi industrial)

Con la ayuda de un rebanador semi industrial se obtuvo rebanadas de zanahoria de aproximadamente 0.3 mm de grosor.

Deshidratado y molido

El proceso de deshidratado se llevó a cabo mediante un deshidratador eléctrico semi automático GOURMIA GDF1850 a una temperatura de 70°C durante 6 horas, las mismas que al culminar dicho proceso fueron sometidas a un proceso de molienda.

Extracción

Una vez que las muestras de zanahoria estén secas y molidas se procedió a extraer el colorante, el solvente que se utilizó fue etanol 96°, esta operación se realizó mediante el uso de un equipo soxhlet semiautomático RAYPA.

Envasado

El extracto de zanahoria obtenido fue colocado en un envase de vidrio color ámbar, el cual impedirá el contacto directo de luz, el mismo que fue un factor de estudio en esta investigación.

3.4.3. Extracción en equipo soxhlet semiautomático RAYPA SX-6

Según (Chamorro Requena, 2017) la extracción en Soxhlet automatizada la muestra es colocada en un recipiente de extracción e introducida en el disolvente hirviendo (Boiling) durante 30 - 60 min. El recipiente es entonces sometido a la extracción soxhlet con el reflujo del disolvente donde es posible hacer una evaporación de este.

De esta forma la extracción se realizó de la siguiente manera, tomando como referencia lo antes mencionado;

1. Se pesa 2g de muestra de zanahoria deshidratada y molida previamente por cada sección de extracción del equipo.
2. Se cubre cada una de las muestras con papel filtro Whatman #1 de tal manera que las partículas queden en su interior.
3. Se ubica las muestras dentro de los cartuchos de celulosa y se coloca con los cascos de aluminio respectivamente.
4. Colocar los cartuchos de celulosa en el equipo y alzarlos.
5. Añadir 50ml de etanol en cada vaso de alineación, con ayuda de la gradilla de alineación se coloca de forma correcta al equipo
6. Con el asa de inserción acoplar los vasos con el disolvente asegurándose que cada uno quede completamente sujeto y acoplado al equipo.
7. Se inicia el proceso de extracción; una vez las muestras son descendidas se empieza con la etapa de “Boiling” durante 25min es importante verificar que exista el reflujo del disolvente, luego se procede a la etapa de “Rinsing” durante 15 min donde las muestras son alzadas y finalmente la etapa “Recovery” durante 5min en la cual se suspende el proceso de reflujo.
8. Dejar enfriar por al menos 5min.
9. Almacenar el pigmento obtenido y recuperar el disolvente del equipo (60-70%).

3.4.4. Caracterización de pigmento

El pigmento y sus propiedades físicas directas, el análisis del color se puede realizar por métodos físicos o químicos. Químicamente, esto depende de la extracción de los compuestos de pigmentos por disolución en disolventes polares o apolares. Luego, el espectro identifica un coeficiente de absorción específica para su identificación mediante un barrido espectral, obteniendo así la longitud de onda de máxima absorbancia. (Torres, 2015)

“El β -caroteno, el carotenoide más característico encontrado en la zanahoria absorbe a una longitud de onda máxima de 449 nm” (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009, pág. 91).

3.4.4.1. Determinación de sólidos solubles (°Brix)

La determinación de los sólidos solubles se desarrolló por el método refractométrico (NTE INEN-ISO 2173:2013), se coloca la muestra de extracto obtenida en el lector del dispositivo y el resultado se expresará como “°Brix”.

3.4.4.2. Determinación de pH

La medición del pH se efectuó por el método potenciométrico (NTE INEN-ISO 1842:2013) con un potenciómetro previamente calibrado.

3.4.5. Estabilidad del colorante

Con el fin de llevar a cabo la evaluación de la estabilidad del pigmento se tomó como referencia lo realizado por Torres (2015) en su estudio denominado “Evaluación de la estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de mortiño (*Vaccinium myrtillus* L) como colorante para la industria de alimentos”, por lo tanto se realizó un monitoreo durante cuatro semanas, donde los tratamientos fueron sometidos a un análisis espectrofotométrico una vez por semana con el fin de determinar el porcentaje de pigmento retenido frente a los factores y condiciones establecidas en esta investigación, mismas que fueron replicadas por el estudio anteriormente mencionado.

3.4.5.1 Procedimiento para evaluar la estabilidad del colorante natural

Temperatura: se probaron tres temperaturas (4°C, 14°C y 68°C), estas fueron seleccionadas debido a que la mayoría de los alimentos son almacenados a estas temperaturas o en caso de ser sometidos algún tratamiento térmico se puede alcanzar temperaturas de 68°C (Torres, 2015).

Para la temperatura de 4°C se usó un refrigerador, los 14°C correspondieron a las muestras a temperatura ambiente y para la de 68°C se emplearon una estufa.

pH: se probaron tres valores de pH (4, 5, 6) debido a que la mayoría de los alimentos que se consumen oscilan en estos valores (Torres, 2015).

Luz: las muestras se mantuvieron en dos ambientes; oscuridad y expuestas a la luz (Torres, 2015).

Los tratamientos a los cuales estuvieron expuestos a luz y a oscuridad fueron colocados en frascos de vidrio transparentes y frascos de vidrio color ámbar respectivamente.

Determinación espectrofotométrica

Para esto se empleó un Espectrofotómetro UV-Visible Lovibond, el procedimiento aplicado fue el siguiente:

1. Se ingresa la longitud de onda en el campo de medición.
2. Se coloca la cubeta con el ensayo en blanco en el compartimiento de medición, se realizó la lectura.
3. Se retira a el ensayo en blanco, y se procederá a colocar en el compartimiento de medición una cubeta con el test llena y se realiza la lectura.
4. En la pantalla aparecerán los resultados como Extinción (en Abs) y Transmisión (en %), finalmente se registraron los datos.

3.4.6. Análisis Estadístico

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA), con un arreglo factorial (AxBxC), este modelo de diseño es recomendado cuando las unidades experimentales son homogéneas

y la variación entre ellas es muy pequeña. Este diseño estadístico es muy empleado en el caso de experimentación a nivel de laboratorio, en donde las condiciones ambientales y resto de variables pueden ser controladas. Por lo tanto, puede denominarse una prueba con un solo criterio de clasificación. (Padrón, 2009)

El modelo matemático establecido en esta investigación se expresa en la tabla 6.

Tabla 6. Modelo matemático para el diseño completamente al azar (DCA)

F. de V.	g de l.	S C	C M	F
Total	$rt - 1$	$\sum_1^{rt} x^2 - \frac{(\sum_1^{rt} x)^2}{rt}$		
Tratamientos	$t - 1$	$\sum_1^t \frac{(\sum_1^r x)^2}{r} - FC^*$	SC/ g. de l.	C. M. Tratamientos. C.M. Error
Error	$t(r - 1)$	Total - tratamientos.	SC/ g. de l.	

$$* F. C. (Factor de Corrección) = \frac{(\sum_1^{rt} x)^2}{rt}$$

Donde:

t = Número de tratamientos

r = Número de repeticiones

S C = Suma de cuadrados

C M = Cuadrado medio

Esquema del Experimento

Para esta investigación los tratamientos a ser aplicados a nivel experimental se observan en la tabla 7

El esquema del experimento se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Esquema del experimento

TRATAMIENTOS	CÓDIGO	TRATAMIENTOS	CÓDIGO
T 1	A1B1C1	T 10	A2B2C2
T 2	A1B1C2	T 11	A2B3C1
T 3	A1B2C1	T 12	A2B3C2
T 4	A1B2C2	T 13	A3B1C1
T 5	A1B3C1	T 14	A3B1C2
T 6	A1B3C2	T 15	A3B2C1

T 7	A2B1C1	T 16	A3B2C2
T 8	A2B1C2	T 17	A3B3C1
T 9	A2B2C1	T 18	A3B3C2

A1, A2, A3 = Temperaturas

- A1= 4°C;
- A2= 14°C;
- A3= 68°C.

B1, B2, B3 = pH

- B1=4;
- B2=5;
- B3=6.

C1, C2 = Luz

- C1= luz;
- C2 = oscuridad.

Otras características del ensayo son:

La determinación del número de tratamiento se realizó tomando en cuenta la interacción de todos los factores y sus respectivos niveles a estudiar, bajo un diseño completamente al azar con un arreglo factorial (AxBxC), considerando tres replicas por cada uno;

- Número de repeticiones por tratamiento: 3
- Número de tratamientos: 18
- Número de unidades experimentales: 54

3.4.7. Procesamiento y análisis de datos

La información recolectada experimentalmente en esta investigación fue procesada mediante un análisis estadístico de varianza ANOVA, los valores obtenidos durante el estudio investigativo fueron tabulados y analizados mediante el software estadístico InfoStat.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS

A continuación, se detallan los resultados obtenidos acerca del estudio en esta investigación;

4.1.1. EXTRACCIÓN DEL COLORANTE A PARTIR DE ZANAHORIA

La extracción del pigmento se realizó tomando como referencia lo realizado por (Ortiz & Mamami, 2015), en la que se estable un modelo confiable y seguro de extracción mediante el uso de un equipo soxhlet, la pureza del alcohol es un aspecto muy importante ya que influye en la concentración final del extracto, por tal razón se optó por utilizar como solvente etanol 96° para llevar acabo la obtención del pigmento, de igual forma se tomó en cuenta su menor toxicidad en cuando a otros solventes comúnmente empleados como es hexano, acetona o éter de petróleo que poseen un mayor nivel de toxicidad.

