



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Extracción verde de carotenoides de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch) usando aceite vegetal para su adición como colorante natural en una matriz alimentaria

Sandra Milena Ballesta Santana

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2022

Extracción verde de carotenoides de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch) usando aceite vegetal para su adición como colorante natural en una matriz alimentaria

Sandra Milena Ballesta Santana

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director (a):

Ph.D., Ing. Carlos Alberto Fuenmayor Bobadilla

Codirector (a):

Ph.D., Ing. Amanda Consuelo Díaz

Línea de Investigación:

Procesamiento de Alimentos

Grupo de Investigación:

Bioalimentos - Aseguramiento de la Calidad de Alimentos y Desarrollo de nuevos
Productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2022

*A mis papás, a mis hermanos y a mi mamita
Emelina en el cielo.*

Agradecimientos

A mis papás, mis hermanos por su amor y su apoyo incondicional, porque siempre tuvieron una voz de aliento para impulsarme y levantarme.

A Memo por su paciencia, sus ideas, por escucharme, por su amor incondicional y por creer en mí siempre.

Al profesor Carlos Fuenmayor, mi director, por su guía, su excelencia, su conocimiento y experiencia que fueron de gran aporte para el desarrollo de mi trabajo.

A la profesora Consuelo Díaz, mi codirectora, por su atención al detalle y consejos, que contribuyeron a la construcción de cada etapa de este trabajo.

A Cristina Lizarazo por su ayuda, su guía, sus aportes, su paciencia y su voz de aliento durante el desarrollo experimental.

Al personal del ICTA por su amabilidad y servicio.

A la Facultad de Ciencias Agrarias y al Centro de Investigación y Extensión Rural (CIER) de la Universidad Nacional por su apoyo económico.

Resumen

La apariencia en los alimentos es un atributo importante y decisivo en el consumidor, por lo cual la industria emplea los colorantes a fin de otorgar características atractivas, durables y homogéneas. Actualmente en el mercado predomina el uso de colorantes de origen sintético debido a su bajo costo, durabilidad y firmeza en su pigmentación, sin embargo, diversos estudios han mostrado el impacto negativo que tiene el consumo de estos al estar relacionados con efectos tóxicos, alergénicos y hasta cancerígenos. En este sentido, se han estudiado los colorantes naturales buscando las ventajas de los colorantes artificiales y que adicionalmente tengan un aporte a la salud. Los carotenoides son pigmentos liposolubles, naturales, de coloración amarillo-naranja presentes en matrices alimentarias como la ahuyama, reconocidos por su poder antioxidante y porque algunos tienen actividad provitamina A. En este trabajo se estudiaron diferentes tecnologías para extraer los carotenoides de la ahuyama, una hortaliza cultivada en Colombia y de importante aporte nutricional. Se realizó una caracterización fisicoquímica de la ahuyama a fin de evaluar su estado de madurez comercial, teniendo en cuenta que esta tiene un efecto importante sobre el contenido de carotenoides totales (CCT). Posteriormente, se realizó un proceso de adecuación que consistió en una deshidratación por convección forzada y posterior molienda, esto con el fin facilitar el acceso a los carotenoides de la matriz. Con la harina de ahuyama obtenida y empleando aceite de girasol como solvente, se estudiaron técnicas de extracción convencional con agitación continua (CNV) y asistida con ultrasonido (US), en las que se evaluó el CCT, color y estabilidad oxidativa. Se encontró que los mejores resultados en la metodología de extracción tanto para el CCT (1244 mg β -caroteno_{0eq}/kg extracto) como para el color medido en el espacio CIELAB se obtuvieron con CNV, en un tiempo de extracción de 24 horas y una relación matriz-mezcla del 60%. Este extracto fue evaluado en almacenamiento durante 28 días, tiempo en el cual se evidenció que la disminución máxima del CCT fue del 18%, que el índice de peróxidos (IP) se mantuvo inferior a 10 mEq de oxígeno activo/kg y que el Índice de p-anisidina (IpA) no mostró variación significativa. Se realizó la inclusión del extracto de carotenoides en un yogurt

X Extracción verde de carotenoides de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch) usando aceite vegetal para su adición como colorante natural en una matriz alimentaria

evaluando su color durante 28 días, evidenciando que se logró una coloración muy similar a la de un yogurt con adición de colorante artificial, con un aporte nutricional añadido.

Palabras clave: Carotenoides, ahuyama, extracción verde, ultrasonido, estabilidad

Abstract

Green extraction of carotenoids from pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch) using vegetable oil for its addition as a natural colorant in a food matrix

Appearance in food is an important and decisive attribute for the consumer, which is why the industry uses colorants to provide attractive, durable and homogeneous characteristics. Currently, the use of dyes of synthetic origin predominates in the market due to their low cost, durability and firmness in their pigmentation, however, various studies have shown the negative impact of its consumption as these are related to toxic, allergenic and even carcinogenic. In this sense, natural colorants have been studied looking for the faculties of artificial colorants and that these additionally have a contribution to health. Carotenoids are fat-soluble, natural, yellow-orange pigments present in food matrices such as squash, recognized for their antioxidant power and because some have provitamin A activity. In this work, different technologies were studied to extract carotenoids from squash, a vegetable cultivated in Colombia and of important nutritional contribution. A physicochemical characterization of the squash was carried out in order to evaluate its state of commercial maturity, taking into account that this is related to the content of total carotenoids (CCT). Subsequently, an adaptation process was carried out that consisted of dehydration by forced convection and subsequent grinding, in order to facilitate access to the carotenoids of the matrix. With the pumpkin flour obtained and using sunflower oil as solvent, conventional extraction techniques with continuous agitation (CNV) and assisted with ultrasound (US) were studied, in which the content of total carotenoids (CCT), color and oxidative stability were evaluated. It was found that the best results in the extraction methodology for both CCT (1244 mg β -caroteno_{eq}/kg extract) and for the color measured

in the CIELAB space were obtained with CNV, in an extraction time of 24 hours and a ratio 60% matrix-mix. This extract was evaluated in storage for 28 days, during which time it was shown that the maximum decrease in CCT was 18%, that the peroxide index (IP) remained below 10 mEq of active oxygen/kg and that the Index of p-anisidine (IpA) did not show significant variation. The inclusion of the carotenoid extract in a yogurt was carried out, evaluating its color for 28 days, showing that a coloration very similar to that of a yogurt with the addition of artificial coloring was achieved, with an added nutritional contribution.

Keywords: Carotenoids, pumpkin, squash, green extraction, ultrasound, stability

Contenido

1. Marco teórico.....	7
1.1 Uso de pigmentos como aditivos en alimentos: Generalidades	7
1.2 Carotenoides como colorantes alimentarios	9
1.3 Estabilidad de carotenoides.....	16
1.4 Ahuyama como fuente de carotenoides.....	18
1.5 Técnicas de extracción de carotenoides	21
1.6 Aceites como solventes verdes.....	24
1.7 Metodologías instrumentales de determinación de color y espacios de color ...	26
1.8 Antecedentes de extracción de carotenoides usando aceites vegetales.....	29
2. Efectos del proceso de adecuación (secado con aire por convección y molienda) en el contenido de carotenoides totales de la ahuyama	32
2.1 Introducción	32
2.2 Materiales y métodos.....	33
2.2.1 Materiales.....	33
2.2.2 Caracterización fisicoquímica de la pulpa de ahuyama.....	33
- Determinación de pH	33
- Determinación de sólidos solubles	33
- Determinación de acidez.....	34
- Determinación de humedad	34
- Determinación de actividad de agua	35
- Determinación del color de ahuyama	35
2.2.3 Adecuación del material vegetal	35
- Curva de secado.....	36
- Cinética de degradación de CCT	36
- Molienda y caracterización granulométrica	37
2.2.4 Determinación de CCT por espectrofotometría UV-Vis.....	37
2.2.5 Determinación del color de ahuyama seca y seca molida.....	37
2.2.6 Análisis estadístico	38
2.3 Resultados y discusión	38
2.3.1 Caracterización fisicoquímica	38
2.3.2 Cinética de secado	39
2.3.3 Evaluación del color.....	49

2.4 Conclusiones parciales.....	51
3. Extracción de carotenoides	53
3.1 Introducción.....	53
3.2 Materiales y métodos	54
3.2.1 Materiales	54
3.2.2 Extracción convencional de carotenoides (CNV).....	55
3.2.3 Extracción de carotenoides asistida con ultrasonido (US)	56
3.2.4 Extracción sucesiva de carotenoides.....	58
3.2.5 Análisis cuantitativo de carotenoides mediante HPLC-DAD	61
3.2.6 Determinación de contenido de carotenoides totales por espectrofotometría UV-Vis	62
3.2.7 Determinación del color de los extractos oleosos	63
3.2.8 Determinación de peróxidos en aceite y extractos oleosos (IP).....	63
3.2.9 Determinación de índice de p-anisidina en aceite y extractos oleosos (IpA)..	63
3.2.10 Análisis estadístico.....	64
3.3 Resultados y discusión.....	64
3.3.1 Extracción de carotenoides convencionalmente.....	64
3.3.2 Extracción asistida con ultrasonido.....	69
3.3.3 Identificación y cuantificación de carotenoides	71
3.3.4 Extracción sucesiva.....	75
3.4 Conclusiones parciales.....	79
4. Estabilidad de extractos oleosos fuente de carotenoides	81
4.1 Introducción.....	81
4.2 Materiales y métodos	82
4.2.1 Estudio de estabilidad de extractos oleosos en almacenamiento	82
- Determinación de contenido de carotenoides totales por espectrofotometría UV- Vis.....	82
- Determinación del color de los extractos oleosos	82
- Determinación de peróxidos en aceite y extractos oleosos	82
- Determinación de índice de p-anisidina en aceite y extractos oleosos	82
- Análisis Termogravimétrico	82
4.2.2 Inclusión de colorante en yogurt.....	83
- Determinación del color en el yogurt	84
4.3 Resultados y discusión.....	84
4.3.1 Análisis de estabilidad en almacenamiento de extractos	84
4.3.2 Análisis termogravimétrico	88
4.3.3 Evaluación del color en yogurt adicionado con colorante oleoso enriquecido con carotenoides.....	90
4.4 Conclusiones parciales.....	92
5. Conclusiones y recomendaciones	95
5.1 Conclusiones.....	95
5.2 Recomendaciones.....	96

Lista de figuras

Figura 1-1 Estructura de los carotenoides. (a): Xantófilas (b): Carotenos.....	10
Figura 1-2 Estructura del licopeno.....	13
Figura 1-3: Modelo de CIEL*a*b*	27
Figura 2-1: Ahuyama <i>Cucurbita moschata</i> Duch variedad mariquiteña	33
Figura 2-2: Ahuyama <i>Cucurbita moschata</i> Duch variedad mariquiteña fresca cortada en láminas de 1 mm	35
Figura 2-3: Ahuyama <i>Cucurbita moschata</i> Duch variedad mariquiteña en etapa de secado por convección a 58°C/7 h (a) y ahuyama resultante del secado (b).....	36
Figura 2-4: Isotherma de desorción para el secado de ahuyama a 58°C durante 7 horas	41
Figura 2-5: Modelo de Page aplicado a la cinética de secado de ahuyama a 58°C/7 horas. Los círculos azules corresponden a los valores experimentales y los rombos negros a los valores modelados.....	42
Figura 2-6: Cinética de degradación de carotenoides durante el proceso de secado de ahuyama a 58°C/7 horas	45
Figura 2-7: Cinética de degradación de carotenoides durante el secado de ahuyama a 58°C/7 horas. Los puntos negros corresponden a los valores experimentales y la recta azul a los valores modelados.	46
Figura 2-8: Distribución de harina de ahuyama por tamaño de partícula.....	48
Figura 2-9: Comparación de color en ahuyama fresca, seca y seca molida	49
Figura 3-1: Diagrama de proceso de extracción convencional	56
Figura 3-2: Diagrama de proceso de extracción asistida con ultrasonido	58
Figura 3-3: Diagrama de proceso de extracción convencional (por agitación continua)..	60
Figura 3-4: Cinética del contenido de carotenoides durante 72 horas a diferentes relaciones matriz/mezcla de extracción: (40% p/p, 50% p/p, 60% p/p).....	68
Figura 3-5: Cinética de la eficiencia de extracción de carotenoides totales durante 72 horas a diferentes relaciones matriz/mezcla de extracción: (40% p/p, 50% p/p, 60% p/p)	68
Figura 3-6: Efecto de las condiciones de operación (tiempo y amplitud) en CCT (a) y tono (b).....	71
Figura 3-7: Cromatograma de carotenoides presentes en extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama obtenidos por diferentes métodos: US (A) y CNV (B).....	73
Figura 4-1: Yogures sin colorante (B), con colorante natural (N) y artificial (A).....	84
Figura 4-2: Cinética de extractos oleosos en almacenamiento.....	87

Figura 4-3: Curvas termogravimétricas para aceite de girasol (ACEITE), extracto de carotenoides obtenido mediante extracción convencional (CNV) y extracto de carotenoides obtenido de forma asistida con ultrasonido (US)	88
Figura 4-4 Variación del color en yogurt con y sin colorantes	92

Lista de tablas

Tabla 1-1: Fuentes de carotenoides	14
Tabla 1-2: Composición de la ahuyama en 100 g.....	19
Tabla 1-3: Composición en ácidos grasos de diferentes tipos de aceite de girasol.....	26
Tabla 1-4: Estudios de extracción de carotenoides empleando aceites vegetales como solvente	30
Tabla 2-1: Caracterización fisicoquímica de pulpa de ahuyama <i>Cucurbita moschata</i> Duch variedad mariquiteña empleada en el estudio.	38
Tabla 2-2: Variación de la humedad y actividad de agua en el secado por convección de aire forzado de ahuyama en láminas de 1 mm de espesor a 58°C durante 7 horas	40
Tabla 2-3: Parámetros del modelo de Page calculados para el secado de ahuyama a 58°C durante 7 horas.....	42
Tabla 2-4: Contenido de carotenoides totales de ahuyama durante el proceso de secado a 58°C/7 horas.....	44
Tabla 2-5: Porcentajes de retención en tamizaje de harina de ahuyama	47
Tabla 2-6: Parámetros de color CIEL *a*b* de la ahuyama fresca, seca y seca molida...	49
Tabla 2-7: Diferencias de color entre la ahuyama fresca, seca y molida.....	51
Tabla 3-1: Contenido de carotenoides totales en extractos obtenidos convencionalmente	66
Tabla 3-2: Contenido de carotenoides totales y color en extractos obtenidos por extracción asistida con ultrasonido	69
Tabla 3-3: Contenido de carotenoides en extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama obtenidos por diferentes métodos de extracción.....	73
Tabla 3-4: Contenido de carotenoides totales y color de extractos obtenidos por extracción sucesiva.....	76
Tabla 4-1: Efecto del calentamiento en muestras oleosas	89
Tabla 4-2: Coordenadas de color para yogurt con y sin adición de colorantes	91

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI	Definición
		$\frac{\mu\text{g } \beta - \text{caroteno}_{eq}}{\text{g ahuyama}}$	Tabla 2-1
<i>CCT</i>	Contenido de carotenoides totales	$\frac{\text{mg } \beta - \text{caroteno}_{eq}}{\text{kg extracto oleoso}}$	Tabla 3-1
<i>IP</i>	Índice de peróxidos	$\text{m}_{eq}\text{O}_2/\text{kg}$	Ec. 3-2
<i>IpA</i>	Índice de p-anisidina	Adimensional	Ec. 3-3

Subíndices

Subíndice	Término
eq	Equivalente

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>CNV</i>	Extracto fuente de carotenoides obtenido por agitación magnética
<i>HPLC</i>	Cromatografía líquida de alta eficacia
<i>L</i>	Luminosidad
<i>US</i>	Extracto fuente de carotenoides obtenido de forma asistida por ultrasonido
ΔE	Diferencia de color

Introducción

El color de un alimento juega un papel importante al momento de escoger entre un producto u otro, ya que corresponde a la primera impresión que recibe y evalúa el consumidor y que inmediatamente enlaza con su sabor y calidad. Por esta razón y por la necesidad de balancear la pérdida de color durante el procesamiento y almacenamiento, se emplean colorantes en la industria de alimentos (Annisa et al., 2018). Estos pueden ser naturales o sintéticos según su origen. Los colorantes naturales son obtenidos de fuentes vegetales y los colorantes sintéticos son derivados de síntesis orgánica o inorgánica, y a pesar de que estos tienen interesantes ventajas como menor costo y colores más intensos y uniformes, se ha identificado que su uso debería ser limitado debido a los efectos hiperalérgicos, carcinogénicos y toxicológicos que tienen sobre la salud (Tuli et al., 2015). Debido a estas problemáticas se han considerado los colorantes naturales como alternativa a los colorantes artificiales tradicionalmente utilizados en la industria alimentaria ya que estos se destacan por sus diversos beneficios a la salud y porque varios de ellos cuentan con compuestos bioactivos que brindan un valor agregado adicional como antioxidantes, útiles también para extender el tiempo de vida útil de los alimentos; sin embargo, estos compuestos también tienen sus desventajas, como lo son su costo e inestabilidad como aditivos en los alimentos, marcados por factores externos como el pH, temperatura, luz, humedad y en general condiciones de almacenamiento. Al tener que escoger entre los colorantes artificiales y naturales se expone un gran reto enmarcado por las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

Dentro de los colorantes naturales, se encuentran los carotenoides que son compuestos pigmentarios de fuentes vegetales que brindan coloraciones desde el amarillo hasta el naranja-rojo; están asociados con beneficios para la salud como la reducción en el riesgo de enfermedades degenerativas, cataratas, enfermedades cardiovasculares y ciertos cánceres (Song, Wang, et al., 2018). Estos pigmentos se encuentran presentes en frutas y vegetales como la papaya, zanahoria, melón, tomate y ahuyama, entre muchos otros. La ahuyama, particularmente rica en estos compuestos, hace parte del género *Cucurbita* y

hace parte fundamental de la alimentación básica en muchas regiones de América, Asia y Europa, evidenciando esta importancia en el aumento del área sembrada (Vallejo y Estrada, 2004). En Colombia desde el año 2013 hasta el año 2017 se duplicó el área cosechada, obteniendo una producción de 124000 Ton en 10479 Ha (Agronet, 2018).