Es importante mencionar que se empleó un equipo soxhlet semiautomático el mismo que facilito la obtención del extracto concentrado sin necesidad de usar un rotavapor. La materia prima fue previamente secada y molida para facilitar la extracción en el equipo.

4.1.1.2. Solubilidad

Se realizó pruebas de solubilidad del pigmento para observar el comportamiento que obtuvo frente un disolvente polar (agua) y otros solventes apolar (hexano y etanol), donde se logró apreciar que mantiene excelentes propiedades solubles en disolventes apolares a una temperatura de 50°C aproximadamente logrando disolver el pigmento completamente, por lo contrario al someterse a un disolvente polar como fue en este caso agua, el pigmento se mostró hidrófobo debido a las propiedades estructurales características del B-caroteno (C₄₀H₅₆) que es un carotenoides puramente de hidrocarburo que demuestran su alta solubilidad en solventes apolares.

4.1.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL PIGMENTO NATURAL OBTENIDO A PARTIR DE ZANAHORIA

En la tabla 8, se describen los resultados observados en la investigación en cuanto a la caracterización del extracto de pigmento obtenido a partir de la zanahoria.

Tabla 8. *Resultado de la caracterización fisicoquímica del pigmento*

Parámetro	Resultado
pH	4.10
°Brix	73
Absorbancia	449 nm

El pigmento obtenido presento un pH de 4.10, un contenido en sólidos soluble de 73 indicados en Grados Brix, a causa del proceso de concentración donde se eliminó el contenido de agua que retenía el extracto, también se realizó un barrido entre una longitud de onda de 330 y 900 nm obteniendo un máximo de absorción de 449 nm, determinando que son carotenoides del tipo b-caroteno que tienen un rango máximo de absorción de 450 nm.

4.1.3. ESTABILIDAD DEL PIGMENTO NATURAL EXTRAÍDO A PARTIR DE ZANAHORIA A DIFERENTES CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

La estabilidad del pigmento se evaluó mediante diferentes factores como pH (4, 5, 6); temperatura (4, 14, 68°C) y ambientes de almacenamiento o exposición (expuesto a la luz y en oscuridad), el proceso de evaluación fue realizado durante 4 semanas, donde se realizó un seguimiento semanal obteniendo valores de retención del pigmento en cuanto a su estabilidad en dichas condiciones, los valores se obtuvieron mediante lecturas por medio de un espectrofotómetro el mismo que determinara cual tratamiento presento mayor estabilidad.

Una vez obtenidos los valores correspondientes de evaluación del extracto de zanahoria se procedió a realizar el análisis estadístico donde se obtuvieron los siguientes resultados:

El ANOVA del estudio se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. *Análisis de varianza del porcentaje de retención del extracto de zanahoria a diferentes condiciones de ambiente y almacenamiento*

F.V.	SC	gl	CM	F
Total	5452,26	215		
Exposición	18,66	1	18,56	3,11
pH	492,61	2	246,31	41,08
T°	111,67	2	55,78	9,30
pH*T°	311,16	4	77,79	12,97
Exposición*T°	34,52	2	17,26	2,88
Exposición*pH	4,34	2	2,67	0,45
Exposición*pH*T°	21,11	4	5,28	0,88
Semana	3288,11	3	1096,04	
Error	1169,19	195	6,00	
CV	2,57	%		

4.1.3.1. Efecto de pH

Como se puede observar en la tabla 10, los tratamientos analizados respecto al efecto del pH sobre la estabilidad del pigmento, se aprecia que existe una diferencia significativa en pH de 4 el mismo de difiere del efecto del pH 5 y 6 los cuales no presentaron diferencias significativas y son aquellas que mayor porcentaje de retención obtuvieron respectivamente. A pesar de estas diferencias el pigmento mantiene un buen porcentaje de retención dentro de estos tres rangos de pH.

Tabla 10. *Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto al pH*

Factor pH	Promedios (%)	Rango estadístico
5	96,30	A
6	96,16	A
4	93,03	B

Al analizar el efecto del pH durante 4 semanas se puede observar los promedios obtenidos que hacen referencia al porcentaje de retención del pigmento durante este tiempo y así evaluar su estabilidad frente a la exposición de este factor. Se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto al pH

Factor	Promedio porcentaje de retención semanas			
	pH	Semana 1	Semana 2	Semana 3
5	100	97,79	94,80	92,43
6	100	98,34	94,94	91,34
4	100	95,65	91,40	85,01

En la figura 3 se logra observar la respuesta del pigmento frente a la exposición de los diferentes rangos de pH, donde se puede apreciar que el pigmento a un pH 4 tuvo menor porcentaje de retención cada semana de estudio con respecto al pigmento sometido a pH de 5 y 6 los mismo que logran mantener un mayor porcentaje de retención.

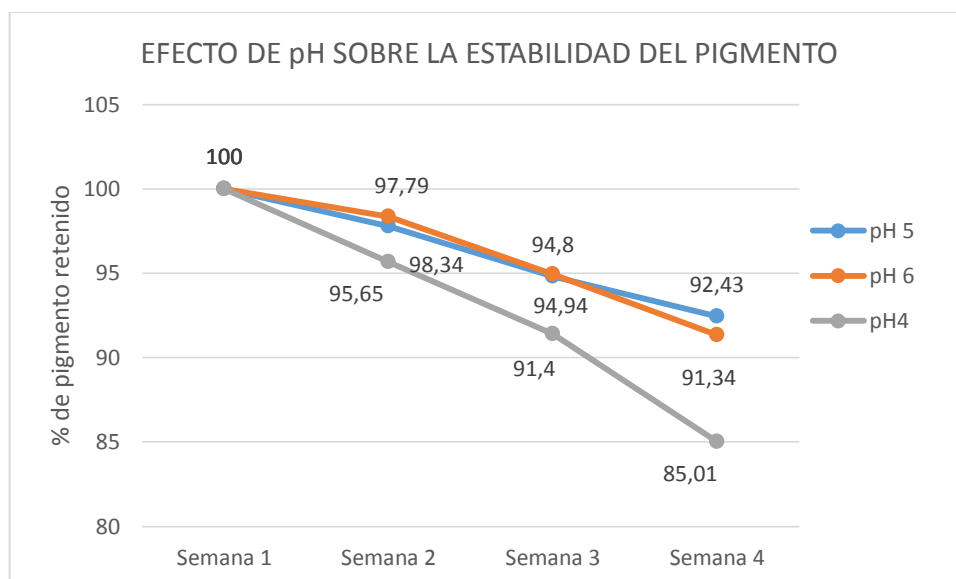


Figura 3 Efecto del pH sobre la estabilidad del pigmento

4.1.3.2. Efecto de la temperatura

Al analizar el efecto de la temperatura sobre el porcentaje de retención del pigmento se logra observar que existió una diferencia significativa correspondiente a la exposición a una temperatura de 68°C donde se obtuvo un menor porcentaje de retención del pigmento a diferencia de la exposición a temperaturas de 4 y 14°C donde mostraron un mayor porcentaje de retención respectivamente. Sin embargo, el pigmento mantiene un excelente porcentaje de retención independientemente a la temperatura que fue expuesto en este estudio. Se indica en la tabla 12.

Tabla 12. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la temperatura

Factor T°	Promedios (%)	Rango estadístico
4	95,92	A
14	95,38	A
68	94,20	B

En la tabla 13 se puede observar los promedios obtenidos durante el periodo de estudio de la evaluación de estabilidad respecto a la exposición con diferentes temperaturas, donde se logra verificar que el porcentaje de retención del pigmento va disminuyendo cada semana independientemente de la temperatura al que fue sometido.

Tabla 13. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto a la temperatura.

Factor T°	Promedios porcentajes temperaturas semanas			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
4	100	97,75	94,68	91,23
14	100	98,49	94,48	88,51
68	100	95,70	91,97	89,09

En la figura 4 se puede apreciar cómo influye el efecto de la temperatura en la retención de porcentaje del pigmento donde se logra observar que existe mayor pérdida a una temperatura de 68°C desde la primera semana de estudio con respecto a la temperatura de 4 y 14 °C que obtuvieron menor porcentaje de pérdida respectivamente, de igual forma cabe recalcar que existió una pérdida notoria en cuanto a la retención de pigmento a una temperatura de 14°C en la última semana del estudio.