Song, Yang, et al. (2018) reportaron que la ahuyama contiene en su pulpa grandes cantidades de carotenoides, principalmente β y α -caroteno, luteína, β -criptoxantina y zeaxantina. El β -caroteno y el α -caroteno son precursores de la provitamina A y, como la luteína, son compuestos con propiedades antioxidantes. Existe evidencia epidemiológica de que el aumento en el consumo de carotenos, luteína y zeaxantina, disminuye el riesgo de enfermedades oculares como la degeneración macular (Zaccari et al., 2017). De acuerdo con los resultados que arroja la Encuesta Nacional de Situación Nutricional (ENSIN) de 2015 y según la OMS, Colombia se encuentra en un alto riesgo de deficiencia de vitamina A. En particular, la primera infancia es el segmento de la población más vulnerable; el 27,6% de la población entre los 12 y los 23 meses y una cuarta parte de los niños de 1 a 4 años de edad presentan deficiencia de vitamina A (Minsalud, 2015). Desafortunadamente, a pesar de la necesidad de los compuestos bioactivos de la ahuyama con fines nutricionales y de salud, según el Informe de pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia, las frutas y hortalizas representan el 62% de pérdidas, donde 1,8 millones de toneladas se desperdician en la etapa de postcosecha (Departamento Nacional de Planeación, 2016), lo que evidencia la pérdida de productos con alto potencial para el cuidado de la salud.

Los carotenoides se extraen de los cloroplastos de las células mediante diferentes técnicas, siendo la principal de ellas la extracción con solventes tipo Soxhlet. En esta técnica, las etapas de extracción y destilación toman varias horas, incluso días, y se llevan a cabo frecuentemente mediante calentamiento prolongado y agitación en solvente en ebullición, seguido de un calentamiento prolongado para eliminar el solvente. El procedimiento convencional de extracción con solvente representa no solo el 80% del tiempo total de procesamiento, sino también el 90% de la energía requerida y más del 99% del solvente utilizado para todo el procedimiento de análisis (Chemat et al., 2015). Adicionalmente, este tipo de extracción emplea solventes que generan riesgos ambientales (aire y agua), para la salud (toxicidad crónica y aguda e irritación) y riesgos de seguridad (descomposición, explosión) (Saini y Keum, 2018). Siendo esta la situación actual, se han hecho esfuerzos por desarrollar nuevas técnicas de extracción que reduzcan

el impacto ambiental, los tiempos de proceso y el uso de solventes derivados del petróleo, por lo que se han estudiado técnicas no convencionales como la extracción con fluidos supercríticos y subcríticos, extracción asistida por pulsos eléctricos, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonido entre otras, obteniendo resultados favorables, con menores tiempos de extracción, menor uso energético y de agua, altos rendimientos, mejora de la extracción de componentes nutricionales termosensibles, bajas temperaturas de proceso, bajo consumo de energía y obtención de productos de alta calidad al no emplear solventes (Baiano y del Nobile, 2016). Algunas de estas técnicas alternativas de extracción de carotenoides siguen empleando solventes orgánicos apolares con algún grado de toxicidad y adicionalmente su eventual escalamiento comercial puede conllevar algunas dificultades técnicas o representar altos costos. Por este motivo, resulta de interés explorar el uso de solventes verdes, o más sostenibles en términos de su impacto ambiental, toxicidad y biodegradabilidad.

Con base en lo expuesto anteriormente, este trabajo se planteó a fin de responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuáles son las mejores condiciones para extraer compuestos colorantes mediante metodologías verdes convencionales y no convencionales (en particular extracción asistida por ultrasonido) a partir de la ahuyama para ser usados como colorantes naturales en la industria agroalimentaria?
2. ¿Cuál es el comportamiento del colorante extraído a dichas condiciones en términos de la estabilidad del color al ser aplicado en un producto lácteo?

Y para desarrollarlas, se planteó como objetivo evaluar la efectividad de diferentes estrategias de extracción de pigmentos carotenoides a partir de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch), empleando aceite vegetal como solvente verde, para su uso como colorante natural aplicable en alimentos.

Este trabajo de tesis está compuesto por cuatro capítulos. En el primer capítulo se presenta el marco teórico con los conceptos clave de este trabajo, así como el estado del arte en el cual se muestran algunos trabajos realizados previamente con relación a las técnicas de extracción de carotenoides empleadas en este documento. En el segundo capítulo se trata el proceso de adecuación realizado a la ahuyama previo a la extracción de carotenoides, los materiales y métodos empleados y el efecto del proceso de adecuación sobre el

contenido de carotenoides y color. En el tercer capítulo se presentan los materiales y la metodología empleada para la extracción de carotenoides mediante agitación magnética y extracción asistida con ultrasonido, evaluando el contenido de carotenoides, eficiencia de extracción y color. También se incluye un breve estudio de extracciones sucesivas de carotenoides a través de las técnicas anteriormente mencionadas. En el cuarto capítulo se presentan los materiales, métodos y resultados de un breve estudio de estabilidad oxidativa del extracto con mayor contenido de carotenoides almacenado a dos temperaturas, así como también se presenta la evaluación del color al adicionar el extracto fuente de carotenoides a una matriz láctea y almacenarla durante 28 días. Finalmente, se presentan las conclusiones generales del trabajo de investigación.

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al apoyo financiero del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación mediante el proyecto "*Estudio espectroscópico y perfil de compuestos carotenoides de matrices alimentarias con alto potencial agroindustrial para la extracción y microencapsulación de colorantes amarillo-naranja*" y a los recursos del patrimonio autónomo Fondo nacional de financiamiento para la ciencia, la tecnología y la innovación Francisco José de Caldas.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la efectividad de diferentes estrategias de extracción de pigmentos carotenoides a partir de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch), empleando aceite vegetal como solvente verde, para su uso como colorante natural aplicable en alimentos.

Objetivos específicos

- Identificar los efectos del proceso de adecuación (reducción de tamaño y secado con aire por convección) en el contenido de carotenoides de la ahuyama.
- Evaluar el rendimiento de extracción de carotenoides y el color de los extractos obtenidos a partir de ahuyama y aceite de girasol como solvente, empleando metodologías convencionales y no convencionales (extracción asistida por ultrasonido).
- Evaluar la estabilidad del extracto obtenido a las mejores condiciones de extracción, y del color de un producto lácteo pigmentado con dicho extracto.

1. Marco teórico

1.1 Uso de pigmentos como aditivos en alimentos: Generalidades

De acuerdo con The Food and Drug Administration, los aditivos corresponden a cualquier sustancia cuyo uso pretenda afectar las características de cualquier alimento, empleándose con diferentes fines como mantener o mejorar la seguridad, frescura y valor nutricional y mejorar el sabor, la textura y apariencia de los productos (FDA, 2010). Dentro de la clasificación de los aditivos alimentarios se encuentran los conservantes, aditivos nutricionales, colorantes, saborizantes, agentes texturizantes y agentes misceláneos (Carocho et al., 2014) empleados según la propiedad que se desee mantener, destacar o mejorar en el alimento. Sin embargo, en los últimos años la percepción de los consumidores frente a los aditivos no ha sido positiva, en especial desde los años 80 cuando algunos aditivos se empezaron a considerar peligrosos para su uso en alimentos, razón por la que se fueron eliminando varios de ellos. Si bien con el tiempo y con ayuda de los diferentes estudios científicos y generación de aditivos naturales el punto de vista del público ha mejorado, aún persiste cierta desconfianza, pues el consumidor en general busca un alimento sin aditivos, y al no estar disponibles, el mismo consumidor elegirá, si es posible, un alimento que contenga aditivos naturales en lugar de los aditivos sintéticos (Carocho et al., 2014). A esto se suma la reciente tendencia “Clean label” o “Etiqueta limpia”, que va orientada a lo que el consumidor desea ver en el rotulado de un producto, buscando que este sea claro de entender, que el alimento sea libre de aditivos artificiales, con ingredientes reconocibles y que sean mínimamente procesados (Grant y Parveen, 2017).

Los colorantes por su parte, tienen como fin resaltar el color en un producto, lo que también brinda un indicio del estado de madurez, calidad y frescura del mismo. En la actualidad se reconocen dos tipos de colorantes o pigmentos según su origen: naturales y artificiales.

Los colorantes naturales se extraen de minerales, plantas o fuentes animales, mientras que los colorantes artificiales son aquellos de origen mineral que han sido transformados con procesos químicos (Zalbidea, 2017). Los colorantes artificiales o sintéticos son los más empleados en la actualidad debido a su bajo costo de producción, alta resistencia y estabilidad química (Sigurdson et al., 2017), sin embargo, diferentes estudios han reportado efectos adversos para la salud, entre estos, reacciones alérgicas, intolerancia e hiperactividad (Gerardi et al., 2015). Un ejemplo bastante mencionado es la tartrazina, colorante empleado para dar tonalidades amarillas-naranjas. Este pigmento ha sido relacionado en diferentes publicaciones con efectos nocivos para la salud al demostrar que actúa como activador de los receptores de estrógeno, aumentando el riesgo de cirrosis biliar primaria en mujeres posmenopáusicas; también se concluyó que tiene efectos tóxicos por su capacidad de dañar linfocitos y unirse directamente al ADN; en otros informes se reportó su capacidad de unirse a la albúmina de suero humano y bovino, formando un complejo con estas proteínas que limitan potencialmente su función fisiológica. Otros datos han demostrado que podría desencadenar carcinogénesis a dosis muy altas o exposición acumulativa. De igual manera, se debe tener en cuenta que la tartrazina se absorbe pobremente, por lo que no hay una alta probabilidad de desarrollo de estos efectos adversos, sin embargo, esto debe considerarse al tener altas exposiciones al pigmento o al combinarlo con otros colorantes. Como una alternativa, se han estudiado los pigmentos naturales, encontrando en ellos importantes beneficios para la salud, además de conferir características organolépticas; varios de ellos cumplen función como antioxidantes e incluso conservantes, aportando también propiedades funcionales a los productos alimenticios y teniendo como ventaja normativa la ausencia de un límite máximo de uso. Sin embargo, no se puede ignorar que este tipo de compuestos representan un desafío en la industria en comparación con los colorantes sintéticos, son menos estables, más costosos, requieren mayores concentraciones para alcanzar un alto poder de pigmentación y tienen una gama limitada de tonalidades (Markets and markets, 2020).

Revisando en detalle el movimiento del mercado de los colorantes de alimentos, se encontró que los colorantes naturales fueron valorados en USD 5 billones en 2020 y proyecta que alcance los USD 6,8 billones para el año 2025 con una tasa compuesta anual de 5,4% durante el período de 2020 a 2025 (TFO Canadá, 2012). Además, se estima que el mercado acumulará USD 2,1 mil millones para 2023 debido a la creciente demanda de

colorantes naturales en las industrias alimentarias y a la rápida expansión del sector de alimentos y bebidas en todo el mundo. A medida que se conozca más acerca de este tipo de colorantes y que se vaya dando solución a los inconvenientes presentados con la solubilidad, estabilidad y variedad, se puede esperar que el mercado crezca con mayor fuerza. Dentro de los pigmentos naturales con mayor demanda se encuentran los de coloraciones roja, naranja, rosada y azul, y el segmento que representa su mayor uso es el de los alimentos (TFO Canadá, 2012). La región de América del Norte y Europa son los dos mercados más grandes de colorantes naturales para alimentos, en conjunto representaron la participación de ingresos más alta del 62% en 2015 (Research Nester, 2015).

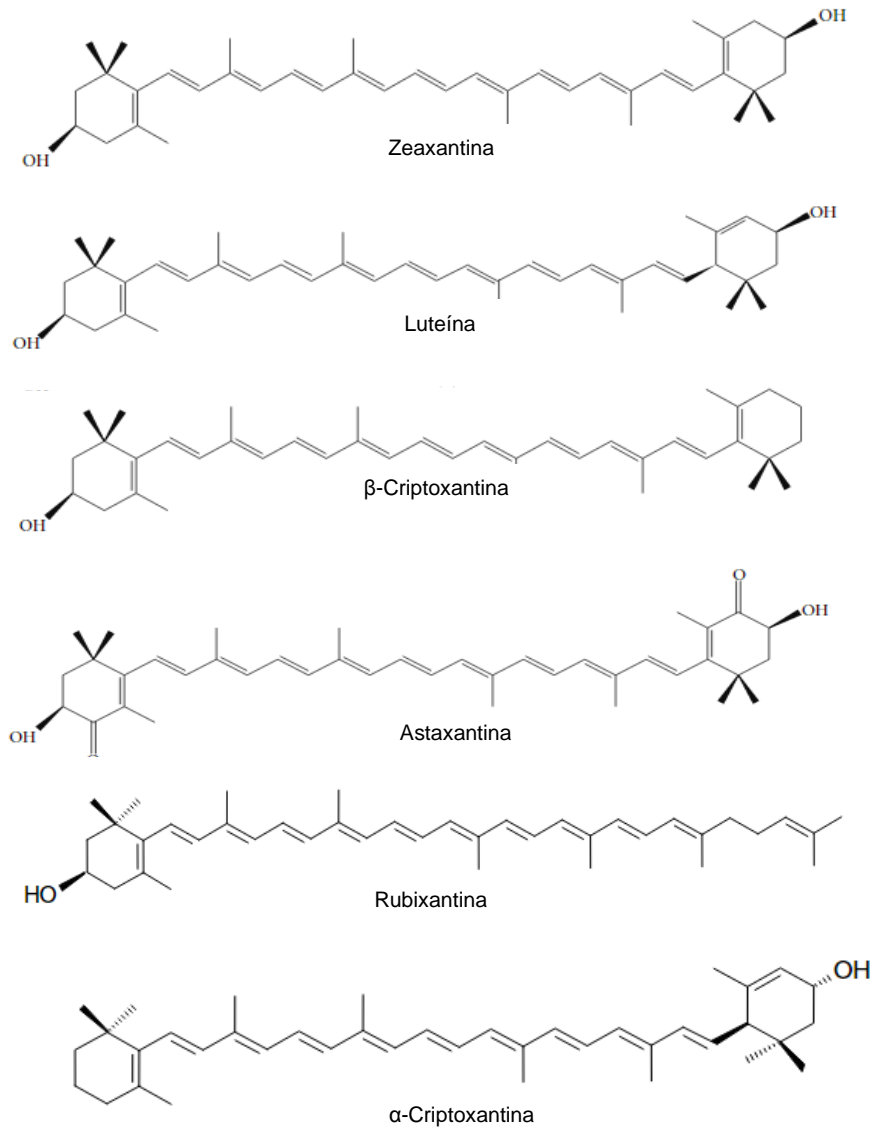
Existe una gran variedad de colorantes naturales presentes en alimentos de origen vegetal con propiedades fisicoquímicas, sensoriales y bioactivas específicas, determinadas por su estructura molecular. Por ejemplo, el color verde de algunas verduras y crucíferas se debe a la presencia de clorofilas, que son clorinas; las antocianinas, que son flavonoides, proporcionan los colores rojo, naranja, azul y púrpura, dependiendo del número y orientación de su grado de metoxilación e hidroxilación, así como del pH de medio en el que se encuentren; los carotenoides, que son más de 500 tipos de sustancias, son los responsables de los colores amarillo, naranja y rojo que se encuentran en algunas frutas y verduras (Leong et al., 2018).

1.2 Carotenoides como colorantes alimentarios

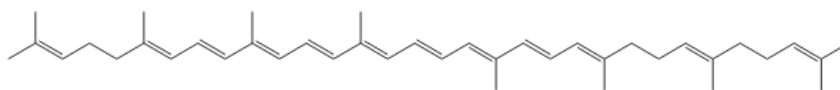
Los carotenoides son pigmentos en su mayoría hidrofóbicos, lipofílicos, insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos. Son de la clase de los tetraterpenoides (terpenoides de 40 carbonos) que consisten en 8 unidades de isoprenoides unidos de manera que la molécula es lineal y simétrica, con el orden invertido en el centro para que dos grupos metilo estén en la posición 1,6, mientras que los grupos metilo no terminales se ubiquen en la relación 1,5 (Mezzomo y Ferreira, 2016; Sahar et al., 2018) Ver Figura 1-1. Se han identificado cerca de 700 tipos de carotenoides de los cuales 50 pueden ser absorbidos por el cuerpo humano. De estos 50 carotenoides, los más conocidos son β -caroteno, α -caroteno, licopeno, β -criptoxantina, luteína, y zeaxantina (Nagarajan et al., 2017). En general el rasgo estructural distintivo de los carotenoides es un sistema extenso de dobles enlaces conjugados, el cual consiste en alternar enlaces carbono-carbono sencillos y dobles. Por lo general se denomina cadena poliénica (Rodríguez-Amaya, 2019).

Figura 1-1 Estructura de los carotenoides. (a): Xantófilas (b): Carotenos

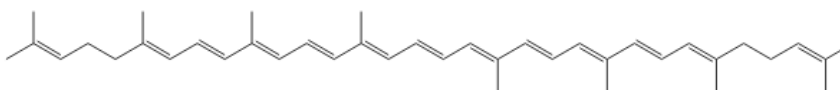
(a)



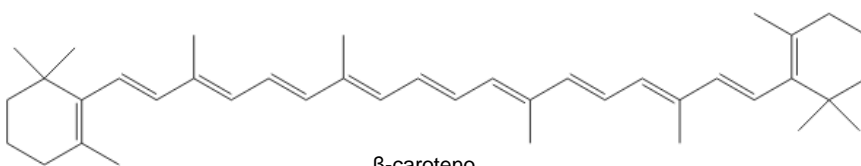
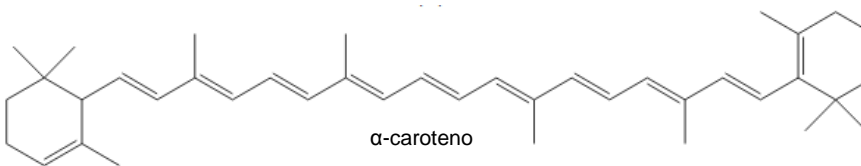
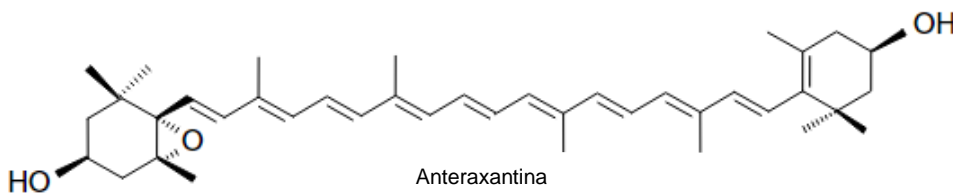
(b)



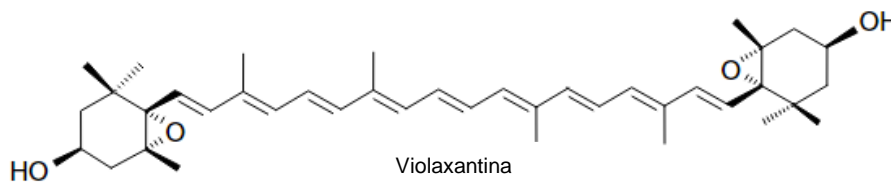
Neurosporeno



Licopeno

 β -caroteno α -caroteno

Anteraxantina



Violaxantina

Mezzomo y Ferreira, 2016; Rodríguez-Amaya, 2016

Estos pigmentos se clasifican según su composición química en carotenos y xantofilas. Los carotenos están compuestos solamente por carbono e hidrógeno, como es el caso del β -caroteno; mientras que las xantófilas contienen derivados oxigenados, como lo son la luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina. También se encuentran clasificados por la presencia o ausencia de anillos en su estructura, por lo que pueden ser cíclicos o acíclicos. Dada la presencia de dobles enlaces, se pueden formar diferentes isómeros geométricos cis y trans que tienen un importante efecto en la forma del carotenoide; en la mayoría de

ellos predomina la configuración trans, haciéndolos más estables; sin embargo, esto puede diferir cuando la estructura es acíclica, como en el caso del licopeno, fitoeno o fitoflueno. En los alimentos es más común encontrar los carotenoides en configuración cis por efecto del calor o la luz; una proporción pequeña pero biológicamente relevante de algunos carotenoides debe estar en la configuración cis para ser funcional en el complejo de captación de luz, así como en la formación de hormonas derivadas de carotenoides (Rodríguez-Concepción et al., 2018).

La estructura de los carotenoides puede ser modificada por procesos de hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, oxidación, introducción de grupos oxigenados, migración de dobles enlaces y extensión o acortamiento de la cadena, dando resultado a una amplia variedad de estructuras (Mezzomo y Ferreira, 2016; Rodríguez-Amaya, 2019). En estas múltiples estructuras aparecen los apocarotenoides y diapocarotenoides, que son productos de carotenoides que han perdido fragmentos en uno o ambos extremos de la molécula, como por ejemplo la bixina, el mayor pigmento de achiote y la crocetina, el principal componente colorante del azafrán. La interacción de la superficie activa de las moléculas con la luz, el calor o los ácidos da como resultado la isomerización de los carotenoides configurados en forma cis, lo que da como resultado la pérdida de la actividad y el color de la provitamina A. La degradación oxidativa de los carotenoides es el principal agente causante de la pérdida de la actividad de los carotenoides y generalmente se estimula por la presencia de luz, oxígeno, iones metálicos y enzimas. Con el objetivo de disminuir la exposición de los carotenoides a estas condiciones del entorno, se han aplicado técnicas como la encapsulación, que busca preservar las propiedades funcionales de este tipo de compuestos bioactivos y que a su vez permite la liberación controlada y dirigida en el organismo (Kaur et al., 2021; Ghosh et al., 2022).

El paso inicial en la desnaturalización oxidativa de los carotenoides es la generación de apocarotenoides y epóxidos, los cuales tienen esqueletos acortados de átomos de carbono y su fragmentación conduce a la formación de sustancias más pequeñas que tienen pesos moleculares bajos; la sucesión de esta oxidación lleva a la pérdida completa de color y la actividad biológica de los carotenoides (Sahar et al., 2018). Cuando los carotenoides son isomerizados, se pronuncian con la anotación alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), y zeta (ζ) (D. Rodríguez-Amaya, 2019). Los carotenoides se pueden obtener de fuentes

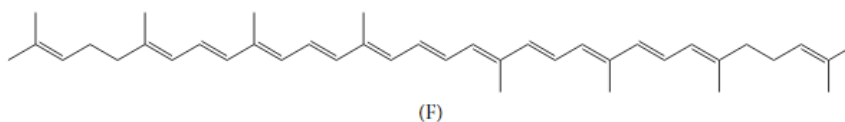
vegetales, algas, microalgas, hongos, levaduras y animales acuáticos; por ejemplo, la astaxantina es aislada de una fuente animal, mientras que el β -caroteno puede ser obtenido tanto de raíces de *Daucus carota* como de hongos (*Blakeslea trispora*) (Martins et al., 2016). En la Tabla 1-1 se observan las diferentes fuentes de diversos carotenoides.

Los carotenoides se localizan en las células vegetales en el interior de orgánulos especializados como cloroplastos (plastos verdes que acompañan a las clorofilas), cromoplastos (plastos amarillos, naranjas y rojos), amiloplastos (plastos que contienen almidón), elaioplastos (plastos que contienen lípidos), leucoplastos (plastos incoloros) y etioplastos (precursores maduros del cloroplasto) (Nagarajan et al., 2017). En el caso de los frutos maduros, los carotenoides se acumulan en los plastoglobulos de los cromoplastos de forma masiva y es donde la diversidad estructural alcanza un mayor grado (Mínguez et al., 2005).

La formación de color depende de los dobles enlaces carbono-carbono conjugados en la estructura química, también llamada cadena poliénica, responsable del color (cromóforo), forma, reactividad y propiedades fotoquímicas (Rodríguez-Concepción et al., 2018). La estructura cromófora es capaz de absorber energía o luz visible y excitarse para así emitir diversos colores (Catalán, 2016).

Se requieren al menos siete dobles enlaces conjugados para que un carotenoide emita color como es el caso del ζ -caroteno que da coloración amarillo suave, mientras que el fitoflueno tiene cinco dobles enlaces conjugados por lo que es incoloro. El color se acentúa a medida que se extiende el sistema conjugado, por ejemplo, el licopeno tiene once dobles enlaces y su color es rojo. Ver Figura 1-2.

Figura 1-2 Estructura del licopeno



Coordenadas CIELab del licopeno: L: 37,70, a: 30,94, b: 24,34
(Stinco et al., 2013)



Tabla 1-1: Fuentes de carotenoides

Tipo de fuente	Fuente	Principal carotenoide
Microalgas	<i>Dunaliella salina</i>	β -caroteno
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Astaxantina
	<i>Chlorella vulgaris</i>	Cantaxantina
	<i>Scenedesmus almeriensis</i>	Luteína
	<i>Corymbia ellipsoidea</i>	Violaxantina
Animales marinos	Camarones, cangrejos, langostas, mariscos, ballena	Astaxantina
	Mariscos, erizos de mar, delfines	β -caroteno
	Delfines	Luteína
Hongos y levaduras	<i>Blakeslea trispora</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> ,	β -caroteno α -caroteno
	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> , <i>Peniophora</i> sp., <i>Phaffia rhodozyma</i> , <i>Thraustochytrium</i> strains ONC-T18 y CHN-1, <i>Thraustochytriidae</i> sp. AS4-A1, <i>Aurantiochytrium</i> sp. KH105	Astaxantina
Hongos y levaduras	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Phycomycus blakesleeanus</i> , <i>Choanephora cucurbitarum</i> , <i>Rhodotorula aurea</i> , <i>Rhodospiridium diobovatum</i> , <i>Aspergillus giganteus</i> , <i>Sporobolomyces roseus</i> , <i>Rhodotobacter sphaeroides</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula acheniorum</i>	β -caroteno
	Papas, vegetales verde oscuro, brócoli, arvejas, zanahoria	α -caroteno
Vegetales	Zanahoria, espinaca, ahuyama	β -caroteno
	Papaya, papa, cáscara de naranja, mandarina	α -criptoxantina
	Naranjas	β -criptoxantina
	Espinaca, brócoli, lechuga	Luteína
	Tomate, melón	Licopeno

Fuente: (Rammuni et al., 2019; Adadi et al., 2018)

La ciclación causa un tipo de impedimento, ya que, por ejemplo el β -caroteno y el γ -caroteno son de color naranja y rojo-naranja respectivamente, aunque tienen el mismo número de enlaces dobles conjugados que el licopeno (once). La intensidad y matiz de los colores en los alimentos dependen los carotenoides presentes, sus concentraciones y estado físico (Rodríguez-Amaya, 2019). La mayoría de carotenoides absorben luz azul y

violeta (400 a 500nm) y por esto emiten su color en el rango amarillo-rojo (600 a 700nm) (Rodríguez-Amaya, 2018).

Además de los llamativos colores generados por los carotenoides, estos compuestos pueden emplearse de diferentes maneras ya que existe evidencia sobre sus potenciales beneficios para la salud, tal como lo reportan Saini y Keum (2018), dentro de los cuales se destaca su carácter protector contra el cáncer de pulmón, cabeza, cuello y próstata, modulación del sistema inmunitario, vías de señalización intracelular, regulación de la diferenciación celular, ciclo celular y apoptosis y fotoprotección contra la radiación UV, adicional a que actúa como precursor del pigmento visual retinol (Vitamina A), y en general son potentes antioxidantes (Kourouma et al., 2019).

Los diferentes factores que afectan la composición de carotenoides del producto fresco se han investigado, encontrando efecto de los cultivares / variedad, la madurez, el clima o la estación, el sitio geográfico de producción, las prácticas agronómicas, parte de la planta utilizada, la recolección y el manejo postcosecha (Rodríguez-Amaya, 2019):

- El estado de madurez es el principal factor que afecta el contenido de carotenoides, dado que este aumenta durante el proceso de maduración debido a la acción metabólica del etileno. Durante el proceso de maduración se degradan las clorofilas y cromoplastos lo que conlleva al incremento del contenido de carotenoides.
- El origen geográfico también contribuye en el contenido de carotenoides, atribuido a la diferencia en intensidad y tiempo de exposición a la luz solar ya que estos factores tienen efecto en la estabilidad de los carotenoides. Una mayor temperatura y exposición a la luz solar puede incrementar la carotenogénesis, pero una excesiva exposición puede generar fotodegradación.
- La estructura de las frutas y vegetales está relacionada con el contenido de carotenoides dado que su concentración no es la misma en todas las partes del vegetal; usualmente las cáscaras contienen mayor cantidad de carotenoides en comparación con la pulpa. Las condiciones inadecuadas de almacenamiento conducen a la rápida pérdida de carotenoides durante el período de almacenamiento. Las pérdidas de carotenoides aumentan en el producto almacenado debido a la exposición de la luz solar u oxígeno. En frutas sensibles a

baja temperatura (tomate), los contenidos de carotenoides disminuyen si la temperatura cae por debajo del punto de enfriamiento (Sahar et al., 2018).

1.3 Estabilidad de carotenoides

Es conocido que las reacciones de degradación de los carotenoides durante el almacenamiento se aceleran a altas temperaturas, presencia de oxígeno y exposición a la luz. La cadena de polieno conjugado es rica en electrones y por ende es más susceptible a reacciones con reactivos electrofílicos. En los tejidos vegetales donde son sintetizados los carotenoides están relativamente protegidos al estar incorporados en las lipoproteínas o membranas celulares, sin embargo, al estar aislados o en solución pueden ser más propensos a las reacciones de degradación oxidativa y a la isomerización. La oxidación es la principal causa de pérdida de los carotenoides durante el almacenamiento y procesamiento y se ocasiona por exposición a la luz y al calor, influyendo en la estabilidad a través de la oxidación de radicales libres, que también conlleva a la isomerización de los carotenoides trans a conformación cis (Albanese, Adiletta, D'Acunto, et al., 2014). Adicionalmente, la disponibilidad de oxígeno, pH bajo, presencia de prooxidantes, metales catalíticos y enzimas oxidativas promueven la degradación de los carotenoides; mientras que la baja actividad de agua y la presencia de antioxidantes actúan como protectores. Estas reacciones de degradación se ven reflejadas en el color y olor del producto (Albanese, Adiletta, D'Acunto, et al., 2014).

Se han realizado diversos estudios evaluando el efecto del procesamiento y de diferentes operaciones unitarias en la estabilidad de los carotenoides. Mutsokoti et al. (2017) afirmaron que la exclusión del oxígeno y la protección de la luz eran fundamentales para la estabilidad de los carotenoides. Esto lo evidenciaron al evaluar el comportamiento del licopeno y el β -caroteno en el tomate y del β -caroteno y α -caroteno en purés de zanahoria en almacenamiento durante 6 meses en condiciones de oscuridad y con un espacio de cabeza limitado, a una temperatura de 20, 30 y 40°C, donde evidenciaron que los carotenoides se mantuvieron estables, logrando una retención del 97%.

Paznocht et al. (2019) evidenciaron que el horneado de productos panificados causó la degradación del 11.1% de los carotenoides, observando que no hubo efecto protector significativo de la esterificación de los carotenoides sobre la estabilización o resistencia al tratamiento térmico, teoría que buscaban comprobar al encontrar en estudios previos que

las formas esterificadas de xantófilas son más estables en presencia de calor que sus formas libres.

En otro trabajo se encontró que el calentamiento del β -caroteno puro a 180°C durante dos horas causó la formación de isómeros cis. Se demostró también que la circulación de aire en la muestra aumentó la degradación del pigmento, en razón a la interacción con el oxígeno. Por esta razón, se concluyó que los dobles enlaces podrían oxidarse y que la ruptura podría empezar a partir del extremo terminal de la molécula avanzando hacia el centro de la misma (Boon et al., 2010).

Delgado-Vargas et al. (2012) estudiaron el efecto del secado sobre los carotenoides durante la elaboración de paprika a partir del pimiento, encontrando que el secado rápido induce a la destrucción de carotenoides y que, por el contrario, al secar lentamente se observan incrementos de estos compuestos. También encontraron que en el proceso de molienda hubo una importante reducción del contenido de carotenoides, siendo el carotenoide más afectado el β -caroteno, seguido de la β -criptoxantina y la zeaxantina, mientras que los más estables fueron la capsantina y la capsorubina. Se concluyó adicionalmente, que el secado en condiciones de oscuridad incrementó el contenido de carotenoides en un 15%.

Los procesos de escaldado (98°C durante 5 minutos), cocción (98°C durante 15, 30 y 60 minutos) y secado al sol (25°C \pm 6°C) se evaluaron sobre el contenido de carotenoides, obteniendo que el escaldado dio lugar a una reducción del β -caroteno y un incremento del α -caroteno. La cocción mejoró la cantidad de carotenoides extraídos y en el caso del secado al sol, se presentó una reducción en el contenido de carotenoides (Delgado-Vargas et al., 2012).

En el procesamiento de azafrán, se evidenció que temperaturas inferiores a 30°C y superiores a 60°C generaban degradación de carotenoides. Se observó que la temperatura óptima de secado fue 40 \pm 5°C. En almacenamiento durante 1 año en condiciones entre 15 a 35°C, con una humedad relativa de 10 a 12% se observó degradación de carotenoides entre un 56.9 y un 70.2% (Delgado-Vargas et al., 2012).

En otro estudio donde se secaron cáscaras de tomate por diferentes métodos (aire caliente, secado por congelación y secado en lecho fluidizado), se observó que el secado con aire caliente a 50°C era un método adecuado para conservar los carotenoides y la

actividad antioxidante en las cáscaras de tomate (Albanese, Adiletta, D'Acunto, et al., 2014).

Jones et al. (2005) incorporaron luteína en queso cheddar, examinando sus condiciones organolépticas y estabilidad durante el almacenamiento. Encontraron que los quesos enriquecidos presentaron un sabor amargo y tuvieron una modesta aceptación de sabor. No se presentó degradación de la luteína durante 24 semanas a una temperatura de 4,5°C.

Sogi et al., (2014) evaluaron el efecto sobre el contenido de carotenoides de métodos de secado de mango, tales como liofilización, secado con aire caliente, secado al vacío y secado por infrarrojo, donde evidenciaron que el mayor contenido de carotenoides se obtuvo con el secado por liofilización (5,17 mg/100 g mango seco) seguido por el secado con aire caliente, luego secado al vacío y con el que se obtuvo el menor contenido de carotenoides fue con el secado por infrarrojo (3,28 mg/100 g mango seco). De este trabajo concluyeron que a medida que se incrementaba la temperatura de secado, se reducía el contenido de carotenoides.

1.4 Ahuyama como fuente de carotenoides

La ahuyama o auyama, es una hortaliza de la familia de las plantas *Cucurbitaceae* que tiene cerca de 750 especies divididas en 90 géneros. Es de la misma familia que las calabazas e incluye calabacines, melones y pepinos, y se pueden encontrar en una variedad de tamaños y colores como naranja, verde y blanco (Freedman, 2021). De hecho, existen varias especies de ahuyama, de las cuales las más empleadas son *Cucurbita pepo*, *Cucurbita moschata*, *Cucurbita máxima* y *Cucurbita mixta* (Assous et al., 2014).

La ahuyama según el país de origen puede variar su nombre, por ejemplo, en varios países de América central es conocida como ayote, en México y España como calabaza o calabacita, en varios lugares de Sudamérica como zapallo, en regiones de México, Guatemala y El Salvador como pipián, en Estados Unidos (en idioma inglés) como *squash* o *pumpkin*; también es conocida como calabacín, zuchini y totumo (Cásseres, 1981). Es una planta rastrera o trepadora que tiene hasta 10 m de longitud con hojas verdosas provistas de profundos lóbulos y un tallo semicubierto de pelillos; sus flores son de forma cónica, simétrica, miden hasta 10 cm y son comúnmente de color amarillo o blanco. Las semillas son de cáscara aplanada, lisa y clara, su interior regularmente es color verde

oscuro u olivo y comúnmente tienen una gran concentración de aceites. Los frutos de los miembros de la familia de las calabazas son un tipo de baya, es decir, una fruta carnosa y de múltiples semillas. En esta familia, los frutos son conocidos como pepos. Los pepos de algunas variedades cultivadas de calabazas pueden ser enormes y representan las frutas más grandes del mundo (Freedman, 2021). Se cultivan en zonas de baja altitud en climas cálidos y con alta humedad, en una altitud entre 0 y 1800 msnm (Velásquez y Carrillo, 2016).

Song, Yang, et al. (2018) reportan que la ahuyama contiene en su pulpa importantes cantidades de carotenoides, principalmente β - y α -caroteno, luteína, β -criptoxantina y zeaxantina. De 12 a 14 especies de ahuyama se encuentran distribuidas desde Norte América hasta Argentina. Este alimento hace parte fundamental de la alimentación básica en muchas regiones de América, Asia y Europa, evidenciando esta importancia en el aumento del área sembrada (Vallejo y Estrada, 2004). En Colombia desde el año 2013 hasta el año 2017 se duplicó el área cosechada, obteniendo una producción de 124000 Ton con un rendimiento de 12 Ton/Ha (Agronet, 2018).