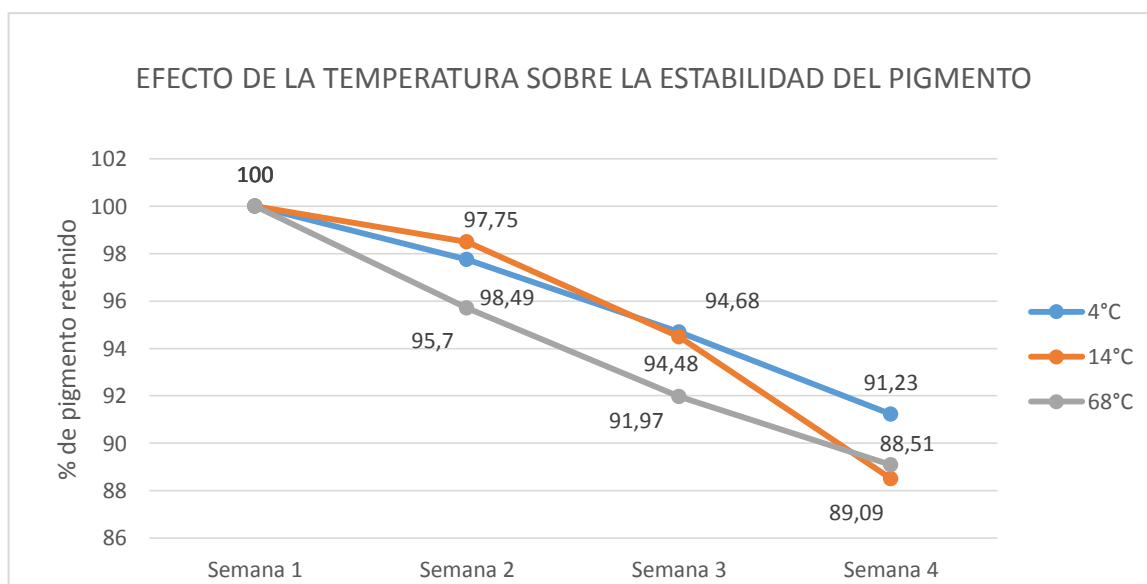


Figura 4: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad del pigmento

4.1.3.3. Efecto de condiciones de almacenamiento

En la prueba de Tukey respecto a las condiciones de almacenamiento del pigmento en luz y oscuridad se logra observar en la tabla 14, que no existieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de retención del pigmento. Por lo que se puede establecer que el pigmento extraído logra mantenerse estable en ambas situaciones durante el tiempo de exposición en este estudio.

Tabla 14. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la exposición.

Factor	Promedios (%)	Rango estadístico
Luz	95,46	A
Oscuridad	94,87	A

En la tabla 15 se observa los promedios obtenidos en cuanto al efecto de las condiciones de almacenamiento del pigmento, donde se puede apreciar el comportamiento de este durante las cuatro semanas de exposición.

Tabla 15. Porcentaje de colorante retenido por semanas respecto a la exposición

Exposición		Promedio porcentaje exposición semanas			
Factores	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	
Luz	100	97,41	94,40	90,00	
Oscuridad	100	97,22	93,03	89,21	

En la figura 5 se muestra el efecto de las condiciones de almacenamiento o exposición (luz y oscuridad) del pigmento, observando que los valores obtenidos se muestran similares en ambas circunstancias durante el tiempo de exposición al que fue sometido el mismo.

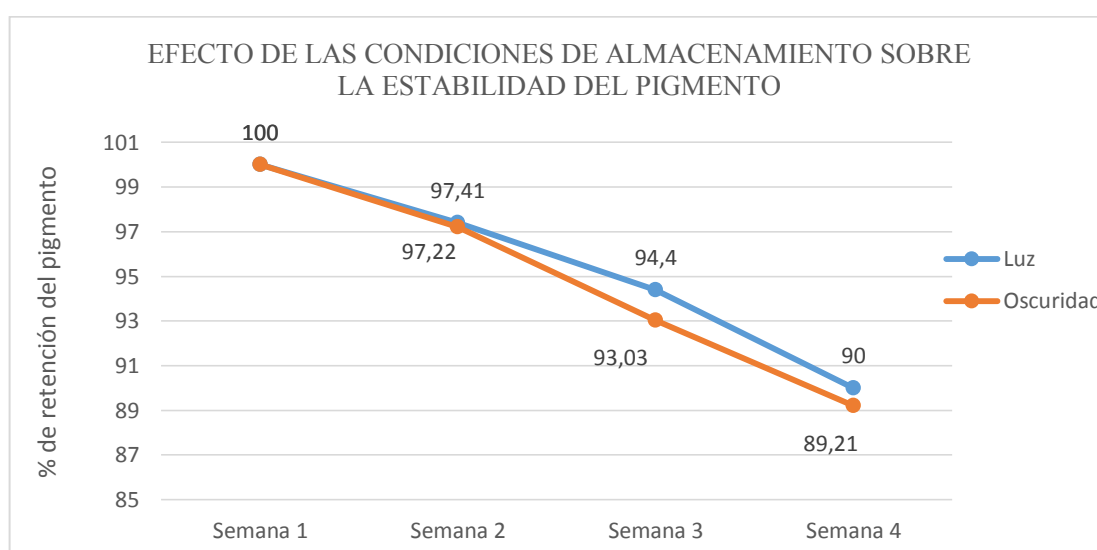


Figura 5: Efecto de la exposición sobre la estabilidad del pigmento

4.1.3.4. Interacción pH vs Temperatura

Con respecto a la prueba Tukey realizada a la interacción de pH y T se puede observar en la tabla 15 que existieron diferencias significativas, logrando apreciar que los tratamientos con pH de 5 y 6 a una temperatura entre 4 y 68°C no mostraron diferencias significativas al igual que los tratamientos con un pH de 4 a 4° C existiendo un menor efecto en la pérdida de pigmento o degradación, sin embargo se observa lo contrario en los tratamientos con una pH 4 entre temperaturas de 14 y 68°C los mismo que mostraron una diferencia significativa con un mayor porcentaje de degradación del pigmento. Cabe destacar que esta diferencia no supera el 10% de colorante degradado, se muestra en la tabla 16.

Tabla 16. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción pH vs temperatura.

Factores		Promedios (%)	Rango estadístico	
pH	T°			
5	14	96,92	A	
6	68	96,62	A	
5	4	96,01	A	
6	4	95,99	A	
5	68	95,97	A	
6	14	95,88	A	
4	4	95,76	A	
4	14	93,33		B
4	68	90,00		C

4.1.3.5. Interacción exposición vs Temperatura

En la tabla 17 se presenta la prueba Tukey correspondiente a la interacción de la exposición o condiciones de almacenamiento y la temperatura, donde se logra observar que existió una diferencia significativa en los tratamientos expuestos a una temperatura de 68°C en oscuridad obteniendo un porcentaje de retención de 93,35 siendo el más bajo con respecto a esta interacción, en cuanto a los demás tratamientos no existieron diferencias significativas entre los mismos. Al igual que la interacción anterior la degradación del pigmento no fue mayor al 10%.

Tabla 17. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción exposición vs temperatura

Factores		Promedios (%)	Rango estadístico	
Exposición	T°			
Oscuridad	4	96,01	A	
Luz	14	95,83	A	
Luz	4	95,51	A	
Oscuridad	14	95,25	A	
Luz	68	95,04	A	
Oscuridad	68	93,35		B

4.1.3.6. Interacción exposición vs pH

En la tabla 18 se observan los resultados obtenidos en cuanto a la interacción exposición y pH donde se logra apreciar que existen diferencias significativas en cuanto a los tratamientos sometidos a un nivel de pH 4 en ambas condiciones de almacenamiento, siendo estos quienes presentan una menor retención de pigmento que los tratamientos en condiciones de luz y oscuridad entre un pH 5 y 6 los mismo que obtuvieron mayor porcentaje de retención del pigmento.

Tabla 18. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción exposición vs pH

Factores		Promedios (%)	Rango estadístico
Exposición	pH		
Luz	6	96,67	A
Luz	5	96,54	A
Oscuridad	5	96,07	A
Oscuridad	6	95,65	A
Luz	4	93,17	B
Oscuridad	4	92,89	B

4.1.3.7. Interacción Exposición, Temperatura y pH

En la tabla 19 se presentan los valores obtenidos en cuanto a la interacción de los tres factores a los cuales estuvo expuesto el pigmento, como se logra observar existen diferencias significativas en cuanto a pequeñas variaciones en sus valores que no superan el 12% de degradación del pigmento en el peor de los casos siendo correspondiente a la interacción de oscuridad, pH 4 y 68°C donde se observa un valor de 88.91% de retención del pigmento, por otra parte se logra apreciar que los tratamientos a los cuales estuvieron expuestos a luz, un pH de 6 y 5 a una temperatura de 68°C, 14°C presentaron mayor porcentaje de retención superando el 97% del mismo. Es importante mencionar que la estabilidad del pigmento durante la exposición de estos tres factores ha sido favorable por consiguiente se puede afirmar que el pigmento demuestra gran estabilidad frente a la exposición de diferentes condiciones y ambientes de almacenamiento.