La ahuyama es ampliamente reconocida por su aporte de componentes bioactivos en la dieta humana, los cuales brindan efectos benéficos en la salud por su valor nutricional. En las diferentes especies de ahuyama se destaca el alto contenido de carotenoides, en particular el β -caroteno que puede representar hasta el 80% aproximadamente del contenido total de este grupo de pigmentos; también están en menores proporciones la luteína, el licopeno y el α -caroteno (Priori et al., 2017). La Tabla 1-2 muestra el contenido proximal de la ahuyama de acuerdo con la (USDA, 2018).

Tabla 1-2: Composición de la ahuyama en 100 g

Descripción	Composición
Humedad (g)	91,6
Energía (Kcal)	26
Proteínas (g)	1
Lípidos (g)	0,1
Carbohidratos (g)	6,5
Fibra (g)	0,5
Ceniza (g)	0,8

Tabla 1-2: (Continuación)

Minerales	
Calcio (mg)	21
Fosforo (mg)	44
Hierro (mg)	0,8
Magnesio (mg)	12
Potasio (mg)	340
Zinc (mg)	0,3
Vitaminas	
Niacina (mg)	0,6
Riboflavina (mg)	0,1
Vitamina C (mg)	9
Vitamina E (mg)	1,1
Vitamina K (mg)	1,1
Vitamina A (UI)	8513

Fuente: (USDA, 2018)

La especie *Cucurbita moschata* es la especie más extendida en América tropical desde México hasta Perú, caracterizada por tener tallos duros y angulares, pedúnculo suavemente acanalado (pentaquínado) ensanchado en el punto de unión con el fruto, hojas sin espinas, pero con vello suave y con manchas blancas en la intersección de las nervaduras (Rodríguez et al., 2018). Además de los carbohidratos, el principal aporte nutricional de la *Cucurbita moschata* es el alto contenido de carotenoides que se puede encontrar entre 490,1 y 1365,8 µg/g (de Carvalho et al., 2012) predominando el β-caroteno; este compuesto junto con el α-caroteno presentan las mayores concentraciones en la especie *Cucurbita moschata* en comparación con las otras especies de ahuyama. Los carotenoides se encuentran principalmente en la pulpa de este fruto y su contenido se puede ver afectado por factores como el estado de maduración, el medio de crecimiento, tratamientos de cosecha y poscosecha y la temperatura. Por ejemplo, el contenido de carotenoides tiende a decrecer al estar expuesto a altas temperaturas, por efecto de las reacciones de degradación descritas anteriormente. En el caso de los efectos de la maduración, esta va acompañada de una mejora en la carotenogénesis, es decir, favorece un mayor contenido de carotenoides, lo cual generalmente se refleja en tonalidades rojas-amarillas-naranjas más intensas. Otra condición que también afecta el contenido de

carotenoides en la ahuyama es el modo de preparación o cocción, teniendo en cuenta que (Azizah et al., 2009) demostraron que hay mayor retención de carotenoides en un alimento hervido o escaldado que en uno freído en razón a la temperatura de exposición. En este sentido es necesario tener en cuenta que un rango de temperatura de 60 a 100°C por un tiempo de 0 a 2 horas genera la degradación del β -caroteno (Provesi y Amante, 2015). También se debe considerar el efecto del oxígeno y la luz, ya que son factores que reducen el contenido de carotenoides (Ortiz Grisales, 2012).

1.5 Técnicas de extracción de carotenoides

Los compuestos carotenoides se encuentran en los cloroplastos celulares de los alimentos y ha sido un desafío desarrollar técnicas de extracción con altos rendimientos de extracción y óptimas condiciones de trabajo. Esto se debe a varias razones como la complejidad de las estructuras de las diferentes matrices alimentarias, la apolaridad de los compuestos de interés frente a la polaridad del agua que se encuentra en los mismos tejidos, la sensibilidad a la luz, oxígeno y temperatura de los carotenoides, entre otros. El contenido de agua de las fuentes de carotenoides es un aspecto desfavorable debido a que los carotenoides son compuestos hidrofóbicos, lo cual aumenta la dificultad de separación dada la formación de dos fases y su posible emulsificación (Saini y Keum, 2018), por lo cual se ha considerado el secado como una etapa previa a la extracción. Como estrategia para facilitar la extracción de los carotenoides se han aplicado diferentes pretratamientos químicos y físicos al alimento, previos a la extracción, que buscan ayudar a romper la membrana celular y exponer el contenido de la célula dentro del cual se encuentran los carotenoides, momento en el cual son más susceptibles a la degradación, aún a bajas temperaturas. Dentro de estos pretratamientos se encuentran la cocción, secado, choque osmótico, congelación-descongelación, molienda criogénica, surfactantes y medios enzimáticos. La cocción, pese al efecto del aumento de temperatura, puede aumentar el rendimiento de carotenoides ya que este pretratamiento ayuda a la desintegración del complejo carotenoide-proteína de la muestra. Kim et al. (2016) concluyeron que, para la optimización de un proceso de extracción que ayude a la producción rentable de carotenoides naturales, deben investigarse los pretratamientos en términos de aspectos

críticos como el consumo de energía, la toxicidad, la estabilidad de los metabolitos y la facilidad de escalamiento.

Dentro de los aspectos críticos en la extracción de carotenoides se considera que la selección del solvente es el factor más importante por la solubilidad requerida con el compuesto de interés.

Dentro de los métodos de extracción convencionales o también conocidos como procesos de extracción a baja presión, se encuentran hidrodestilación, extracción con solventes orgánicos y destilación a vapor. Estas técnicas dependen de la selección de los solventes y de condiciones como la temperatura, la agitación, solubilidad, etc. Este conjunto de técnicas tiene ciertas desventajas asociadas primeramente a la degradación térmica de los carotenoides, debido a que es necesario llevar al solvente a su estado de vapor; por otro lado, el uso de estos solventes orgánicos representa un peligro tanto para la salud humana como para el medio ambiente y, adicionalmente, estas tecnologías tienen un alto consumo energético, alto costo de proceso y de tiempo (Singh et al., 2015).

Convencionalmente el método empleado para la extracción de carotenoides es la extracción de tipo Soxhlet o por solventes orgánicos, donde el solvente se difunde en la matriz y disuelve los compuestos solubles. Es importante que el compuesto objetivo tenga una solubilidad selectiva con el solvente, en comparación con otros componentes de la matriz, aunque esto al momento de la operación no es muy factible, pues se busca optimizar la técnica, modificando el tipo de solvente, la relación matriz-mezcla, el tamaño de partícula, la temperatura y el tiempo de extracción, con el fin de recuperar la mayor cantidad de carotenoides posible (Strati y Oreopoulou, 2014).

Para mitigar las desventajas de los métodos convencionales o de baja presión actualmente empleados, surgen las tecnologías verdes, que se centran principalmente en el descubrimiento y diseño de nuevos procesos de extracción con reducción en requerimientos energéticos, recurriendo a solventes alternativos no peligrosos y productos naturales renovables, se garantizan unos extractos seguros y de alta calidad (Chemat et al., 2012), sumado a que los residuos sólidos secos se pueden reutilizar después de la extracción para aumentar la fertilidad del suelo y como materia prima de alimentación animal. Dentro de estas tecnologías se encuentran la extracción asistida por ultrasonido, la extracción asistida por microondas, extracción líquida presurizada, extracción asistida

por campos eléctricos pulsados, extracción enzimática, extracción con fluidos supercríticos, que buscan minimizar los tiempos de extracción, mejorar los rendimientos de extracción y/o volver factible el uso de solventes alternativos de baja toxicidad (Singh et al., 2015).

Extracción asistida con ultrasonido

Un ejemplo de tecnología verde empleada para asistir procesos de extracción de carotenoides es la extracción asistida con ultrasonido, cuyo fundamento está en la aplicación de la irradiación ultrasónica, la cual acelera los procesos químicos a través de cavidades acústicas en materiales con propagación de onda a través de un líquido. Esta técnica mantiene la calidad de los alimentos y a nivel de operación y costos es muy favorable, ya que es relativamente económica, de fácil manejo, respetuosa con el medio ambiente, reduce el consumo de energía, acorta el tiempo de extracción y reduce el uso de solventes químicos (Annisa et al., 2018). La sonoporación es el fenómeno a partir del cual se fundamenta el ultrasonido, y es útil cuando se desea permeabilizar las paredes celulares de matrices alimentarias, por ejemplo, en los procesos de extracción logrando la liberación del contenido celular. Este efecto es dado por la cavitación acústica que ocurre durante la propagación de la onda ultrasónica en el solvente, formando series de compresiones y rarefacciones en un desplazamiento longitudinal, lo que remueve temporalmente de su posición original a las moléculas del medio haciendo que en la fase de compresión colisionen unas con otras. Durante las fases de rarefacción se ejerce una presión negativa que separa las moléculas y a su vez las fuerzas de atracción entre ellas ocasionan cavidades en el líquido del medio, dando lugar a la formación de burbujas de cavitación que van creciendo debido a que durante las fases de rarefacción los vapores o gases disueltos en el medio entran a dichas burbujas, a tal punto que colapsan liberando grandes cantidades de energía. Este colapso causa una intensa macroturbulencia, micromezclas y posterior colisión entre partículas, lo que induce a una mayor transferencia de masa debido a la reducción del tamaño de partícula de la matriz alimentaria, difundándose rápida y fácilmente el contenido de interés en el solvente (Chemat et al., 2017). Como resultado, se mejora la transferencia de masa desde la matriz alimentaria y por ende la extracción de los compuestos de interés (Vinatoru et al., 2017). Rutkowska et al., (2017), describen en dos pasos los efectos mecánicos y cavitacionales en un proceso

de extracción: (1) Ingreso del solvente en la matriz, disminuyendo el tamaño de partícula y mejorando la penetración del solvente; (2) liberación del extracto a partir de la matriz debido al aumento en el área de contacto entre el solvente y la matriz alimentaria

Dentro de las variables que tienen mayor efecto en la extracción asistida con ultrasonido se encuentra el tipo de solvente empleado. Además de los solventes orgánicos, se ha estudiado el uso de aceites vegetales como medios de extracción en razón a que actualmente las industrias buscan procesos de producción amigables con el medio ambiente, que reduzcan la cantidad de solvente y que sean más biodegradables, aspectos con los que cumplen los aceites vegetales. Los procesos extractivos en los cuales se emplean aceites vegetales como solvente, se podrían considerar como procesos verdes, debido al bajo consumo energético y a que se realizaría una producción del extracto sin contaminantes (Chemat et al., 2012). En consecuencia, el uso de los aceites vegetales en la extracción de compuestos bioactivos se ha incrementado recientemente, gracias a su potencial para extraer carotenoides, facilidad de adquisición, uso en la industria alimentaria y a que actúan como una barrera contra el oxígeno (Goula et al., 2017; Li et al., 2013; Ordóñez-Santos et al., 2015; Rahimi y Mikani, 2019)

Algunas investigaciones se han realizado en búsqueda de obtener los carotenoides de diversas matrices alimentarias empleando aceites vegetales como solventes, tal es el caso de la cáscara de naranja empleando aceite de oliva (Gajic et al., 2021), chontaduro empleando aceite de soya (Ordóñez-Santos et al., 2019), zanahoria empleando aceite de girasol (Li et al., 2013) y cáscaras y pulpa de ahuyama (*Cucurbita máxima*) empleando aceite de maíz (Sharma y Bhat, 2021). Estos trabajos han mostrado la viabilidad de estos solventes como agentes de obtención de extractos oleosos ricos en carotenoides.

1.6 Aceites como solventes verdes

Un solvente puede denominarse como verde cuando es “más ecológico” en comparación con el solvente empleado convencionalmente (Häckl y Kunz, 2018)). Dentro de la clasificación de los solventes verdes, los aceites vegetales pertenecen a la clase de solventes de base biológica, que tienen la ventaja de ofrecer un impacto positivo en el medio ambiente y la salud, ya que no emiten compuestos orgánicos volátiles, son

biodegradables y no son tóxicos. Los aceites vegetales han empezado a considerarse como una alternativa para reemplazar solventes derivados del petróleo, teniendo en cuenta que conforman un conjunto de características como no volátiles, seguros, fáciles de regenerar, económicamente viables y con un importante poder de disolución y selectividad (Yara-Varón et al., 2017).

Varios estudios han demostrado que los aceites vegetales son buenos solventes para la extracción de carotenoides. Por ejemplo, se demostró que la extracción de carotenoides asistida por ultrasonido empleando aceite de girasol como solvente mostró rendimientos similares a los obtenidos con hexano y permitió la simplificación del proceso, ya que no era necesario realizar la etapa de evaporación o separación del solvente, adicional a que representó ventajas en costos, tiempo y energía (Li et al., 2013). También se ha evaluado la eficacia de la extracción directa de carotenoides a partir de subproductos de camarón y microalgas, obteniendo que los aceites vegetales tuvieron una buena retención de una alta concentración de carotenoides en condiciones óptimas sin que se presentara degradación o pérdida de los compuestos extraídos, mínimos cambios en los perfiles de ácidos grasos del aceite (Yara-Varón et al., 2017). Sin embargo, Stoll et al. (2019) reportan que, según la concentración en que se encuentren los carotenoides, puede haber un efecto prooxidante en los aceites vegetales, ya que es posible que se presente una autooxidación de carotenoides produciendo grupos epoxi, hidroxilo y carbonilo que podrían mejorar la etapa de propagación de la reacción de oxidación al suministrar al sistema sustratos más oxidables.

La selectividad de los aceites vegetales depende de su composición, que se ve reflejada en la eficiencia de extracción y factores de enriquecimiento variables; así también la solubilidad está relacionada con la complejidad molecular, homogenización, el método de extracción, la composición de ácidos grasos y sus proporciones en el aceite vegetal empleado como solvente (Yara-Varón et al., 2017). En diversos estudios se ha demostrado que el aceite de girasol es un excelente solvente vegetal para la extracción de carotenoides evaluado en su rendimiento (Hooshmand et al., 2017; Tiwari, 2015; Li et al., 2013; Goula et al., 2017). En este aceite predominan los ácidos grasos poliinsaturados, donde el ácido oleico (C18: 1, n 9) y el ácido linoleico (C18: 2, n 6) juntos representan el 85-87%. En el aceite de girasol convencional predomina el ácido linoleico con un rango de 48 a 74%. Este aceite también contiene alrededor de 11 a 12% de ácidos grasos saturados (principalmente ácidos palmítico y esteárico). El ácido oleico equivale aproximadamente al 14-39,4%

(Sánchez-Muniz et al., 2016). La composición de diferentes aceites de girasol se relaciona en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3: Composición en ácidos grasos de diferentes tipos de aceite de girasol

Ácido graso	Palmítico	Estéarico	Oleico	Linoleico
Aceite de girasol convencional	7	5	30	58
Alto en oleico	5	4	88	3
Aceite alto en oleico	30	7	51	10
Alto en oleico – Alto en palmítico	33	10	7	48
Alto en esteárico	5	27	15	53
Medio esteárico	5	14	19	62
Alto en oleico – Alto en esteárico	6	24	62	8

Fuente: Sánchez-Muniz et al., (2016)

1.7 Metodologías instrumentales de determinación de color y espacios de color

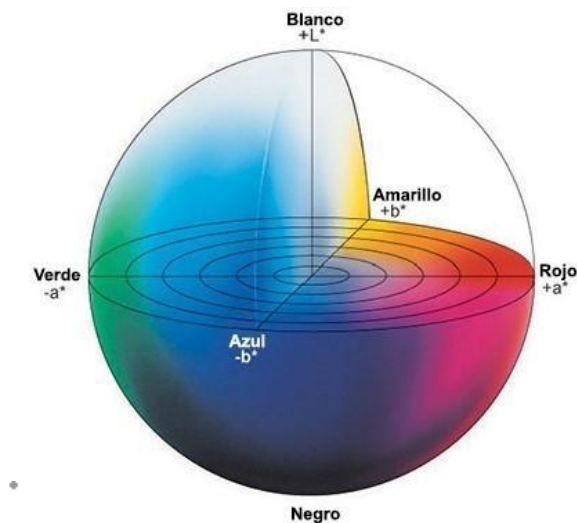
La medición del color en frutas y alimentos adquiere importancia en la industria alimentaria al ser un parámetro que permite clasificar productos, evaluar materias primas, controlar procesos y características específicas de ciertos alimentos, sumado a que los resultados de estas mediciones lograrán indicar el manejo adecuado de los alimentos o materias primas para obtener la máxima calidad del producto final (Vásquez, 2015).

Para realizar medidas de color instrumentalmente se emplean técnicas que miden la reflectancia o transmitancia de las muestras y se apoyan en equipos especializados como espectrofotómetros o colorímetros triestímulos (Vásquez, 2015). La colorimetría es la ciencia de correlacionar el color con la percepción humana. Normalmente, se utiliza un colorímetro triestímulo para medir la luz y correlacionarlo con las coordenadas de determinado modelo de color. Dentro de los modelos más empleados para medir el color se encuentran el modelo de color Munsell, modelo de color XYZ, modelo $L^*c^*h^*$ y el modelo $CIEL^*a^*b^*$. Este último, se puede observar en la Figura 1-3 y está integrado por tres parámetros:

- L^* : Luminosidad: Claridad expresada como porcentaje que va desde 0 hasta 100, siendo 0 negro y 100 blanco. Esta característica es una medida relativa de la luz reflejada entre la absorbida, por lo que no se considera como partícipe de la cromaticidad (González, 2010).
- a^* : Tiene una escala -120 a +120. Según la posición del color va desde el rojo al verde, donde valores negativos indican verde y valores positivos indican rojo.
- b^* : Tiene una escala -120 a +120. Según la posición del color va desde el amarillo al azul, donde valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo.

Los valores a^* y b^* se representan en un eje XY con el valor L perforando el centro de la gráfica como un espacio tridimensional. Cuando los valores de a^* y b^* se miden en cero, el color indicado es un verdadero neutro que cae justo en el centro del espacio rojo a verde o del espacio azul a amarillo (Becker, 2016).

Figura 1-3: Modelo de CIEL^{*}a^{*}b^{*}



Fuente: Konica Minolta (2014)

Los instrumentos empleados para medir el color pueden ser colorímetros, espectrofotómetros o espectroradiómetros, que pueden generar directamente o por cálculos matemáticos los valores triestímulo. El colorímetro emplea el método triestímulo y sus funciones de respuesta espectral son directamente proporcionales a los coeficientes de distribución (funciones de igualación de color) correspondientes al observador

colorimétrico de la CIE. Estos equipos están diseñados para medir la luz de modo muy similar en el que el ojo humano la percibe, por lo que cuentan con tres filtros primarios rojo, verde y azul que simulan la forma que el ojo humano es sensible a la luz. Las mediciones de color triestímulos brindan información sobre la cantidad de éstos tres componentes presentes en la luz reflejada o transmitida por un producto (Konica Minolta, 2014).

Diferentes estudios se han realizado evaluando el color a diferentes matrices alimentarias. Itle y Kabelka (2009) determinaron si el contenido de carotenoides en la calabaza y el calabacín de diferentes cultivares y lugares medidos por HPLC se correlacionaban con los valores del espacio de color del colorímetro $L^*a^*b^*$. Se evaluó la pulpa de cada cultivo mediante estos dos análisis, encontrando una alta correlación entre la técnica de HPLC y análisis colorimétrico. Se encontraron correlaciones fuertes entre el valor de color a^* y los carotenoides totales ($r = 0,91$) y el valor de color b^* y el croma con luteína ($r = 0,87$).

Nour et al., (2018) evaluaron el cambio de color al enriquecer aceites extravirgenes con carotenoides originados a partir de residuos de tomate seco. Para esto se leyeron las coordenadas CIEL $L^*a^*b^*$ en un espectrofotómetro UV/VIS y se encontró que la luminosidad L^* varió de 72,2 a 78,8. Estos valores incrementaron al aumentar la concentración de desechos de tomate seco hasta un 2,5% y luego disminuyeron; por lo tanto, se deduce que la extracción en altas concentraciones conduce al oscurecimiento de los aceites. Por otro lado, los valores a^* aumentaron mientras que los valores b^* disminuyeron después de la extracción asistida por ultrasonido de un 5% de residuos de tomate, lo que significó más cambios en rojo y menos amarillo, respectivamente, que podrían atribuirse a la extracción de carotenoides, predominantemente el licopeno rojo, en los aceites.

Patsilnakos et al. (2018) monitorearon el contenido de carotenoides en bayas Goji cultivadas en Italia, evaluando las diferencias entre variedades, periodos de cosecha, estaciones y procesos de extracción. Se realizó análisis de color a través de un colorímetro en escala CIEL $L^*a^*b^*$ encontrando que la luminosidad L^* varió entre un mínimo de 35,65 y un máximo de 44,44, el enrojecimiento a^* varió entre 16,81 y 30,54 y la amarillez b^* varió entre 14,71 y 29,16 con diferencias relevantes. Los datos no mostraron diferencias entre las dos variedades, sino más bien entre las diferentes fechas de cosecha y entre las dos

diferentes técnicas de homogenización (homogenizador doméstico y de alta cizalla tipo Ultra Turrax).

1.8 Antecedentes de extracción de carotenoides usando aceites vegetales

Para efectos de este trabajo, se relaciona en la Tabla 1-4 una breve revisión de estudios de extracción de carotenoides de diferentes matrices alimentarias, empleando aceites vegetales como solventes, ya que este fue el tipo de solvente empleado en este trabajo de investigación.

Tabla 1-4: Estudios de extracción de carotenoides empleando aceites vegetales como solvente

Extracciones convencionales (técnicas no asistidas)					
Matriz	Compuesto(s) de interés	Solvente	Condiciones de proceso	Rendimiento	Referencia
Desechos de camarón	Astaxantina	Aceite de girasol	<p>Tiempo de extracción: 24 h Temperatura: 25°C, 45°C y 70°C Relación desechos-aceite: 1:3, 1:6, 1:9 Tamaño de partícula: 0.6 a 2.5 mm Velocidad de agitación: 120, 200 y 400rpm</p> <p><u>Mejores condiciones</u> Tiempo de extracción: 24 h Temperatura: 70°C Relación desechos-aceite: 1:6 Velocidad de agitación: 200rpm</p>	≈ 82% de astaxantina	(Razi et al., 2015)
Desechos de camarón rosado	Carotenoides	<p>Aceite de soya</p> <p>Aceite de girasol</p>	<p><u>Condiciones evaluadas</u> Tiempo de extracción: 2 h Temperatura: 20°C (Ambiente) Relación desechos-aceite: 1:4 Solventes: aceite de soya y aceite de girasol Mejor solvente: Aceite de soya</p>	<p>Aceite de soya: 6,7 µg de carotenoides/g de desechos de camarón</p> <p>Aceite de girasol: 5,18 µg de carotenoides/g de desechos de camarón</p>	(Mezzomo et al., 2011)

Tabla 1-4: Continuación

Extracciones convencionales (técnicas no asistidas)					
Matriz	Compuesto(s) de interés	Solvente	Condiciones de proceso	Rendimiento	Referencia
Desechos de camarón tigre	Astaxantina	Aceite de palma	Temperatura: 30°C a 90°C Malla tamiz: 40/60, 60/80 y 80/100 <u>Mejores condiciones</u> Temperatura: 30 a 70°C Malla tamiz: 80/100	131,743 µg de astaxantina /mL de aceite	(Handayani et al., 2008)
Extracción asistida por ultrasonido					
Matriz	Compuesto(s) de interés	Solvente	Condiciones de proceso	Rendimiento	Referencia
Ahuyama liofilizada (<i>Cucurbita máxima</i>)	Carotenoides	Aceite de maíz	Tiempo de extracción: 530 min Temperatura: 22°C Relación ahuyama-aceite: 1:10 Amplitud de ultrasonido: 20%	31,067± 2.45 µg /g de extracto oleoso	Sharma y Bhat, 2021
Zanahoria	Carotenoides	Aceite de girasol	Tiempo de extracción: 5, 20 y 35 min Temperatura: 20, 40 y 60°C Relación zanahoria-aceite: 1:10 a 3:10 Intensidad de ultrasonido: 9.5, 16 y 22.5W/cm ² <u>Mejores condiciones</u> Tiempos de extracción: 20 min Relación zanahoria-aceite: 2:10 Intensidad de ultrasonido: 22,5W/cm ² Temperatura: 40°C	334,75 mg B-caroteno/L de aceite de girasol	(Li et al., 2013)

2. Efectos del proceso de adecuación (secado con aire por convección y molienda) en el contenido de carotenoides totales de la ahuyama

2.1 Introducción

La ahuyama es una hortaliza de la familia de las plantas *Cucurbitaceae* y es cultivada en zonas de baja altitud entre 0 y 1800 msnm, en climas cálidos y con alta humedad (Velásquez y Carrillo, 2016). Es reconocido el aporte de compuestos bioactivos de la ahuyama a la dieta humana, donde se destaca el contenido de carotenoides, varios de ellos con actividad provitamina A como el β -caroteno que representa aproximadamente el 80% del contenido total de estos pigmentos, el α -caroteno y la luteína en menores proporciones (Priori et al., 2017). La especie de ahuyama *Cucurbita moschata* es considerada una buena fuente de carotenoides, los cuales pueden variar entre 490,1 y 1365,8 $\mu\text{g/g}$ (de Carvalho et al., 2012) y que se encuentran ubicados en mayor proporción en la pulpa de la ahuyama. Los carotenoides son compuestos hidrofóbicos y la ahuyama contiene una humedad de aproximadamente 92% (U.S.D.A, 2019), lo que resulta desfavorable para el acceso a estos compuestos de interés. Teniendo en cuenta esto, en este capítulo se hizo una caracterización fisicoquímica a fin de identificar las condiciones iniciales de la ahuyama empleada en este trabajo, como su estado de madurez y se describe el método de adecuación de la pulpa de ahuyama mediante operaciones de secado y molienda, evaluando el efecto de estas sobre el color y el contenido de carotenoides.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 Materiales

Se adquirieron 10 kg de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch) variedad mariquiteña provenientes del municipio de Mariquita del departamento de Tolima en la plaza de mercado de Corabastos en la ciudad de Bogotá, Colombia. Las muestras fueron adquiridas, de acuerdo con la información brindada por el proveedor como muestras en estado de madurez comercial, sin embargo, se realizó posteriormente una caracterización fisicoquímica.

Figura 2-1: Ahuyama *Cucurbita moschata* Duch variedad mariquiteña



El solvente empleado para extraer carotenoides de la ahuyama fresca, seca y molida para la cuantificación por espectrofotometría UV-Vis fue acetona de grado analítico (J. T. Baker, México). El patrón de cuantificación fue β -caroteno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.2.2 Caracterización fisicoquímica de la pulpa de ahuyama

- *Determinación de pH*

Se tomaron 3 ± 2 g de pulpa de ahuyama fresca y se midió el pH empleando un pH-metro Metrohm 827 (Metrohm, Suiza) siguiendo la metodología AOAC 981.12. (AOAC, 2012).

- *Determinación de sólidos solubles*

Se tomaron aproximadamente 2 ± 2 g de pulpa de ahuyama fresca y se midió directamente en el área de muestreo de un refractómetro Atago Pal-1 siguiendo la metodología establecida en la AOAC 942.15 (AOAC, 2012). Los resultados fueron expresados en ° Brix.

- Determinación de acidez

Se determinó la acidez titulable por titulación ácido-base con NaOH 0,1 N, siguiendo la metodología recomendada por la AOAC 942.15 (AOAC, 2012) . Se tomaron 3 g de pulpa de ahuyama fresca, se diluyeron en una relación 1:10 en agua destilada, se adicionaron 5 gotas de fenolftaleína, y se tituló hasta visualizar cambio de color y verificando que el pH estuviera en 8,2. Se registró el volumen de NaOH empleado. El cálculo de acidez se realizó mediante la ecuación 2-1:

$$\% \text{ Ácido málico} = \frac{V \times N \times m}{P} \times 100 \quad (2-1)$$

Siendo:

V: Volumen gastado de NaOH (mL)

N: Normalidad de NaOH

m: Miliequivalentes del ácido málico: 0,067

P: Peso de la muestra (g)

Los resultados se expresaron en % de ácido málico (p/v)

- Determinación de humedad

Para conocer la humedad de la ahuyama fresca y de la ahuyama seca después de las 7 horas de secado, se pesaron 5 ± 2 g de ahuyama que se secaron por convección a 105°C durante 18 horas en una estufa Memmert 500 (Memmert, Alemania). El porcentaje de humedad se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{(P_i - P_f)}{P_i} \times 100 \quad (2-2)$$

Siendo:

Pi: Peso inicial de la muestra

Pf. Peso final de la muestra

Los resultados se expresaron en % de humedad.

- *Determinación de actividad de agua*

Se tomaron 3 g de muestra y se introdujeron en un equipo medidor de actividad de agua LabMaster-aw neo (Novasina, Suiza) a una temperatura de 25°C. Se registró el valor obtenido.

- *Determinación del color de ahuyama*

Para la pulpa de ahuyama fresca se determinaron las coordenadas triestímulo del espacio CIELAB, donde L* equivale a la luminosidad, a* coordenada verde-rojo y b* coordenada azul-amarillo, empleando un colorímetro HunterLab Colorquest-Xe.

2.2.3 Adecuación del material vegetal

- *Secado*

La ahuyama fue pelada y empleando un procesador de vegetales CI Talsa (Colombia), la pulpa fue cortada en láminas de 1 mm de espesor que posteriormente fue empacada al vacío en paquetes de 3 kg y almacenados a -18 ± 2 °C.

Figura 2-2: Ahuyama *Cucurbita moschata* Duch variedad mariquiteña fresca cortada en láminas de 1 mm



Siguiendo lo reportado por Onwude, *et al.*, (2017) y Saxena, *et al.*, (2012) se definió como temperatura de secado de la ahuyama 58°C, y previo al proceso de secado las láminas de ahuyama se descongelaron en refrigeración (4 – 6°C) y se secaron a 58°C durante 7 horas

en un secador de bandejas marca Comek con aire caliente por convección a una velocidad de 1,5 m/s y una humedad relativa de 60 – 70%.

Figura 2-3: Ahuyama *Cucurbita moschata* Duch variedad mariquiteña en etapa de secado por convección a 58°C/7 h (a) y ahuyama resultante del secado (b)



- *Curva de secado*

En el proceso de secado se hizo un seguimiento por triplicado al peso de las bandejas con la ahuyama cada hora durante las 7 horas de secado a fin de observar la variación en la humedad y construir la cinética de secado en términos del contenido de agua en base seca, el cual se calculó empleando la ecuación 2-3:

$$\Psi = \frac{w - w_e}{w_0 - w_e} \quad (2-3)$$

Donde

Ψ : Contenido de humedad en base seca (adimensional)

w: Fracción contenido de agua en tiempo t (h)

w₀: Fracción de agua inicial (t=0)

w_e: Fracción de agua en equilibrio (t=12 h)

- *Cinética de degradación de CCT*

En cada hora de secado, se tomó por triplicado una muestra de ahuyama de 5 ± 2 g que posteriormente fue liofilizada (-50 °C en el condensador, 30 °C en la cámara de calentamiento, 1 mbar, 48 h). A cada una de estas muestras se le midió el CCT siguiendo

la metodología descrita en el #2.2.4 y a partir de estos datos se construyó la cinética de degradación de carotenoides.

- *Molienda y caracterización granulométrica*

Las láminas de ahuyama secas posteriormente se molieron en un molino de martillos (Allen Bradley, EE.UU) y luego pasaron a un proceso de tamizaje, donde se pesaron 200 g de la harina de ahuyama y se dispusieron en un tamizador (Tyler, EE.UU.). En un juego de tamices se mantuvo en agitación la harina durante 10 minutos; posteriormente se pesaron las fracciones de harina retenidas en cada tamiz y se calculó el porcentaje de retención. Este procedimiento fue repetido cinco veces. Se escogieron para las etapas de proceso posteriores las fracciones superiores a 150 μm dado que estas presentaban coloraciones más naranjas, lo que se relaciona con un mayor CCT.

2.2.4 Determinación de CCT por espectrofotometría UV-Vis

Se empleó un espectrofotómetro UV/VIS Jasco V-730 a una longitud de onda de 450 nm. Para la determinación de carotenoides en ahuyama seca y molida, se siguió la metodología de de Carvalho et al., (2012). Se tomaron 100 mg de ahuyama liofilizada y los carotenoides fueron extraídos con adiciones sucesivas de acetona hasta decoloración total de la muestra. Este extracto fue llevado a balones de 25 mL, se aforaron con acetona para transferirse posteriormente a celdas de cuarzo y medir su absorbancia.

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva de calibración elaborada con solución de 200 ppm de β -caroteno en acetona. Para la elaboración de la curva de calibración se midió la absorbancia de soluciones 0,5 ppm, 1,5 ppm, 2,5 ppm, 3,5 ppm y 4,5 ppm empleando acetona como solvente. Con la determinación de la ecuación de la recta se halló la concentración de carotenoides totales, cuya concentración se expresó en $\left(\frac{\text{mg } \beta \text{ caroteno}}{\text{kg extracto}}\right)$.

2.2.5 Determinación del color de ahuyama seca y seca molida

Para la ahuyama seca y molida, se determinaron las coordenadas triestímulo del espacio CIELAB, donde L^* equivale a la luminosidad, a^* coordenada verde-rojo y b^* coordenada azul-amarillo, empleando un colorímetro HunterLab Colorquest-Xe.

2.2.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el programa Microsoft Excel® en el que se realizó la estadística descriptiva, análisis de varianza ANOVA y la prueba t de Student para identificar con un nivel de significancia del 95% las diferencias de humedad y CCT en la ahuyama en las diferentes horas de secado y en el color luego de llevar a cabo el secado y la molienda. Los diferentes análisis se realizaron por triplicado.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de la pulpa de la ahuyama fresca se realizó con el fin de conocer sus condiciones iniciales previas al procesamiento y asegurar que el estado de madurez fuera adecuado para asegurar un óptimo contenido de carotenoides.

En esta etapa se realizaron tres mediciones por triplicado de pruebas fisicoquímicas a la pulpa de ahuyama previamente homogeneizada, donde se evaluó el contenido de sólidos solubles, acidez, pH, actividad de agua, contenido de humedad y color. Estos resultados se encuentran en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1: Caracterización fisicoquímica de pulpa de ahuyama *Cucurbita moschata* Duch variedad mariquiteña empleada en el estudio.

	Propiedad	Resultado
Propiedades físicas	Sólidos solubles (°Brix)	5,80 ± 0,06
	pH	6,82 ± 0,04
	Acidez (% Ácido málico (p/v))	0,051 ± 0,010
	Aw	0,964 ± 0,005
	Humedad	91,18 ± 0,09
Parámetros de color	L*	55,4 ± 0,4
	a*	32,3 ± 0,5
	b*	49,0 ± 2,7
Propiedades químicas	CCT (µg β caroteno _{eq} /g ahuyama b.s.*)	3889,37 ± 208,54

*b.s.: Base seca; CCT: Contenido de carotenoides totales

Los resultados obtenidos son similares a los reportados en el estudio de Jacobo-Valenzuela et al., (2011) quienes caracterizaron las propiedades fisicoquímicas de la ahuyama *C. moschata*, encontrando un pH de 6,77, acidez de 0,042% de ácido málico, sólidos solubles entre 1 y 15 °Brix y en cuanto a parámetros de color, estos estuvieron en un rango de 45,44 a 100 para L*, de -13,41 a 35,41 para a* y de -12,65 a 60 para b*. También Quintana et al. (2018) determinaron las propiedades químicas y fisicoquímicas de la pulpa de la ahuyama *C. moschata*, encontrando valores de pH de 6,84, de sólidos solubles de 5,01 °Brix y humedad del 85,34% en ahuyamas maduras, valores comparables con los obtenidos en este trabajo. También Quijano (2020) reportó para pulpa de ahuyama *Cucurbita moschata* Duch variedad mariquiteña un CCT de 1203,1 $\mu\text{g } \beta \text{ caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama (base seca), un pH de 6,554, un 0,067% de ácido málico y sólidos solubles de 5,206 °Brix, valores que, a excepción del CCT, fueron muy similares a los obtenidos en este trabajo. Para el desarrollo de este estudio se estableció como parámetro que las ahuyamas empleadas estuvieran en estado de madurez comercial, a fin de contar con el mayor CCT posible. Si bien no existen para estas hortalizas valores estándar de índice de madurez, como para otros frutos, fue posible corroborar que los frutos se encontraban en su estado de madurez comercial al comparar los valores obtenidos de pH, acidez y color con los estudios previamente citados, adicional a que en el momento de adquirirlos se tuvieron en cuenta aspectos como que la corteza fuera dura, que fuera resistente a los pinchazos y que tuviera sonido hueco al golpear con los dedos, teniendo en cuenta que Kristianto et al., (2021) reporta estos aspectos como importantes al momento de buscar ahuyamas maduras.