Tabla 19. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto a la interacción pH vs temperatura y exposición

Exposición	Factores		Promedios (%)	Rango estadístico				
	pH	T°						
Luz	6	68	97,46	A				
Luz	5	14	97,15	A	B			
Oscuridad	5	14	96,69	A	B			
Luz	6	14	96,65	A	B			
Luz	5	68	96,57	A	B			
Oscuridad	5	4	96,13	A	B	C		
Oscuridad	6	4	96,08	A	B	C		
Luz	6	4	95,90	A	B	C		
Luz	5	4	95,89	A	B	C		
Oscuridad	4	4	95,84	A	B	C		
Oscuridad	6	68	95,78	A	B	C		
Luz	4	4	95,68	A	B	C		
Oscuridad	5	68	95,37	A	B	C		
Oscuridad	6	14	95,10	A	B	C		
Oscuridad	4	14	93,94		B	C	D	
Luz	4	14	92,72			C	D	
Luz	4	68	91,10				D	E
Oscuridad	4	68	88,91					E

4.1.3.8. Porcentaje de pigmento retenido por semanas

En la tabla 20 podemos apreciar los promedios obtenidos durante el tiempo de estudio (4 semanas) en el que fue expuesto el pigmento a las diferentes condiciones y ambientes de almacenamiento, logrando observar cómo influyen los mismo en la estabilidad del pigmento mediante la degradación del mismo, obteniendo un valor más bajo de 89,62% de retención del pigmento a la cuarta semana de estudio, lo que indica que la estabilidad del pigmento frente a la exposición de estos factores ha sido muy buena en comparación a otros pigmentos vegetales evaluados en condiciones similares, obtenido pérdidas en el porcentaje de retención del 40% en la cuarta semana.

Tabla 20. Prueba de Tukey para el porcentaje de pigmento retenido respecto al tiempo

Factor Semana	Promedios (%)	Rango estadístico
S 1	100	A
S 2	97,32	B
S 3	93,72	C
S 4	89,62	D

En la figura 6 se puede observar los promedios obtenidos de retención del pigmento cada semana donde se logra observar el comportamiento del pigmento frente a la exposición a los diferentes factores, se puede apreciar como el pigmento se va degradando cada semana de estudio obtenido en la cuarta semana un valor de 89,62% de retención de pigmento.

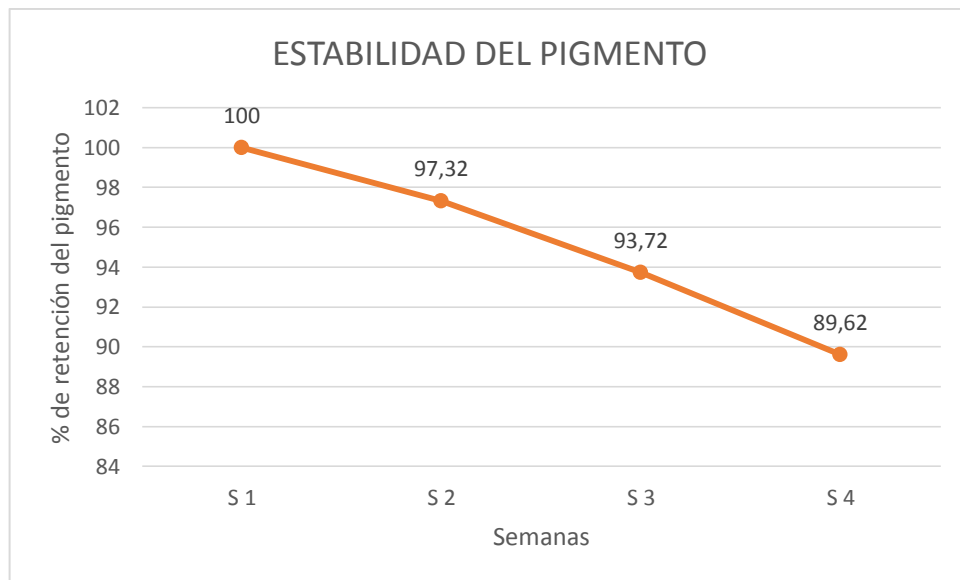


Figura 6: Efecto del tiempo sobre la estabilidad del pigmento

4.2. DISCUSIÓN

En cuanto a la extracción del pigmento se concuerda con lo mencionado por (Ortiz & Mamami, 2015) ya que el método de extracción aplicado en ambas investigaciones resulta ser un proceso de extracción adecuado, el mismo que asegura la extracción del pigmento con una mínima degradación mediante el uso de un equipo extractor soxhlet, el cual se establece como un método simple y confiable, de igual forma en ambos casos se extrajo un extracto de zanahoria concentrado con características similares tanto en su apariencia y forma viscosa aceitosa de color fuerte, insoluble en agua, de olor característico, el mismo que logro ser identificado como un carotenoide de tipo b-caroteno, tal cual establece (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009), quien extrajo b-caroteno de la zanahoria misma que logra identificarlo mediante el método espectrofotométrico obteniendo una longitud de onda máxima de 449nm correspondiente al coeficiente de absorción específica para la identificación del mismo.

Según (Burgos Sierra & Calderon Rivera, 2009) los solventes con baja polaridad afectan mínimamente en la posición del coeficiente de absorción específica para su cuantificación e identificación expresados en longitud de onda máxima (nm), donde los valores de absorbancia, serán en su mayoría idénticos en solventes como petróleo líquido ligero, hexano, metanol o etanol, misma que extrajo b-caroteno a partir de la zanahoria donde obtuvo un coeficiente de absorción específica de 449 nm usando como solventes; hexano y petróleo líquido ligero respectivamente, en esta investigación se usó como solvente etanol obteniendo una absorbancia máxima de 449 nm, de esta forma se concuerda con lo mencionado en su estudio mismo que logro demostrarse en esta investigación.

En cuanto a la evaluación de la solubilidad del pigmento podemos concordar con lo mencionado por (Chamorro Requena, 2017) donde afirma que los carotenoides son un grupo de pigmentos naturales solubles en lípidos y solventes no polares, como se logró evidenciar en esta investigación, de igual forma se obtuvo un resultado similar donde se logra alcanzar una solubilidad máxima del pigmento a una temperatura de 50°C en ambas investigaciones.

En relación a la influencia de la temperatura sobre el porcentaje de retención del pigmento se concuerda con lo expuesto por (Meléndez Martínez, Vicario, & Heredia, 2004) el mismo que realizó una investigación acerca de numerosos estudios sobre de la estabilidad de los

pigmentos carotenoides, en donde establece que el pigmento de b-caroteno al ser sometido a tratamientos térmicos inferiores o igual a 100°C producen pérdidas o degradación del pigmento ligeras o no significativas como se mostró en esta investigación, por otra parte afirma que al ser sometido a tratamientos térmicos superior a los 165°C si se observan pérdidas significativas y notorias en cuanto a la retención del pigmento que obteniendo valores incluso inferiores al 50%. Cabe mencionar que los resultados obtenidos son postratamiento. De esta forma podemos establecer que a temperaturas bajas el pigmento se mantiene aún más estable.

En cuanto al efecto a la exposición de luz y oscuridad se obtuvo que la pérdida o degradación de color no mostro diferencias significativas en cuanto a la exposición de los mismos obteniendo pérdidas inferiores al 12% de retención del pigmento en la cuarta semana, de esta forma se concuerda con lo mencionado por (Meléndez Martínez, Vicario, & Heredia, 2004) el mismo que establece que tampoco existieron diferencias significativas al exponer el pigmento a los mismos factores durante ocho semanas.