2.3.2 Cinética de secado

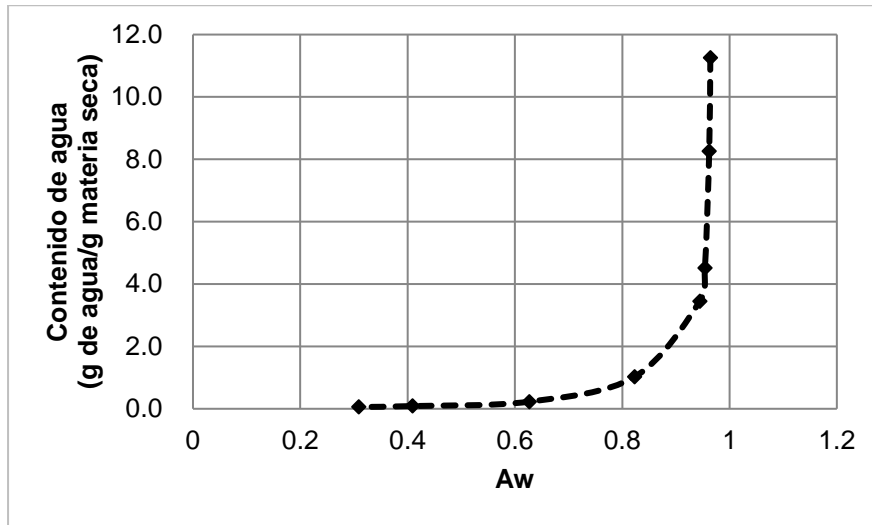
El secado de las láminas de ahuyama se planteó como alternativa para reducir el alto contenido de agua del material vegetal, que representa una barrera para el acceso a los carotenoides al ser estos compuestos hidrofóbicos; adicionalmente estos se encuentran asociados a otras macromoléculas como proteínas y ácidos grasos, que pueden dificultar la transferencia de los carotenoides al solvente durante las extracciones, por lo que métodos físicos como el secado resultan útiles para facilitar dicha extracción (Saini y Keum, 2018).

Para llevar a cabo este secado se empleó un secador con aire caliente por convección en el que se secaron lotes de 3 kg de láminas de ahuyama fresca de 1 mm de espesor. Se plantearon como parámetros de trabajo una temperatura de 58°C y una actividad de agua igual o menor a 0,3 en el producto seco, ya que en esta condición se asegura su estabilidad oxidativa y microbiológica (Barreiro y Sandoval, 2002). Para calcular el tiempo de secado en el cual se alcanzaba la Aw esperada se llevaron a cabo ensayos de secado de ahuyama a 58°C, donde se hizo seguimiento cada hora al peso de las bandejas y a la actividad de agua de la ahuyama. En la Tabla 2-2 se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos y en la Figura 2-4 la correspondiente isoterma de desorción.

Tabla 2-2: Variación de la humedad y actividad de agua en el secado por convección de aire forzado de ahuyama en láminas de 1 mm de espesor a 58°C durante 7 horas

Tiempo (h)	Aw promedio	g agua/ g mat. seca	Humedad promedio (%)
0	0,964 ± 0,005 ^h	11,252 ± 1,144 ^g	91,79 ± 0,80 ^h
1	0,962 ± 0,011 ^{fgh}	8,263 ± 0,706 ^f	89,16 ± 0,81 ^g
2	0,954 ± 0,006 ^{defh}	4,518 ± 0,315 ^e	81,84 ± 1,05 ^f
3	0,944 ± 0,008 ^{defg}	3,448 ± 0,569 ^d	77,28 ± 2,71 ^e
4	0,823 ± 0,085 ^d	1,023 ± 0,168 ^c	50,34 ± 4,22 ^d
5	0,627 ± 0,029 ^c	0,229 ± 0,041 ^b	18,54 ± 2,68 ^c
6	0,409 ± 0,030 ^b	0,087 ± 0,018 ^a	8,00 ± 1,49 ^b
7	0,309 ± 0,024 ^a	0,059 ± 0,003 ^a	5,53 ± 0,28 ^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

Figura 2-4: Isotherma de desorción para el secado de ahuyama a 58°C durante 7 horas

De esta manera, se obtuvo que el tiempo de secado de 7 horas con la configuración empleada permitió alcanzar una $A_w \leq 0,3$ y por lo tanto el tiempo que se estableció como tiempo de secado para los propósitos del presente estudio.

Con el fin de modelar la cinética del proceso de secado se llevaron a cabo experimentos de secado durante tiempos mayores hasta alcanzar el equilibrio aparente, es decir, luego del cual no se observó más variación en el peso, que fue de 12 horas. Cada hora se hizo seguimiento al peso en las bandejas con la ahuyama, valores que permitieron modelar la cinética de secado, en términos del contenido de agua en base seca, el cual se calculó empleando la ecuación 2-4:

$$\Psi = \frac{w - w_e}{w_0 - w_e} \quad (2-4)$$

Donde

Ψ : Contenido de humedad en base seca (adimensional)

w: Fracción contenido de agua en tiempo t (h)

w₀: Fracción de agua inicial (t=0)

w_e: Fracción de agua en equilibrio (t=12 h)

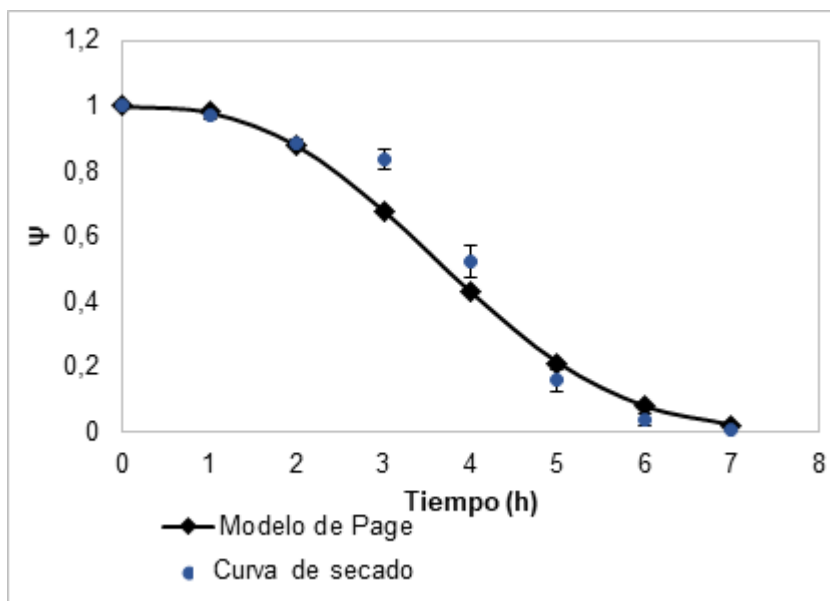
Para modelar el proceso de secado de la ahuyama se empleó el modelo semi-empírico de Page (2-5):

$$\psi = e^{-kt^n} \quad (2-5)$$

Donde k y n corresponden a parámetros del modelo y t es el tiempo (horas).

En la Figura 2-5 se observa la cinética de secado de ahuyama y el correspondiente modelo de Page.

Figura 2-5: Modelo de Page aplicado a la cinética de secado de ahuyama a 58°C/7 horas. Los círculos azules corresponden a los valores experimentales y los rombos negros a los valores modelados.



Los valores que describen el modelo de Page para el proceso de secado se observan en la Tabla 2-3.

Tabla 2-3: Parámetros del modelo de Page calculados para el secado de ahuyama a 58°C durante 7 horas

k	n	R ²	Error medio (%)
0,0198	2,7068	0,955	16,4

En la Figura 2-5 se observan a partir de la primera hora de secado diferencias significativas en el contenido de humedad de la ahuyama, teniendo en cuenta que en la etapa inicial el secado es más rápido, y a partir de la cuarta hora la humedad tuvo tendencia a estabilizarse y a no presentar mayor variación.

El modelo de Page es una de las ecuaciones más empleadas para modelar las cinéticas de secado de frutas y hortalizas, donde los parámetros k y n no tienen un significado físico, pero son directamente proporcionales a la velocidad del secado (García-Pacheco et al., 2016; Simal et al., 2005). En el secado de la ahuyama de este trabajo se observó un buen ajuste con el modelo de Page, como lo reportan Guiné et al. (2011) quienes hicieron un estudio del secado por convección de ahuyama en cortes cilíndricos a temperaturas ubicadas entre 30 y 70°C, encontrando que los modelos que mejor representaban su estudio fueron el modelo de Page y Page modificado, con un R^2 de 0,9519 y 0,9984, respectivamente. Si bien la ecuación logró modelar el comportamiento general del secado de la ahuyama en tajadas de 1 mm de espesor, así como el contenido de humedad final del producto, lo cual se vio reflejado en el valor de R^2 (0,95), se observó una desviación clara en el contenido de humedad en tiempos intermedios, correspondientes a la segunda etapa del proceso (3-4 h). De hecho, el comportamiento observado experimentalmente de los valores reales de Ψ entre las 2 y 3 h podría considerarse inusual (hubo un leve aumento en el valor de la pendiente de la curva de secado en una etapa en la cual se tiende a observar una disminución de la misma) lo cual pudo deberse a cambios en la humedad relativa del aire durante el proceso de secado, variable que no fue posible controlar en la configuración del secador de bandejas empleado en los experimentos. Sin embargo, se requerirían más experimentos para profundizar esta desviación del modelo matemático.

El tiempo de secado necesario para alcanzar una humedad de $5,53 \pm 0,28\%$ fue comparable con el tiempo obtenido por Seremet et al. (2016), quienes evaluaron el efecto de diferentes métodos de secado en la relación de humedad y rehidratación en rodajas de ahuyama, evidenciando que al secar por convección a 50, 60 y 70°C, los tiempos de secado fueron 9, 7 y 5,5 horas para alcanzar una humedad de 8,4%. Cabe anotar que el tiempo de secado también se ve afectado por el espesor del producto, ya que al ser mayor el espesor, el tiempo de secado será mayor (Onwude et al., 2016); en el secado desarrollado en este trabajo fue una ventaja trabajar con un espesor de 1 mm para las tajadas de ahuyama que en 7 horas alcanzaron una humedad del 5,5%; pues al haber empleado un espesor mayor, el tiempo de secado y posiblemente la degradación de los carotenoides, habría sido mayor. Esto se evidenció en el trabajo de García-Pacheco et al., (2016) que requirieron 11 horas de secado para ahuyama en cubos de 2 cm de espesor a 65°C, obteniendo 71% de pérdidas de carotenoides, es decir superiores a las obtenidas en este trabajo.

En la Tabla 2-4 se observa la variación en el contenido de carotenoides durante el tiempo de secado de la ahuyama a 58°C durante 7 horas. En la Figura 2-6 se muestra la correspondiente cinética. Previo al secado, el contenido inicial de carotenoides totales de la ahuyama fresca fue de $3949,83 \pm 145,88 \mu\text{g } \beta \text{ caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama b.s. y al finalizar el secado el contenido de estos se redujo a $1537,07 \pm 12,38 \mu\text{g } \beta \text{ caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama b.s., lo que representa una reducción total del 61%.

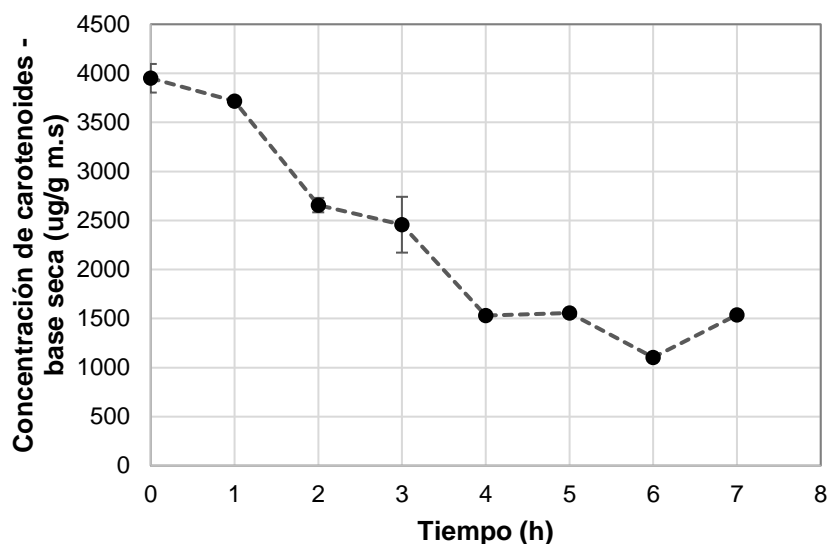
Tabla 2-4: Contenido de carotenoides totales de ahuyama durante el proceso de secado a 58°C/7 horas

Tiempo (h)	CCT ($\mu\text{g } \beta \text{ caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama b.s.)
0 (Ahuyama fresca)	$3949,83 \pm 25,36^{\text{h}}$
1	$3715,46 \pm 6,53^{\text{g}}$
2	$2656,42 \pm 73,44^{\text{f}}$
3	$2456,62 \pm 28,27^{\text{e}}$
4	$1529,26 \pm 25,06^{\text{b}}$
5	$1556,75 \pm 6,97^{\text{c}}$
6	$1104,33 \pm 9,81^{\text{a}}$
7	$1537,07 \pm 12,38^{\text{d}}$

*b.s.: Base seca; *CCT: Contenido de carotenoides totales

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

Figura 2-6: Cinética de degradación de carotenoides durante el proceso de secado de ahuyama a 58°C/7 horas



Esta disminución en el contenido de carotenoides es atribuible a que estos son compuestos sensibles a la luz y al calor, factores que generan la oxidación y posterior isomerización, llevando a su degradación, lo que se ve reflejado visualmente en el color del alimento. Los carotenoides son propensos a la isomerización debido a la presencia de dobles enlaces conjugados carbono-carbono en su cadena (Albanese, et al., 2014). Regularmente, los enlaces dobles conjugados de los carotenoides son *trans*, pero al ser sometidos a condiciones de calentamiento o exposición a luz UV, estos se isomerizan en carotenoides *cis*, llevando a la pérdida de color y a que los carotenoides precursores de provitamina A (como el β -caroteno y α -caroteno) disminuyan su actividad. Los isómeros *cis* formados en la isomerización del β -caroteno son 13-*cis* y 9-*cis*. Por otro lado, la oxidación es otro factor de degradación de los carotenoides que ocurre cuando el sistema de dobles enlaces conjugados de los carotenoides absorbe los radicales libres con el fin de proteger al sistema fotosintético del daño causado por las especies oxigenadas. La pérdida de agua en los procesos de secado ha mostrado ser un componente de riesgo para los carotenoides por la generación de radicales libres (Bechoff, 2010).

El tiempo medio de degradación de carotenoides ($t_{1/2}$), es decir el tiempo en el cual se reduce el 50% del contenido inicial de carotenoides fue de 4 horas, y fue calculado a través de la ecuación 2-6:

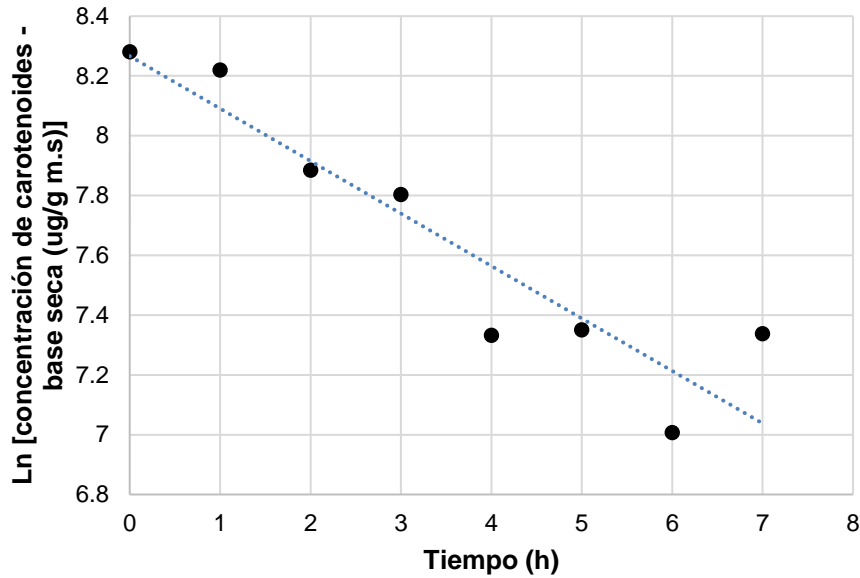
$$t_{1/2} = -\ln(0,5)k^{-1} \quad (2-6)$$

Saxena et al. (2012) reportaron en su estudio una descomposición del contenido inicial de carotenoides del 73,1% generado por el secado con aire caliente a una temperatura de 50°C y del 85,2% a una temperatura de 60°C en jaca; también determinaron un tiempo medio de degradación de carotenoides de 5 horas para el secado a 50°C y de 3 horas para el secado a 60°C, es decir, valores mayores de degradación de carotenoides como efecto del tratamiento de secado por convección. El tiempo de vida medio permite describir la rapidez con la que una reacción ocurre, indicando que una reacción rápida tiene un tiempo de vida medio breve (Brown et al., 2009); en el caso de la degradación de los carotenoides conviene que este tiempo idealmente sea lo más largo posible para reducir las pérdidas de estos compuestos. Es posible notar mediante la ecuación 2-6 que $t_{1/2}$ está afectado por la constante k y su relación es inversa.

En la Figura 2-7 se muestra el modelo que siguió la cinética de degradación de la ahuyama durante el secado a 58°C durante 7 horas. El coeficiente de correlación lineal (R^2) fue de 0,8558, lo que confirma que la cinética de degradación de los carotenoides totales es de primer orden. El modelo representado corresponde a la ecuación 2-7.

$$\ln [\text{concentración de carotenoides}] = -0,1742 * \text{Tiempo} + 8,2421 \quad (2-7)$$

Figura 2-7: Cinética de degradación de carotenoides durante el secado de ahuyama a 58°C/7 horas. Los puntos negros corresponden a los valores experimentales y la recta azul a los valores modelados.