Respecto a la influencia de pH se concuerda con lo establecido por (Meléndez Martínez, Vicario, & Heredia, 2004) donde afirma que los carotenoides son inestables o no son relativamente resistentes en un medio ácido extremo logrando demostrarse en nuestra investigación en la cual se obtuvo una diferencia significativa en aquellos tratamientos a los cuales estuvieron expuestos a un medio más ácido siendo estos quienes obtuvieron una menor cantidad de retención de pigmento. De igual forma se conviene con Santacruz, quien expresa que el pH es un factor muy importante y significativo frente a la degradación del color de los extractos enriquecidos mostrando relevancia en cuanto el pH y sobre todo en el tiempo de almacenamiento los mismo que influyen frente al comportamiento del color. (Santacruz, 2011)

Con respecto a la estabilidad del pigmento frente a la interacción de ciertos factores como pH, temperatura y condiciones de almacenamiento, se logra observar que el comportamiento del mismo fue muy favorable en cuanto al nivel de degradación, obteniendo un valor en la cuarta semana de 89,62% de pigmento retenido, por lo que se puede establecer que el b-caroteno presenta mayor estabilidad frente a estas condiciones en comparación a otros pigmentos de origen natural a los cuales estuvieron expuestos a los mismos factores y tiempo de estudio como fue en el caso de (Torres, 2015) en su estudio denominado “Evaluación de la

estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de mortiño (*Vaccinium myrtillus* L) como colorante para la industria de alimentos” el mismo que obtuvo valores de porcentajes de retención del pigmento menores a partir de la primera semana de estudio, obteniendo en la cuarta semana un valor final de 61,33%.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

Se logró la extracción del pigmento natural a partir de la Zanahoria (*Daucus carota*), la misma que fue sometida a un adecuado proceso de extracción, empezando por el acondicionamiento de la materia prima, es decir se realizó una limpieza adecuada y se eliminó cualquier residuo o daño físico presente, se sometió a un proceso de secado y molienda y se procedió al inicio de la extracción mediante un equipo soxhlet semiautomático el mismo que facilitó la obtención del pigmento. Una vez obtenido el pigmento se realizó su identificación empleando un espectrofotómetro donde la muestra fue analizada mediante un barrido entre una longitud de onda de 330 y 900 nm obteniendo un máximo de absorción de 449 nm, determinando que son carotenoides del tipo b-caroteno que tienen un rango máximo de absorción de 450 nm.

En cuanto a la caracterización del pigmento natural se logró determinar que presentó un pH de 4.10, un contenido en sólidos soluble de 73 indicados en Grados Brix, a causa del proceso de concentración donde se eliminó el contenido de agua libre que retenía el extracto, también se realizó un barrido entre una longitud de onda de 330 y 900 nm obteniendo un máximo de absorción de 449 nm, determinando que son carotenoides del tipo b-caroteno, de igual forma se logró determinar que es muy soluble en solventes como etanol y hexano sin embargo se mostró insoluble en solventes polares como el agua donde mantuvo un comportamiento hidrófobo debido a las propiedades estructurales características del B-caroteno ($C_{40}H_{56}$) que es un carotenoides puramente de hidrocarburo que demuestran mayor solubilidad en solventes apolares.

Se logró realizar la evaluación del pigmento obtenido a partir de la zanahoria (*Daucus carota*) mediante un monitoreo de cuatro semanas, realizando un análisis espectrofotométrico cada semana el mismo que determinó el porcentaje de pigmento retenido frente a la

interacción a los factores establecidos para cada tratamiento. Los valores obtenidos fueron tabulados y analizados por un software estadístico denominado InfoStat. De esta forma se realizó gráficos que nos permitieron comprender y mostrar dicho análisis.

En cuanto a la evaluación de la estabilidad del pigmento obtenido se logró determinar que la interacción entre la temperatura, pH, ambientes de almacenamiento (presencia o ausencia de luz), influyeron en la estabilidad del pigmento, sin embargo podemos establecer que el comportamiento del mismo frente a estos factores fue muy favorable logrando retener el pigmento casi en su totalidad con un 90% aproximadamente durante el tiempo de estudio en esta investigación, donde los tratamientos sometidos a la interacción luz, pH de 6 y 5 a una temperatura de 14 y 68°C mostraron mayor porcentaje de retención de pigmentos con 97.46% y 97.15% respectivamente, en el caso de los tratamientos a los cuales el pigmento estuvo expuesto a la interacción oscuridad, pH 4 a 68°C se obtuvo un menor porcentaje de retención con un valor de 88.91%.

Cabe mencionar que el pH fue un factor muy influyente en cuanto a su estabilidad obtenido menor porcentaje de retención de 93.03% en pH más ácidos, en el caso de la temperatura el pigmento mostro una ligera pérdida de retención a temperaturas más elevadas obteniendo un porcentaje de 94.20% y finalmente la influencia a la exposición tanto en luz como en oscuridad no mostraron diferencias significativas respecto al porcentaje de pigmento retenido con un valor de 94.87 y 95.46 respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

Realizar la evaluación de la estabilidad del pigmento durante al menos 12 semanas de monitoreo, aumentando rangos de temperatura y pH, con el propósito analizar el comportamiento que tiene el mismo durante más tiempo.

Una vez realizada esta investigación podrá servir como pauta para una nueva investigación con el fin de certificar y validar el pigmento generando una alternativa al uso de colorantes artificiales, y así lograr aplicarlo en algún producto de forma segura dentro de la industria alimentaria.

Llevar un control y seguimiento constante durante la fase de experimentación en laboratorio asegurando que el mismo se realice de forma correcta y objetivaba.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Seaman, A. (2016). *Production Guide for Organic Carrots for Processing*. New York: New York State Integrated Pest Management Program, Cornell University.
- Bach, V., Kidmose, U., Kristensen, H., & Edelenbos, M. (2015). *Eating Quality of Carrots (Daucus carota L.) Grown in One Conventional and Three Organic Cropping Systems over Three Years*. Aarslev: Journal of Agricultural and Food Chemistry . doi:10.1021/acs.jafc.5b03161
- Burgos Sierra, J. T., & Calderon Rivera, F. R. (2009). *DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CAROTENOIDES TOTALES EN OCHO ESPECIES DE FRUTAS Y VERDURAS COMERCIALIZADAS EN LA ZONA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR*. San Salvador: Universidad de el Salvador. Facultad de Quimica y Farmacia. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2545/1/16100674.pdf>
- CFR. (2016). *21 CFR Part 70: Color Additives, Part 73: Color Additives Exempt from Certification*. Washington: US Food Drug. Obtenido de <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=70.3>
- Chamorro Requena, H. R. (2017). *EFECTO DE LA PRESIÓN Y TEMPERATURA EN LA EXTRACCIÓN POR CO₂ SUPERCRÍTICO DE CAROTENOIDES DE ZANAHORIA (Daucus carota)*. Huancayo: Universidad Nacional del Centro del Perú. Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Tesis .
- Codex Alimentarius . (1995). *NORMA GENERAL DEL CODEX PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS (Adoptado en 1995. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011)*. Roma: CODEX ALIMENTARIUS.NORMAS INTERNACIONALES DE LOS ALIMENTOS. CODEX STAND 192-1995.
- Córdoba, Z. (Junio de 2014). *OBTENCIÓN DE UN COLORANTE ORGÁNICO PARA LA INDUSTRIA*. Managua: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Facultad de Ciencias e Ingenierías. Departamento de Química. Carrera de Química. Obtenido de <http://repositorio.unan.edu.ni/5408/1/70439.pdf>
- Fahmi Wan Mohamad , W. A., McNaughton , D., Buckow, R., & Augustin, M. A. (2017). *Stability and partitioning of β -carotene in whey protein emulsions during storage*. Ankara: Food & Function. doi:10.1039/C7FO01012E

- FAO/ Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento*. Roma: CODEX ALIMENTARIUS.NORMAS INTERNACIONALES DE LOS ALIMENTOS. Vigésima edición. Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-i4354s.pdf>
- González, R. (Abril de 2013). FACTIBILIDAD TÉCNICA Y ECONÓMICA EN LA FORMULACIÓN DE TINTA PARA IMPRESORAS DE. Guatemala. doi:10.13140/2.1.4432.8006}
- Hurst, W. (2002). *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals*. Boca Raton: Food Science & Technology. doi:10.1201/9781420014679
- Kiokias, S., Proestos, C., & Varzakas, T. (2016). *A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts*. Athens: Nutrition and Food Science. doi:10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue1.03
- Meléndez Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). *Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos*. Caracas: Archivos Latinoamericanos de Nutrición.
- Natarajmurthy , S., Askari, M., Pullabhatla, S., & Dharmesh, S. (2016). *A Novel β -Carotene Associated Carrot (*Daucus carota L.*) Pectic Polysaccharide*. Karnataka: Nutrition. doi:10.1016/j.nut.2016.01.002
- Oplatowska-Stachowiak , M., & Elliot, C. T. (2015). *Food Colours: Existing and Emerging Food Safety Concerns*. Belfast: Food Science and Nutrition. doi:10.1080/10408398.2014.889652
- Ordóñez, I., & Saavedra, R. (2016). *Extracción y uso del colorantes natural de la flor de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa*) como alternativa para la elaboración de salchicha y yogur*. Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas.Carrera de Ingeniería Química. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/23488>
- Ortiz , A., & Mamami, M. (2015). *OBTENCIÓN DEL BETA-CAROTENO A PARTIR DE LA ZANAHORIA Y SU APLICACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTICIA*. La paz: Universidad Mayor de San Andres.Facultad de Tecnología.Carrera de Química Industrial. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/9307>
- Padrón, E. (2009). *Diseños experimentales con aplicación a la agricultura y la ganadería*. México D.F.: Trillas.