Previos estudios también han reportado cinéticas de primer orden para la degradación de carotenoides, como el realizado por Demiray et al., (2013) que estudiaron la degradación de licopeno y β -caroteno en tomates durante el secado con aire caliente. También Saxena et al., (2012) reportaron una ecuación de primer orden en la degradación de los carotenoides en pulpa de jaca durante el proceso de secado empleando aire caliente.

Posterior al secado, la ahuyama fue molida y se determinó su CCT con el fin de identificar si la operación requerida para reducir el tamaño tenía un efecto sobre la concentración de dichos compuestos. El contenido de carotenoides totales posterior a la molienda fue $1540,15 \pm 12,03 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama b.s., evidenciando que no hubo una disminución significativa ($p \leq 0,05$), por lo que no se atribuye a la molienda un efecto representativo sobre el contenido de carotenoides totales.

Al realizar la molienda, se hizo una caracterización granulométrica de la harina de ahuyama para determinar el rango de su tamaño de partícula. En la Tabla 2-5 se muestra el detalle de las fracciones retenidas en los diferentes tamices.

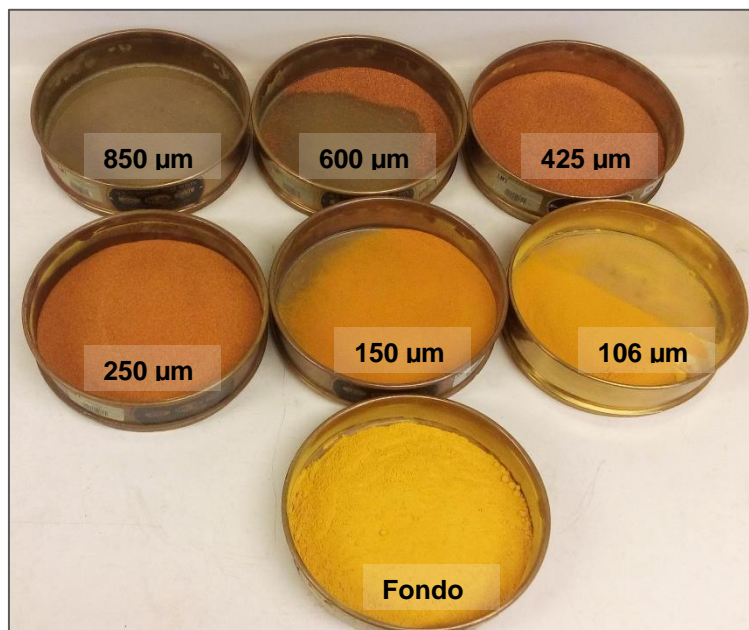
Tabla 2-5: Porcentajes de retención en tamizaje de harina de ahuyama

No. de tamiz	Tamaño de partícula (μm)	Cantidad retenida (%)
20	850	0,0
30	600	3,5

40	425	25
60	250	46
100	150	10
140	106	6
Fondo	--	10,5

Se observó que la harina de ahuyama fue retenida desde el tamiz 30 hasta el 140, permitiendo inferir que el rango de tamaño de partícula se encuentra entre 106 y 600 μm . El 46% de la harina de ahuyama se retuvo en el tamiz 60 con tamaño de partícula de 250 μm , mientras que el 25 % de esta se retuvo en el tamiz 40 que corresponde a un tamaño de 425 μm . Se escogieron las fracciones de tamaño igual y superior a 150 μm ya que estas presentaban las coloraciones naranja más intensas, como se muestra en la figura 2-8.

Figura 2-8: Distribución de harina de ahuyama por tamaño de partícula



2.3.3 Evaluación del color

En la Figura 2-9 se muestra el efecto causado por el secado y posterior molienda sobre el color de la ahuyama. Se observa que por efecto del secado la ahuyama toma una coloración más rojiza y opaca, mientras que por efecto de la molienda el color se torna más amarillo y claro. Este efecto se atribuye al cambio en la granulometría y no a una posible pérdida de carotenoides generado por la molienda, ya que no hubo variación por efecto de esta operación en el CCT.

Figura 2-9: Comparación de color en ahuyama fresca, seca y seca molida



En la Tabla 2-6 se muestran los parámetros de color en el espacio CIEL*a*b* para la ahuyama fresca, seca y molida.

Tabla 2-6: Parámetros de color CIEL*a*b* de la ahuyama fresca, seca y seca molida

Ahuyama	L*	a*	b*	Croma	Tono (°)
Fresca	55,4 ± 0,4 ^a	32,3 ± 0,5 ^c	49,0 ± 2,6 ^c	58,7 ± 2,5 ^c	56,6 ± 1,1 ^b
Seca (58°C/7h)	55,1 ± 1,1 ^a	19,4 ± 0,4 ^b	25,3 ± 1,6 ^a	31,9 ± 1,6 ^a	52,5 ± 1,2 ^a
Seca molida	68,6 ± 0,4 ^b	15,6 ± 0,3 ^a	38,1 ± 0,4 ^b	41,2 ± 0,5 ^b	67,7 ± 0,2 ^c

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

Al observar los valores de la coordenada de luminosidad (L*) se evidencia que no hubo diferencia significativa entre la ahuyama fresca y la ahuyama seca, mientras que sí se presentó una diferencia significativa entre la ahuyama fresca y la molida, así como también

la hubo entre la ahuyama seca y la molida, mostrando que el proceso de molienda da una apariencia más “clara”.

En la coordenada a^* , que permite medir qué tan verde (-a) o rojizo (a+) es una muestra, se observa que la ahuyama más “rojiza” fue la fresca, seguida de la ahuyama seca y la ahuyama molida, evidenciando que el secado y la molienda redujeron la coloración rojiza de la ahuyama.

En relación con los valores de la coordenada b^* , que mide qué tan azul (b-) o amarillo (b+) es un alimento, se puede ver que hubo una disminución significativa en el color amarillo de la ahuyama fresca al realizar el secado y un posterior incremento al realizar la molienda.

En su trabajo, Saxena et al. (2012) afirman que el incremento en el tiempo y temperatura de secado lleva a la pérdida de color amarillo, generando pardeamiento, que puede ser debido a la autooxidación de carotenoides responsables del color rojo. También puede disminuir el valor de la coordenada b^* en razón a la oxidación de carotenoides predominantes como el β -caroteno y la luteína; esto también puede llevar a la formación de pigmentos cafés como quinonas y melaninas.

La disminución en las coordenadas a^* y b^* en general se encuentra directamente relacionada con la degradación de carotenoides, como se observó en la cinética de degradación de carotenoides durante el proceso de secado (Figura 2-6). Onwude et al. (2016) encontraron que los contenidos de carotenoides son más bajos para las muestras que se han secado entre 50 y 70°C, lo que puede explicarse por el hecho de que se necesita un tiempo de secado más largo, aumentando la exposición a la luz y al calor y por ende incrementando la velocidad de oxidación y degradación de carotenoides.

Por otro lado, el croma y el tono, que combinan las coordenadas a^* y b^* , permiten visualizar la saturación y matiz de los colores en un alimento, respectivamente. El croma se expresa en una escala de 0 a 100 y describe el grado o intensidad con la que un color se separa del gris neutro y se acerca a un color puro del espectro; el tono permite clasificar en color rojo, amarillo, verde o azul y corresponde a un ángulo, por lo que se expresa en ° y se encuentra en una escala de 0 a 360. De acuerdo con la Tabla 2-6, se puede observar en los valores del croma que, en relación con la ahuyama fresca, la ahuyama seca y la ahuyama molida (harina) pierden la viveza en su color con el procesamiento; en la tonalidad se observa que, comparando con la ahuyama fresca, la ahuyama molida mostró

el mayor efecto, aumentando el ángulo, tomando una coloración más amarilla y alejándose de la rojiza. Si bien los cambios, en particular la disminución de a^* entre la ahuyama fresca y deshidratada es atribuible a la disminución del contenido de carotenoides, los cambios en la coloración entre la ahuyama deshidratada y la harina no corresponden a una degradación de estos compuestos a causa de la molienda, de acuerdo con los resultados de la cuantificación de carotenoides totales y por lo tanto estarían más relacionados con cambios en la interacción de la luz con el material, a causa de los cambios en la granulometría.

Tabla 2-7: Diferencias de color entre la ahuyama fresca, seca y molida

Efecto	ΔE
Ahuyama fresca respecto a ahuyama seca (58°C/7h)	26,96 ± 4,09 ^b
Ahuyama fresca respecto a ahuyama molida	23,88 ± 1,77 ^b
Ahuyama seca (58°C/7h) respecto a ahuyama molida	19,00 ± 1,78 ^a

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

El ΔE hace referencia a la variación total del color y combina los parámetros L^* , a^* y b^* . Kim et al., (2002) afirman que valores de ΔE superiores a 3 son variaciones de color perceptibles visualmente. En los valores de la Tabla 2-7 se observan valores superiores a 3 en la ahuyama fresca comparada con la ahuyama seca, en la ahuyama fresca comparada con la ahuyama molida y en la ahuyama seca comparada con la ahuyama molida, lo que indica que el procesamiento de la ahuyama tuvo un efecto visualmente evidente en su color, lo cual se puede relacionar con la degradación de carotenoides observada previamente por efecto del secado, que de acuerdo con el ΔE tuvo el mayor valor, es decir, el secado fue el proceso que más afectó el color de la ahuyama.

2.4 Conclusiones parciales

La caracterización fisicoquímica realizada a la pulpa de ahuyama permitió identificar que esta tenía un pH de $6,82 \pm 0,04$, una acidez de $0,051\% \pm 0,010$ de ácido málico y una concentración de sólidos solubles de $5,8 \pm 0,06^\circ\text{Brix}$, valores comparables con diferentes reportes bibliográficos. Si bien no existen unos criterios definidos sobre los estados de

madurez de la ahuyama, mediante la selección visual al momento de adquirir la materia prima y los resultados obtenidos, se evidenció que la ahuyama se encontraba en el estado deseable de consumo en Colombia, es decir lo que se podría considerar “maduro”. El estado de madurez es una variable crítica en el CCT dado que en el avance de la madurez se van desarrollando más carotenoides hasta llegar al estado de la senescencia, momento en el cual los carotenoides comienzan su degradación.

El secado de la ahuyama a 58°C durante 7 horas permitió obtener un producto con una humedad final del $5,53 \pm 0,28\%$ y una actividad de agua de $0,309 \pm 0,024$, valores que brindaron una mayor estabilidad oxidativa y microbiológica al material vegetal, y que, al tener menor contenido de agua, facilitaría el acceso a los compuestos de interés: los carotenoides. La cinética de secado mostró un ajuste adecuado al modelo de Page con un R^2 : 0,955, un k de 0,0198 y un n de 2,7068.

Con respecto al CCT, se identificó que la ahuyama fresca liofilizada tenía una concentración de $3949 \pm 25 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama (b.s.) y la ahuyama seca y molida una concentración de $1537 \pm 12 \mu\text{g } \beta\text{-caroteno}_{\text{eq}}/\text{g}$ ahuyama (b.s.), lo que representó una disminución del 61% en el CCT por efecto del secado principalmente, ya que la molienda no mostró un efecto significativo sobre este. Este comportamiento se puede atribuir principalmente a procesos de oxidación y posterior isomerización de los cuales son susceptibles los carotenoides y que son causados por la exposición al oxígeno y al calor. El comportamiento de los carotenoides durante el secado fue descrito adecuadamente mediante un modelo cinético de primer orden con un R^2 de 0,8558.

En referencia al efecto del secado y la molienda sobre el color, se obtuvo que los valores de croma oscilaron entre 31,9 y 58,7 mostrando diferencias significativas en la saturación, con un valor más alto (saturado) para la ahuyama fresca y que se vio disminuido por el secado y la molienda. Se evidenció a su vez, que el tono varió entre 52 y 67, correspondiente a colores naranja-amarillo, siendo más naranja la ahuyama fresca y la más tendiente al amarillo la ahuyama seca molida. Los cambios dados por el secado son atribuibles a la disminución del CCT, mientras que la diferencia de color en la harina (ahuyama deshidrata y molida) respecto al producto deshidratado se deben a los cambios en la granulometría.

3. Extracción de carotenoides

3.1 Introducción

El uso de carotenoides de fuentes naturales como colorantes es de gran interés en la industria de alimentos, en parte debido a que se ha evidenciado que los colorantes sintéticos, derivados de síntesis orgánica o inorgánica, podrían tener efectos adversos en la salud (Carocho et al., 2014). El mercado de los colorantes naturales ha sido valorado en unos USD 1,3 billones en 2016 y se espera que registren una tasa de crecimiento anual de 7,8% durante el período de 2016 a 2023. Además, se estima que para el año 2023 este mercado acumulará USD 2,1 mil millones en razón a su creciente demanda en las industrias alimentarias y a la rápida expansión del sector de alimentos y bebidas en todo el mundo (Research Nester, 2015).

Los carotenoides se han obtenido convencionalmente por extracción empleando solventes orgánicos como acetona, éter de petróleo, cloroformo, hexano, isopropanol, entre otros, los cuales tienen, en su mayoría, un efecto negativo a nivel ambiental y pueden ser dañinos para la salud humana si no tienen un manejo y recolección adecuada; adicionalmente pueden ser riesgo de contaminación de los extractos de interés por la presencia de trazas (Portillo-López et al., 2021). En cuanto al proceso de extracción, usualmente se realiza mediante extracción de tipo Soxhlet, que permite obtener una alta recuperación de carotenoides, pero que emplea gran cantidad de solventes, requiere altas temperaturas y tiempos largos de proceso, lo que se ve representado en un alto impacto ambiental y económico (Saini y Keum, 2018)

Con el objetivo de evaluar solventes y técnicas de extracción más sostenibles y con viabilidad industrial, en este capítulo se muestra la metodología y resultados de la

extracción de carotenoides de ahuyama empleando aceite de girasol como solvente para extracción convencional sólido-líquido y asistida por ultrasonido, evaluando el CCT, color y perfil de carotenoides. Así mismo, se hizo un ensayo de extracción sucesiva empleando las dos técnicas evaluadas y comparando los resultados obtenidos con los de las primeras extracciones.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

100 kg de ahuyama (*Cucurbita moschata* Duch) variedad mariquiteña provenientes del municipio de Mariquita del departamento de Tolima fueron sometidas a un proceso de deshidratación en un horno por convección con aire forzado a 58°C durante 7 horas hasta lograr una humedad del $5,5 \pm 0,3$; esta posteriormente fue molida en un molino de martillos Allen Bradley (E.U.A.). Del polvo de ahuyama obtenido se escogió la fracción cuyo tamaño de partícula fuera igual o superior a 150 μm , dado que tenía una apariencia más naranja, lo que permitía inferir un mayor CCT.

Este polvo de ahuyama fue empleado como insumo de procesos de extracción de carotenoides para comparar dos tecnologías: agitación magnética (convencional o CNV) y extracción asistida por ultrasonido (US) empleando como solvente de extracción aceite de girasol (Premier, Colombia). Estas dos técnicas fueron evaluadas en su CCT, color y estabilidad oxidativa.

El CCT del polvo de ahuyama se consideró como el contenido de carotenoides inicial y a partir del cual se calculó la eficiencia de extracción de las técnicas CNV y US, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia de extracción} = \frac{\text{CCT obtenido}}{\text{CCT ahuyama en polvo}} \times 100 \quad (3-1)$$

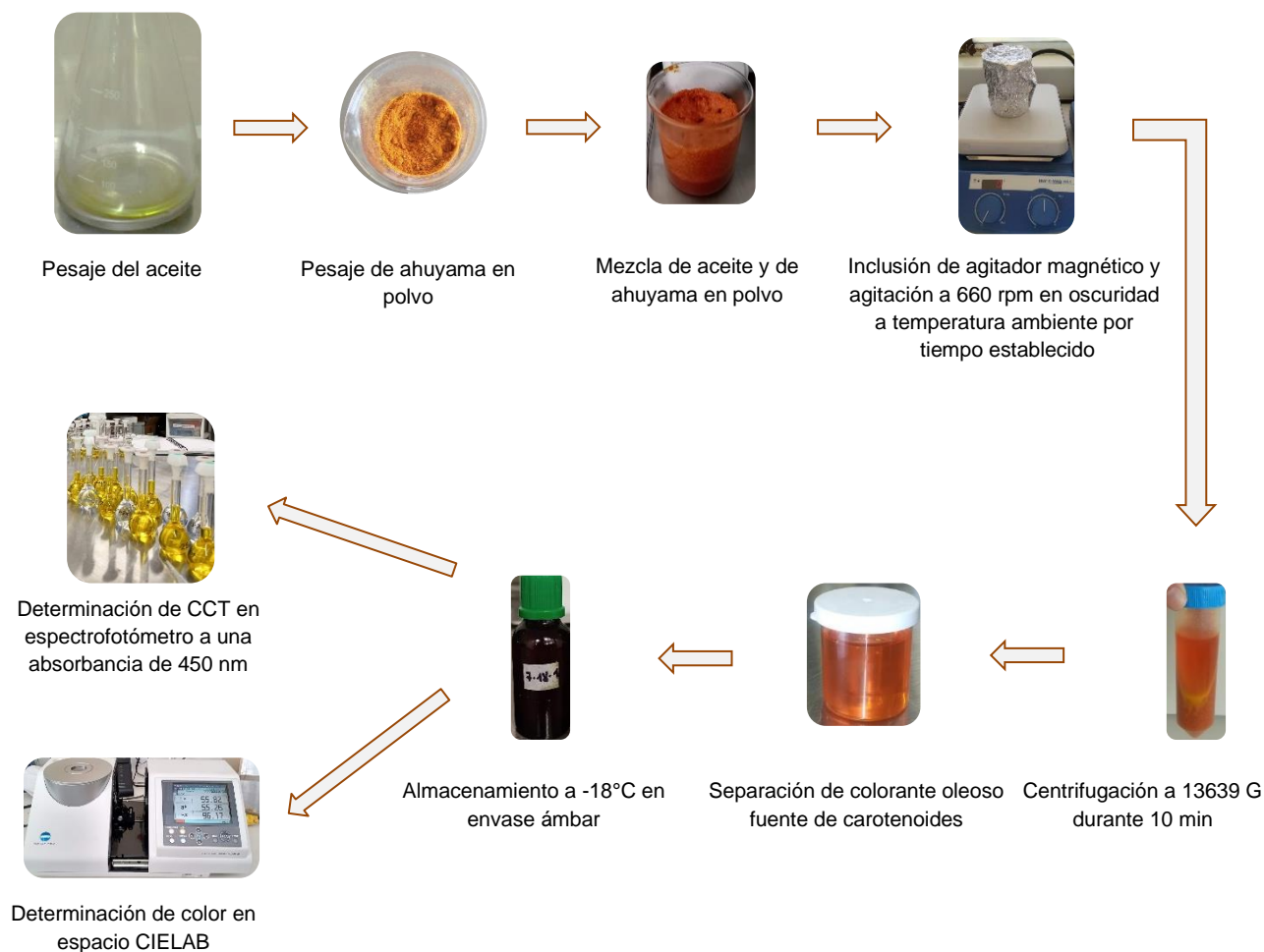
El reactivo empleado para extraer y cuantificar carotenoides del extracto oleoso por espectrofotometría UV-Vis fue acetona 9006-03 (J. T. Baker, México). El patrón de cuantificación fue β -caroteno al 93% de pureza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los reactivos empleados para los análisis de estabilidad oxidativa fueron isooctano, cloroformo, ácido acético glacial, yoduro de potasio, tiosulfato de sodio y p-anisidina (J. T. Baker, México).