- Poveda , F., & Granados, G. (11 de 2016). *Evaluación de la estabilidad de β -carotenos en una papilla de harina de camote biofortificado con dos tiempos y dos temperaturas de cocción*. Francisco Morazán: Universidad de Zamorano.Escuela Agrícola Panamericana. Carrera de Agroindustria Alimentaria. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5766/1/AGI-2016-T021.pdf>
- Rammuni, M., Ariyadasa, T., Nimarshana, P., & Attalage, R. (2018). *Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina**. Sri Lanka: Food Chemistry. doi:10.1016/j.foodchem.2018.10.066
- Rodríguez Amaya, D. (2015). *ANÁLISIS DE CAROTENOIDES*. São Paulo: FAO.CAPITULO 18. ANÁLISIS DE CAROTENOIDES. Obtenido de <http://www.fao.org/3/AH833S20.htm>
- Santacruz, L. (2011). *ANÁLISIS QUÍMICO DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS SILVESTRES COLOMBIANOS*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Schweiggert, R. (2018). *Perspective on the Ongoing Replacement of Artificial and Animal-Based Dyes with Alternative Natural Pigments in Foods and Beverage*. Stuttgart: Journal of Agricultural and Food Chemistry 2018 66 (12), 3074-3081. doi:10.1021/acs.jafc.7b05930
- Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). *Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources*. Ohio: Food Science and Technology. doi:10.1146/annurev-food-030216-025923
- Torres, F. (2015). *EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL PIGMENTO NATURAL OBTENIDO A PARTIR DE MORTIÑO (*Vaccinium myrtillus* L) COMO COLORANTE PARA LA INDUSTRIA DE ALIMENTOS*. Guayaquil, Ecuador.
- Vázquez, B. (Junio de 2014). *Extracción y uso potencial de las antocianinas del bagazo de café (*coffea arábica* sp.) como colorantes en bebidas*. Saltillo: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. División de Ingeniería. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/2010/62959%20V%C1ZQUEZ%20L%D3PEZ,%20BERSAIN%20%20T20213.pdf?sequence=1>
- Wang, Y., Xing, J., & Chen, H. (2017). *Progress in metabolic engineering of β -carotene synthesis*. China: Gong Cheng xue bao , Chinese Journal of Biotechnology.
- Yanchapanta, D. d. (2011). *OBTENCIÓN DE UN COLORANTE NATURAL LA BETALAINA A PARTIR DE LA REMOLACHA (*BETA VULGARIS*) PARA SU APLICACIÓN EN ALIMENTOS Y BEBIDAS, SIN QUE SUS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS*

(SABOR Y OLOR) AFECTEN SU UTILIDAD. Ambato: Universidad Técnica de Ambato.Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera Ingeniería Bioquímica. Obtenido de

<http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1764/1/SBQ17%20Ref.3401.pdf>

Zhou, X., Wang, H., Wang , C., Zhao, C., Peng, Q., Zhang, T., & Zhao, C. (2018). *Stability and in vitro digestibility of beta-carotene in nanoemulsions fabricated with different carrier oils.* Changchun: Food Science & Nutrition. doi:10.1002 / fsn3.862

V. ANEXOS

Anexo 1: Certificado o Acta del Perfil de Investigación



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FACULTAD DE INDUSTRIAS AGROPECUARIAS Y CIENCIAS AMBIENTALES
CARRERA DE INGENIERÍA EN ALIMENTOS

ACTA

DE LA SUSTENTACIÓN DE PREDEFENSA DEL INFORME DE INVESTIGACIÓN DE:

NOMBRE: DANIEL FRANCISCO PINEDA PEÑAFIEL

CÉDULA DE IDENTIDAD: 100408609-4

NIVEL/PARALELO: 0

PERIODO ACADÉMICO: Nov 2020-marzo 2021

TEMA DE INVESTIGACIÓN: "Evaluación de la estabilidad de betacaroteno obtenido a partir de zanahoria (Daucus carota) como colorante natural usado en la industria alimentaria"

Tribunal designado por la dirección de esta Carrera, conformado por:

PRESIDENTE: MSC. Wladimir Marcelo Benavides Gallegos

LECTOR: MSC. Ana Lucía Rodríguez Machado

ASESOR: MSC. Freddy Giovanni Torres Mayanquer

De acuerdo al artículo 21: Una vez entregados los requisitos para la realización de la pre-defensa el Director de Carrera integrará el Tribunal de Pre-defensa del informe de investigación, fijando lugar, fecha y hora para la realización de este acto:

EDIFICIO DE AULAS: Virtual **AULA:** 0

FECHA: lunes 18 de enero del 2021

HORA: 15H00

Obteniendo las siguientes notas:

1) Sustentación de la predefensa: 5,70

2) Trabajo escrito 2,50

Nota final de PRE DEFENSA 8,20

Por lo tanto: **APRUEBA CON OBSERVACIONES** ; debiendo acatar el siguiente artículo:

Art. 24.- De los estudiantes que aprueban el Plan de Investigación con observaciones. - El estudiante tendrá el plazo de 10 días laborables para proceder a corregir su informe de investigación de conformidad a las observaciones y recomendaciones realizadas por los miembros Tribunal de sustentación de la pre-defensa.

Para constancia del presente, firman en la ciudad de Tulcán el lunes 18 de enero del 2021



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
Wladimir Marcelo Benavides Gallegos

MSC. Wladimir Marcelo Benavides Gallegos

PRESIDENTE



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
Freddy Giovanni Torres Mayanquer - 5 002 321 982

MSC. Freddy Giovanni Torres Mayanquer

TUTOR



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
ANA LUCIA RODRIGUEZ MACHADO

MSC. Ana Lucía Rodríguez Machado

LECTOR

Adj.: Observaciones y recomendaciones



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA ESTATAL DEL CARCHI
FOREIGN AND NATIVE LANGUAGE CENTER**

Informe sobre el Abstract de Artículo Científico o Investigación.

Autor: Pineda Peñafiel Daniel Francisco

Fecha de recepción del abstract: 7 de febrero de 2021

Fecha de entrega del informe: 7 de febrero de 2021

El presente informe validará la traducción del idioma español al inglés si alcanza un porcentaje de: 9 – 10 Excelente.

Si la traducción no está dentro de los parámetros de 9 – 10, el autor deberá realizar las observaciones presentadas en el ABSTRACT, para su posterior presentación y aprobación.

Observaciones:

Después de realizar la revisión del presente abstract, éste presenta una apropiada traducción sobre el tema planteado en el idioma Inglés. Según los rubrics de evaluación de la traducción en Inglés, ésta alcanza un valor de 9, por lo cual se valida dicho trabajo.

Atentamente



EDISON BOANERGES
PENAFIEL ARCOS

Ing. Edison Peñafiel Arcos MSc
Coordinador del CIDEN

Anexo 3: Preparación de la Zanahoria



Anexo 4: Rebanado de la Zanahoria



Anexo 5: Zanahoria deshidratada



Anexo 6: Molienda de la zanahoria deshidratada



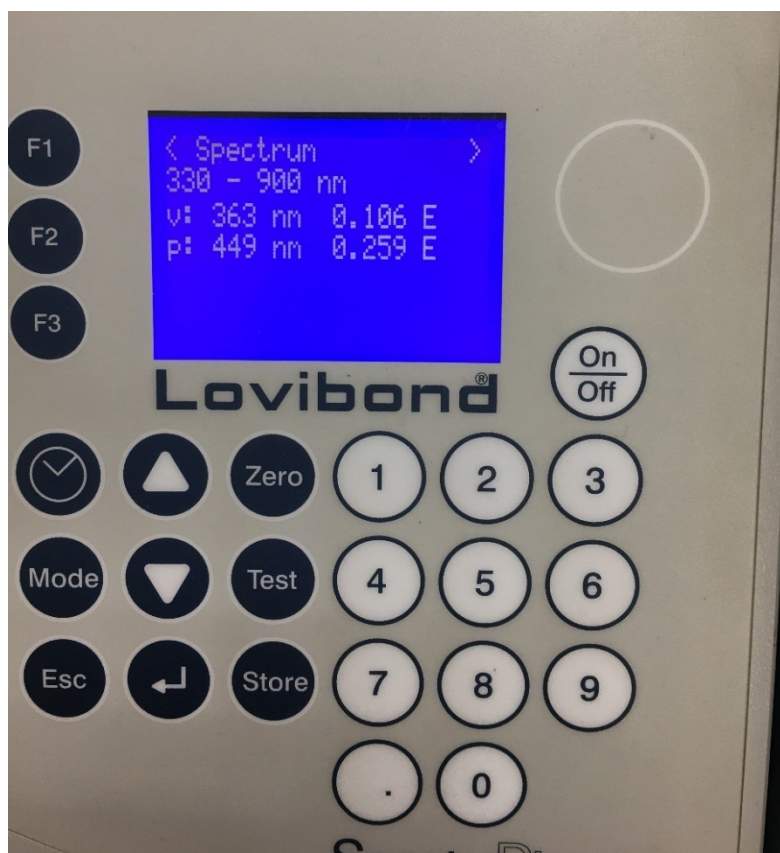
Anexo 7: Extracción de pigmento



Anexo 8: Pigmento obtenido



Anexo 9: Determinación cuantitativa de b-caroteno por espectrofotometría UV-Visible.



Anexo 10: Caracterización Físicoquímica del pigmento obtenido



Anexo 11: Preparación de los tratamientos



Anexo 12; Identificación y preparación de las 54 unidades experimentales.



Anexo 13: Muestras en la estufa 68°C y refrigeración 4°C



Anexo 14: Toma de los datos



Anexo 15: Ficha con datos obtenidos en la investigación

Tratamiento	Repeticiones	Tratamiento	Exposición	pH	T°	Semana	Promedios	ABSORBANCIA	Porcentaje de Ret	Promedios
T1	R1	T1	luz	4	4	S1	0,224	0,225	100	100
T1	R2		luz	4	4	S1		0,224	100	
T1	R3		luz	4	4	S1		0,223	100	
T3	R1	T3	luz	5	4	S1	0,225	0,223	100	100
T3	R2		luz	5	4	S1		0,225	100	
T3	R3		luz	5	4	S1		0,227	100	
T5	R1	T5	luz	6	4	S1	0,22566667	0,227	100	100
T5	R2		luz	6	4	S1		0,225	100	
T5	R3		luz	6	4	S1		0,225	100	
T7	R1	T7	luz	4	14	S1	0,222	0,221	100	100
T7	R2		luz	4	14	S1		0,22	100	
T7	R3		luz	4	14	S1		0,225	100	
T9	R1	T9	luz	5	14	S1	0,22533333	0,23	100	100
T9	R2		luz	5	14	S1		0,221	100	
T9	R3		luz	5	14	S1		0,225	100	
T11	R1	T11	luz	6	14	S1	0,21633333	0,218	100	100
T11	R2		luz	6	14	S1		0,216	100	
T11	R3		luz	6	14	S1		0,215	100	
T13	R1	T13	luz	4	68	S1	0,22	0,221	100	100
T13	R2		luz	4	68	S1		0,217	100	
T13	R3		luz	4	68	S1		0,222	100	
T15	R1	T15	luz	5	68	S1	0,226	0,226	100	100

T15	R2		luz	5	68	S1		0,227	100	
T15	R3		luz	5	68	S1		0,225	100	
T17	R1		luz	6	68	S1		0,218	100	
T17	R2	T17	luz	6	68	S1	0,21966667	0,221	100	100
T17	R3		luz	6	68	S1		0,22	100	
T2	R1		Oscuridad	4	4	S1		0,225	100	
T2	R2	T2	Oscuridad	4	4	S1	0,22566667	0,23	100	100
T2	R3		Oscuridad	4	4	S1		0,222	100	
T4	R1		Oscuridad	5	4	S1		0,226	100	
T4	R2	T4	Oscuridad	5	4	S1	0,22733333	0,225	100	100
T4	R3		Oscuridad	5	4	S1		0,231	100	
T6	R1		Oscuridad	6	4	S1		0,224	100	
T6	R2	T6	Oscuridad	6	4	S1	0,22066667	0,218	100	100
T6	R3		Oscuridad	6	4	S1		0,22	100	
T8	R1		Oscuridad	4	14	S1		0,217	100	
T8	R2	T8	Oscuridad	4	14	S1	0,21733333	0,217	100	100
T8	R3		Oscuridad	4	14	S1		0,218	100	
T10	R1		Oscuridad	5	14	S1		0,218	100	
T10	R2	T10	Oscuridad	5	14	S1	0,21933333	0,22	100	100
T10	R3		Oscuridad	5	14	S1		0,22	100	
T12	R1		Oscuridad	6	14	S1		0,219	100	
T12	R2	T12	Oscuridad	6	14	S1	0,22166667	0,22	100	100
T12	R3		Oscuridad	6	14	S1		0,226	100	
T14	R1		Oscuridad	4	68	S1		0,215	100	
T14	R2	T14	Oscuridad	4	68	S1	0,21766667	0,22	100	100
T14	R3		Oscuridad	4	68	S1		0,218	100	
T16	R1	T16	Oscuridad	5	68	S1	0,22433333	0,229	100	100

T16	R2		Oscuridad	5	68	S1		0,22	100	
T16	R3		Oscuridad	5	68	S1		0,224	100	
T18	R1		Oscuridad	6	68	S1		0,227	100	
T18	R2	T18	Oscuridad	6	68	S1	0,22266667	0,22	100	100
T18	R3		Oscuridad	6	68	S1		0,221	100	
T1	R1		luz	4	4	S2		0,217	96,44444444	
T1	R2	T1	luz	4	4	S2	0,218333333	0,22	98,21428571	97,4721926
T1	R3		luz	4	4	S2		0,218	97,75784753	
T3	R1		luz	5	4	S2		0,216	96,86098666	
T3	R2	T3	luz	5	4	S2	0,21866667	0,22	97,77777778	97,1850213
T3	R3		luz	5	4	S2		0,22	96,91629956	
T5	R1		luz	6	4	S2		0,223	98,23788546	
T5	R2	T5	luz	6	4	S2	0,222333333	0,224	99,55555556	98,5237396
T5	R3		luz	6	4	S2		0,22	97,77777778	
T7	R1		luz	4	14	S2		0,215	98,64253394	
T7	R2	T7	luz	4	14	S2	0,21766667	0,218	99,09090909	98,5037403
T7	R3		luz	4	14	S2		0,22	97,77777778	
T9	R1		luz	5	14	S2		0,227	98,69565217	
T9	R2	T9	luz	5	14	S2	0,222	0,219	99,09502262	98,5228175
T9	R3		luz	5	14	S2		0,22	97,77777778	
T11	R1		luz	6	14	S2		0,21	96,33027523	
T11	R2	T11	luz	6	14	S2	0,21266667	0,215	99,53703704	98,3123599
T11	R3		luz	6	14	S2		0,213	99,06976744	
T13	R1		luz	4	68	S2		0,198	89,59276018	
T13	R2	T13	luz	4	68	S2	0,201	0,2	92,16589862	91,3670004
T13	R3		luz	4	68	S2		0,205	92,34234234	
T15	R1	T15	luz	5	68	S2	0,22166667	0,225	99,55752212	98,0838665

T15	R2		luz	5	68	S2		0,22	96,91629956	
T15	R3		luz	5	68	S2		0,22	97,77777778	
T17	R1		luz	6	68	S2		0,216	99,08256581	
T17	R2	T17	luz	6	68	S2	0,217	0,218	98,64253394	98,7871545
T17	R3		luz	6	68	S2		0,217	98,63636364	
T2	R1		Oscuridad	4	4	S2		0,218	96,88888889	
T2	R2	T2	Oscuridad	4	4	S2	0,221	0,228	99,13043478	97,9223571
T2	R3		Oscuridad	4	4	S2		0,217	97,74774775	
T4	R1		Oscuridad	5	4	S2		0,223	98,67256637	
T4	R2	T4	Oscuridad	5	4	S2	0,22266667	0,22	94,81268012	96,9626146
T4	R3		Oscuridad	5	4	S2		0,225	97,4025974	
T6	R1		Oscuridad	6	4	S2		0,222	99,10714286	
T6	R2	T6	Oscuridad	6	4	S2	0,21733333	0,215	98,62385321	98,4860896
T6	R3		Oscuridad	6	4	S2		0,215	97,72727273	
T8	R1		Oscuridad	4	14	S2		0,215	99,07834101	
T8	R2	T8	Oscuridad	4	14	S2	0,215	0,215	99,07834101	98,9268451
T8	R3		Oscuridad	4	14	S2		0,215	98,62385321	
T10	R1		Oscuridad	5	14	S2		0,215	98,62385321	
T10	R2	T10	Oscuridad	5	14	S2	0,217	0,218	99,09090909	98,9352238
T10	R3		Oscuridad	5	14	S2		0,218	99,09090909	
T12	R1		Oscuridad	6	14	S2		0,218	99,543376	
T12	R2	T12	Oscuridad	6	14	S2	0,21666667	0,217	98,63636364	97,7708277
T12	R3		Oscuridad	6	14	S2		0,215	95,13274336	
T14	R1		Oscuridad	4	68	S2		0,2	93,02325581	
T14	R2	T14	Oscuridad	4	68	S2	0,19533333	0,192	87,27272727	89,7622696
T14	R3		Oscuridad	4	68	S2		0,194	88,99082569	
T16	R1	T16	Oscuridad	5	68	S2	0,22	0,225	98,25327511	98,0649445

T16	R2		Oscuridad	5	68	S2	0,215	97,72727273		
T16	R3		Oscuridad	5	68	S2	0,22	98,21428571		
T18	R1		Oscuridad	6	68	S2	0,223	98,23788546		
T18	R2	T18	Oscuridad	6	68	S2	0,21866667	0,218	99,09090909	98,2046208
T18	R3		Oscuridad	6	68	S2	0,215	97,28506787		
T1	R1		luz	4	4	S3	0,22	97,77777778		
T1	R2	T1	luz	4	4	S3	0,21666667	0,22	98,21428571	96,7208224
T1	R3		luz	4	4	S3	0,21	94,17040359		
T3	R1		luz	5	4	S3	0,215	96,41255605		
T3	R2	T3	luz	5	4	S3	0,212	0,211	93,77777778	94,2337824
T3	R3		luz	5	4	S3	0,21	92,51101322		
T5	R1		luz	6	4	S3	0,216	95,15418502		
T5	R2	T5	luz	6	4	S3	0,21233333	0,211	93,77777778	94,088432
T5	R3		luz	6	4	S3	0,21	93,33333333		
T7	R1		luz	4	14	S3	0,192	86,87782805		
T7	R2	T7	luz	4	14	S3	0,20266667	0,211	95,09090909	91,0266161
T7	R3		luz	4	14	S3	0,205	91,11111111		
T9	R1		luz	5	14	S3	0,224	97,39130435		
T9	R2	T9	luz	5	14	S3	0,21733333	0,213	96,3800905	96,4423168
T9	R3		luz	5	14	S3	0,215	95,55555556		
T11	R1		luz	6	14	S3	0,208	95,41284404		
T11	R2	T11	luz	6	14	S3	0,208	0,21	97,22222222	96,1496733
T11	R3		luz	6	14	S3	0,206	95,81395349		
T13	R1		luz	4	68	S3	0,191	86,42533937		
T13	R2	T13	luz	4	68	S3	0,194	0,19	87,55760369	88,1744945
T13	R3		luz	4	68	S3	0,201	90,54054054		
T15	R1	T15	luz	5	68	S3	0,21733333	0,22	97,34513274	96,1551532

T15	R2		luz	5	68	S3		0,217	95,56477137	
T15	R3		luz	5	68	S3		0,215	95,55555556	
T17	R1		luz	6	68	S3		0,212	97,24770642	
T17	R2	T17	luz	6	68	S3	0,21233333	0,215	97,28506787	96,6624399
T17	R3		luz	6	68	S3		0,21	95,45454545	
T2	R1		Oscuridad	4	4	S3		0,212	94,22222222	
T2	R2	T2	Oscuridad	4	4	S3	0,214	0,215	93,47826087	94,84911
T2	R3		Oscuridad	4	4	S3		0,215	96,84684685	
T4	R1		Oscuridad	5	4	S3		0,215	95,13274336	
T4	R2	T4	Oscuridad	5	4	S3	0,21433333	0,212	94,22222222	94,287153
T4	R3		Oscuridad	5	4	S3		0,216	93,50649351	
T6	R1		Oscuridad	6	4	S3		0,208	92,85714286	
T6	R2	T6	Oscuridad	6	4	S3	0,207	0,208	95,87155963	93,9701736
T6	R3		Oscuridad	6	4	S3		0,205	93,18181818	
T8	R1		Oscuridad	4	14	S3		0,201	92,62672811	
T8	R2	T8	Oscuridad	4	14	S3	0,201	0,201	92,62672811	92,485097
T8	R3		Oscuridad	4	14	S3		0,201	92,20183486	
T10	R1		Oscuridad	5	14	S3		0,21	96,33027523	
T10	R2	T10	Oscuridad	5	14	S3	0,20866667	0,208	94,54545455	95,1403948
T10	R3		Oscuridad	5	14	S3		0,208	94,54545455	
T12	R1		Oscuridad	6	14	S3		0,216	98,63013699	
T12	R2	T12	Oscuridad	6	14	S3	0,212	0,215	97,72727273	95,6884581
T12	R3		Oscuridad	6	14	S3		0,205	90,7079646	
T14	R1		Oscuridad	4	68	S3		0,184	85,58139535	
T14	R2	T14	Oscuridad	4	68	S3	0,18533333	0,184	83,63636364	85,152097
T14	R3		Oscuridad	4	68	S3		0,188	86,23853211	
T16	R1	T16	Oscuridad	5	68	S3	0,20766667	0,205	89,51965066	92,6050351

T16	R2		Oscuridad	5	68	S3		0,208	94,54545455	
T16	R3		Oscuridad	5	68	S3		0,21	93,75	
T18	R1		Oscuridad	6	68	S3		0,205	90,30837004	
T18	R2	T18	Oscuridad	6	68	S3	0,20733333	0,207	94,09090909	93,1406345
T18	R3		Oscuridad	6	68	S3		0,21	95,02262443	
T1	R1		luz	4	4	S4		0,206	91,55555556	
T1	R2	T1	luz	4	4	S4	0,19833333	0,186	83,03571429	88,5408867
T1	R3		luz	4	4	S4		0,203	91,03139013	
T3	R1		luz	5	4	S4		0,208	93,2735426	
T3	R2	T3	luz	5	4	S4	0,20733333	0,205	91,11111111	92,1517128
T3	R3		luz	5	4	S4		0,209	92,07048458	
T5	R1		luz	6	4	S4		0,205	90,30837004	
T5	R2	T5	luz	6	4	S4	0,20533333	0,206	91,55555556	90,9916789
T5	R3		luz	6	4	S4		0,205	91,11111111	
T7	R1		luz	4	14	S4		0,187	84,61538462	
T7	R2	T7	luz	4	14	S4	0,18066667	0,164	74,54545455	81,3499094
T7	R3		luz	4	14	S4		0,191	84,88888889	
T9	R1		luz	5	14	S4		0,213	92,60869565	
T9	R2	T9	luz	5	14	S4	0,211	0,21	95,02252443	93,6548511
T9	R3		luz	5	14	S4		0,21	93,33333333	
T11	R1		luz	6	14	S4		0,199	91,28440367	
T11	R2	T11	luz	6	14	S4	0,19933333	0,201	93,05555556	92,1443275
T11	R3		luz	6	14	S4		0,198	92,09302326	
T13	R1		luz	4	68	S4		0,184	83,25791855	
T13	R2	T13	luz	4	68	S4	0,18666667	0,186	85,71428571	84,8525966
T13	R3		luz	4	68	S4		0,19	85,58558559	
T15	R1	T15	luz	5	68	S4	0,208	0,205	90,7079646	92,0359556

T15	R2		luz	5	68	S4		0,21	92,51101322	
T15	R3		luz	5	68	S4		0,209	92,88888889	
T17	R1		luz	6	68	S4		0,207	94,95412844	
T17	R2	T17	luz	6	68	S4	0,20733333	0,21	95,02262443	94,3861904
T17	R3		luz	6	68	S4		0,205	93,18181818	
T2	R1		Oscuridad	4	4	S4		0,201	89,33333333	
T2	R2	T2	Oscuridad	4	4	S4	0,20433333	0,205	89,13043478	90,5690038
T2	R3		Oscuridad	4	4	S4		0,207	93,24324324	
T4	R1		Oscuridad	5	4	S4		0,216	95,57522124	
T4	R2	T4	Oscuridad	5	4	S4	0,212	0,21	93,33333333	93,2725485
T4	R3		Oscuridad	5	4	S4		0,21	90,90909091	
T6	R1		Oscuridad	6	4	S4		0,205	91,51785714	
T6	R2	T6	Oscuridad	6	4	S4	0,20266667	0,203	93,11926606	91,848738
T6	R3		Oscuridad	6	4	S4		0,2	90,9090909	
T8	R1		Oscuridad	4	14	S4		0,183	84,33179724	
T8	R2	T8	Oscuridad	4	14	S4	0,18333333	0,184	84,79262673	84,3564594
T8	R3		Oscuridad	4	14	S4		0,183	83,94495413	
T10	R1		Oscuridad	5	14	S4		0,2	91,74311927	
T10	R2	T10	Oscuridad	5	14	S4	0,20333333	0,207	94,09090909	92,7022519
T10	R3		Oscuridad	5	14	S4		0,203	92,27272727	
T12	R1		Oscuridad	6	14	S4		0,178	81,27853881	
T12	R2	T12	Oscuridad	6	14	S4	0,19266667	0,202	91,91919192	86,9361167
T12	R3		Oscuridad	6	14	S4		0,198	87,61061947	
T14	R1		Oscuridad	4	68	S4		0,175	81,39534884	
T14	R2	T14	Oscuridad	4	68	S4	0,17566667	0,177	80,45454545	80,7083746
T14	R3		Oscuridad	4	68	S4		0,175	80,27522936	
T16	R1	T16	Oscuridad	5	68	S4	0,20366667	0,203	88,64628821	90,8177021

T16	R2		Oscuridad	5	68	S4		0,205	93,18181818	
T16	R3		Oscuridad	5	68	S4		0,203	90,625	
T18	R1		Oscuridad	6	68	S4		0,202	88,98678414	
T18	R2	T18	Oscuridad	6	68	S4	0,20433333	0,206	93,63636364	91,7944429
T18	R3		Oscuridad	6	68	S4		0,205	92,760181	