Los reactivos empleados para la determinación de carotenoides específicos mediante HPLC fueron luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, violaxantina, equinenona (estándar interno), α -caroteno y β -caroteno, suministrados por Hoffmann-La Roche (Basel, Suiza). La anteraxantina fue facilitada por CaroteNature (Münsingen, Suiza). El metanol, etanol, tetrahidrofurano (THF) y KOH fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, E.E.U.U). El agua fue adquirida a través de un aparato Milli-Q (Millipore, Milford, MA, E.E.U.U).

3.2.2 Extracción convencional de carotenoides (CNV)

Se evaluaron tres diferentes relaciones matriz (ahuyama) – mezcla: 40, 50 y 60% (g de ahuyama por 100 g de mezcla de extracción). Para preparar la mezcla de extracción, inicialmente se pesó el aceite y luego el polvo de ahuyama en vasos de vidrio de 250 mL, se agitó la mezcla manualmente empleando una espátula y se introdujo un agitador magnético. Posteriormente se ubicó el vaso de precipitado en una plancha de agitación IKA C-MAG HS 7 (IKA, Alemania), se ubicó el mando de velocidad en 3 (aproximadamente 660 rpm) y se aseguró que el mando de temperatura estuviera en 0 (sin calentamiento); luego de esto se revisó que hubiera un movimiento uniforme de todo el material contenido en el vaso de precipitado, se cubrió con papel aluminio y se monitoreó el tiempo de extracción, evaluando cuatro diferentes tiempos: 4, 8, 24 y 72 horas. Pasado este tiempo se transfirió la mezcla a tubos Falcon, se centrifugó en una centrífuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 10 minutos a 13639 gravedades. Finalmente se transfirió el sobrenadante clarificado (extracto enriquecido en carotenoides) a botellas ámbar y se almacenó en congelación a una temperatura de -18°C .

Figura 3-1: Diagrama de proceso de extracción convencional

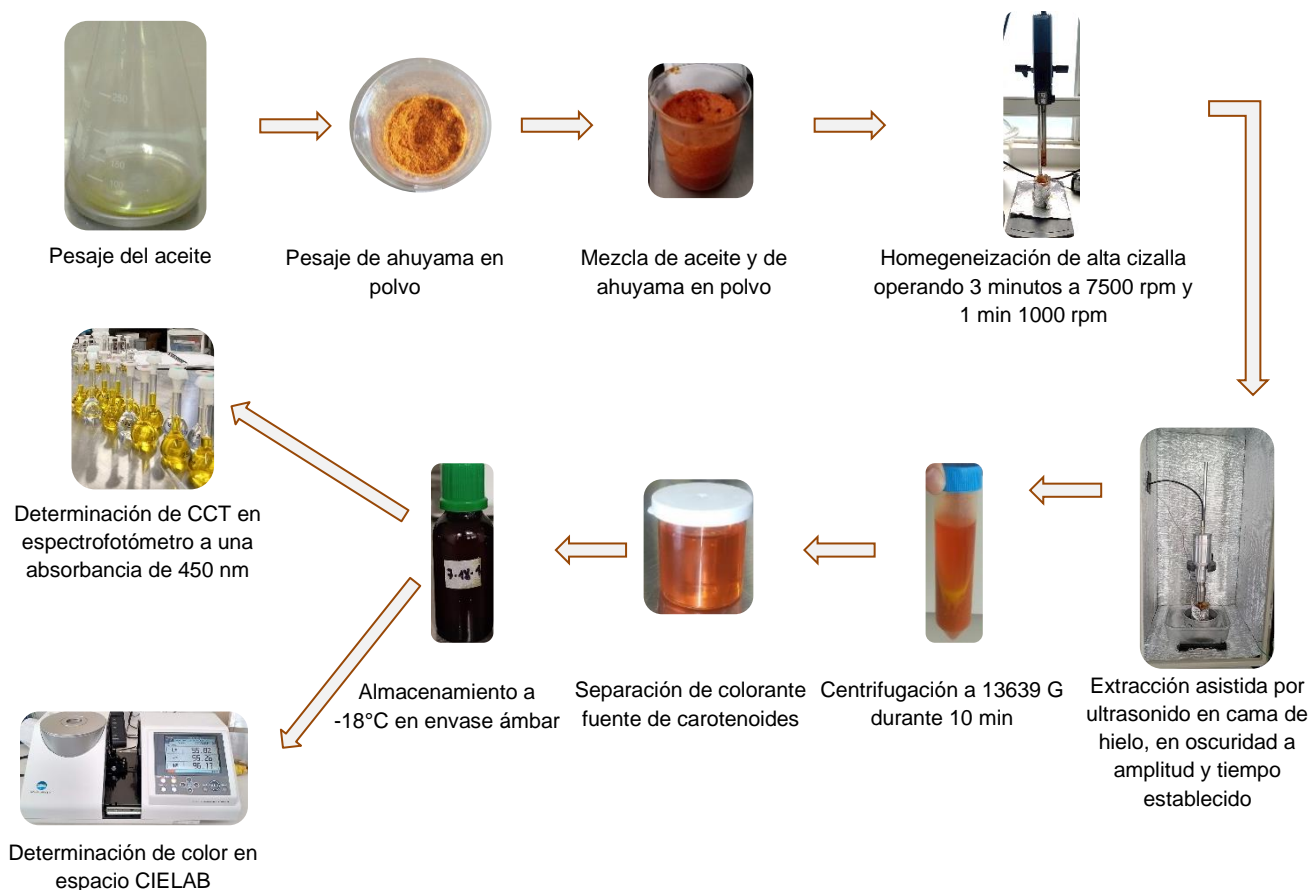


3.2.3 Extracción de carotenoides asistida con ultrasonido (US)

Se evaluaron tres diferentes tiempos (10, 15 y 20 min) y tres diferentes amplitudes (45, 50 y 55%) empleando la relación matriz-mezcla que mayor contenido de carotenoides arrojó en el proceso de extracción convencional (60%). Para realizar el proceso de extracción se emplearon unidades experimentales de aproximadamente 100 g, pesando en un vaso de precipitado primero el aceite y luego el polvo de ahuyama, se cubrió con aluminio el recipiente, se mezcló con ayuda de un agitador de vidrio y se homogeneizó empleando un homogeneizador de alta cizalla Ultra Turrax T 18 basic (IKA, Alemania) operando 3 minutos

en velocidad 2 (7500 rpm) y 1 min en velocidad 3 (11000 rpm); posteriormente se realizó la extracción en un equipo de ultrasonido Fischer Scientific modelo 705 (Fischer Scientific, EE.UU.) empleando una sonda de aleación de titanio de 1/2" de diámetro. A fin de controlar la temperatura durante el proceso de extracción, se ubicó el vaso de precipitado con la mezcla de ahuyama-aceite en una cama de hielo-agua, que permitió asegurar que la temperatura de la mezcla no superara los 60°C, temperatura que era monitoreada durante el proceso. Finalizada la extracción, se transfirió la mezcla a tubos Falcon, se centrifugó en una Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 10 minutos a 13639 gravedades. El sobrenadante clarificado (extracto enriquecido en carotenoides) se transfirió a botellas ámbar y se almacenó en congelación a una temperatura de -18°C.

Figura 3-2: Diagrama de proceso de extracción asistida con ultrasonido



3.2.4 Extracción sucesiva de carotenoides

Se tomó la torta sobrante de la extracción convencional obtenida del proceso de extracción descrito en el numeral 3.2.1 para la relación matriz-mezcla 60%. Realizando un balance de materia, se calculó la cantidad de aceite de girasol necesaria para asegurar que se mantuviera la misma relación matriz-mezcla, trabajando con unidades experimentales de 100 g. Se evaluaron las re-extracciones por método convencional y por extracción asistida con ultrasonido.

- Re-extracción convencional

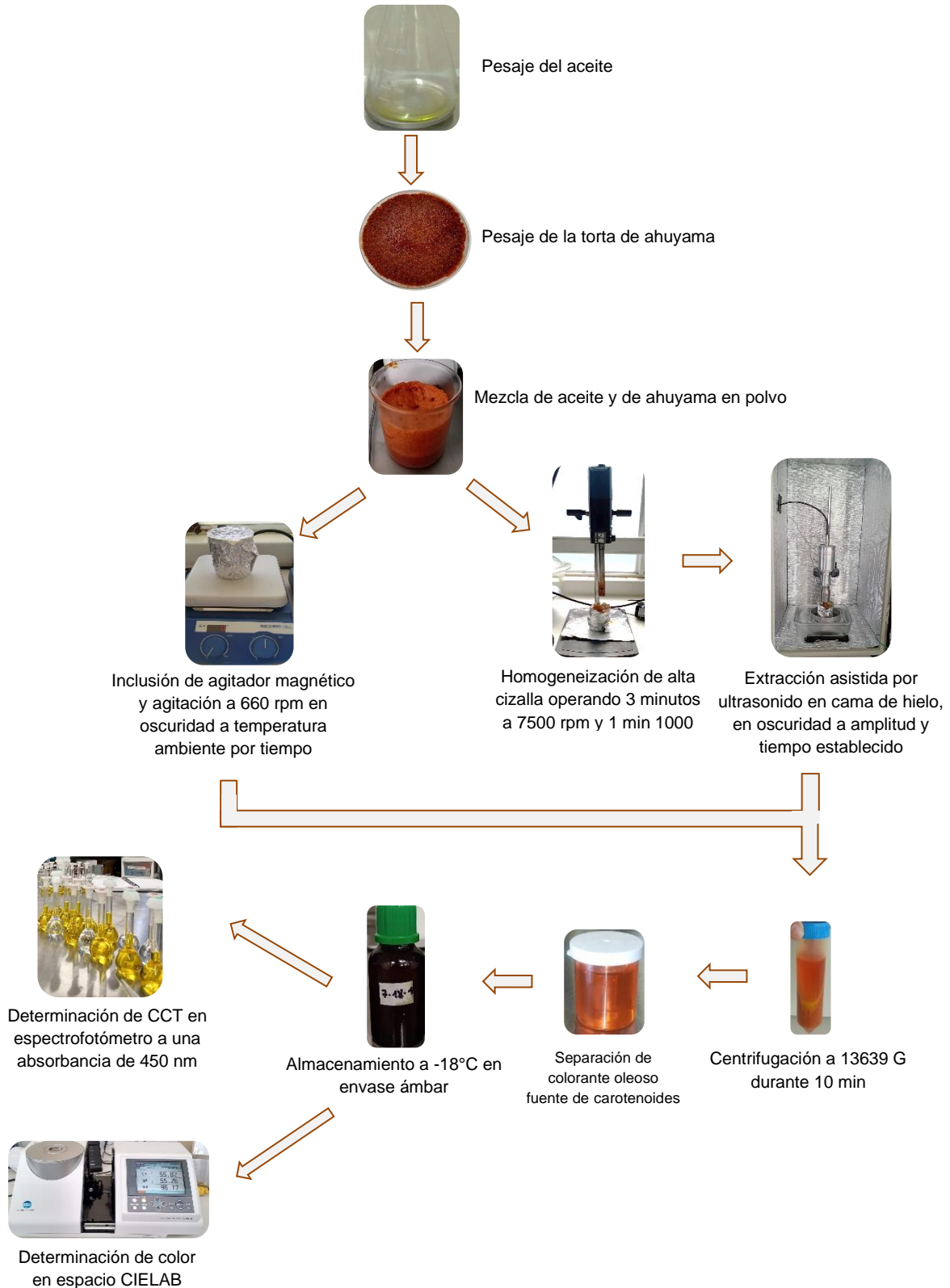
Se ubicó el vaso de precipitado con la torta y el aceite en una plancha de agitación C-MAG HS 7 (IKA, Alemania), se ubicó el mando de velocidad en 3 (aproximadamente 660 rpm) y se aseguró que el mando de temperatura estuviera en 0, luego de esto se revisó que

hubiera un movimiento uniforme de todo el material contenido en el vaso de precipitado y se dejó en agitación durante 24 horas. Pasado este tiempo se transfirió la mezcla a tubos falcon, se centrifugó en una centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, EE.UU.) durante 10 minutos a 13639 gravedades, se transfirió el sobrenadante a botellas ámbar y se almacenó en congelación a una temperatura de -18°C .

- Re-extracción asistida por ultrasonido

Se evaluaron tres diferentes tiempos (5, 20 y 35 min) a una amplitud definida (45%) empleando la relación matriz-mezcla que mayor contenido de carotenoides arrojó en el proceso de extracción convencional (60%). El vaso de precipitado se cubrió con aluminio, se mezcló con ayuda de un agitador de vidrio y se homogeneizó empleando un homogeneizador de alta cizalla Ultra Turrax T 18 basic (IKA, Alemania) operando 3 minutos en velocidad 2 (7500 rpm) y 1 min en velocidad 3 (11000 rpm); posteriormente se realizó la extracción en un equipo de ultrasonido Fischer Scientific modelo 705 (EUA) empleando una sonda de 1/2" de diámetro. Finalizada la extracción, se transfirió la mezcla a tubos Falcon, se centrifugó durante 10 minutos a 13639 gravedades y se transfirió el sobrenadante a botellas ámbar y se almacenó en congelación a una temperatura de -18°C .

Figura 3-3: Diagrama de proceso de extracción convencional (por agitación continua)



3.2.5 Análisis cuantitativo de carotenoides mediante HPLC-DAD

Para la preparación de las muestras, los extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama fueron diluidos en una solución 1:50, 1:100 y 1:200 de etanol:THF (80:20, %V/V). Cada extracto (0,9 mL) fue saponificado con 0,1 mL de KOH 1 M en etanol, bajo agitación en oscuridad a 30°C y pasadas 4 horas la mezcla se diluyó y se centrifugó a 1600 x g durante 1 minuto. Se tomó el sobrenadante para análisis.

- Cuantificación de carotenoides

Como sistema cromatográfico se empleó un modelo Alliance 2695 (Waters, Milford, EE.UU.), acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo 2998 (Waters, Milford, EE.UU.) y una columna C₃₀ Develosil (250 x 4,6 mm; Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). La velocidad de flujo fue de 1 mL/min y el volumen de inyección de 25 µL. La columna y la muestra fueron mantenidas a 25°C y 15°C, respectivamente. Los eluyentes fueron (A) agua:metanol:THF (4:89:7, v/v/v) y (B) agua:metanol:THF (4:6:90, v/v/v). Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en modo elución en gradiente, realizado así: 0% B a 80% B en 60 min, y luego 80% B durante 10 min. Los espectros se obtuvieron en el rango 220-700 nm y los cromatogramas se integraron a 445 nm. La adquisición y cuantificación se realizaron utilizando el software Empower (Waters, Milford, EE.UU.). Las curvas de calibración para violaxantina, luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, α-caroteno y β-caroteno oscilaron entre 0,1 y 2,0 µg/ml.

- Determinación de carotenoides esterificados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas UHPLC-DAD-Orbitrap

Los carotenoides esterificados fueron analizados empleando un UHPLC Vanquish Flex (Thermo Scientific, EE.UU.) acoplado a un DAD modelo Vanquish (Thermo Scientific, EE.UU.) y un espectrómetro de masas Orbitrap modelo Exactive (Thermo Scientific, EE.UU.) equipado con una sonda de ionización química a presión atmosférica (APCI) operando en modo de ionización positiva. La columna fue de 3 µm, columna C₃₀ Develosil (150 x 2,1 mm; Phenomenex), velocidad de flujo de 0,2 mL/min. La columna y la muestra se mantuvieron a 25°C y 20°C, respectivamente. Se inyectaron 5 µL. Los eluyentes fueron (A) agua:metanol:THF (4:89:7, v/v/v) y (B) agua:metanol:THF (4:6:90, v/v/v).

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en modo elución en gradiente, realizado así: 0% B a 80% B en 60 min, y luego 80% B durante 10 min. Los espectros se obtuvieron a 445 nm en un rango de longitud de onda entre 220 y 650 nm.

Las condiciones operativas del APCI fueron: descarga de corona +5 μ A, caudal de gas envolvente 35 ua (unidades arbitrarias), caudal de gas auxiliar 10 ua, temperatura capilar 275°C, temperatura del vaporizador 400°C, voltaje capilar + 40 V, lente de tubo +125 V y skimmer +18 V. Los analitos se identificaron en modo positivo mediante adquisición de barrido completo (m/z + 200-2000 u), utilizando una ventana de aislamiento de \pm 3 ppm. El objetivo de control automático de ganancia (AGC), el tiempo de inyección, la resolución de masa y la energía de colisión fueron 1×10^6 , 50 ms, 50 K y 50 eV, respectivamente. El control del instrumento y el procesamiento de datos se llevaron a cabo mediante el software Xcalibur (Thermo Fisher).

3.2.6 Determinación de contenido de carotenoides totales por espectrofotometría UV-Vis

Para el análisis del contenido de carotenoides totales en los extractos enriquecidos en carotenoides se empleó un espectrofotómetro UV/VIS Jasco V-730 a una longitud de onda de 450 nm siguiendo el método descrito por Salazar-González et al., (2019). Se transfirieron aproximadamente 60 mg de extracto oleoso a un balón de 25 mL, se aforó con acetona y se midió la absorbancia una longitud de onda de 450 nm.

Los datos obtenidos se ajustaron a una curva de calibración elaborada con solución estándar de 200 ppm de β -caroteno en acetona. Para la elaboración de la curva de calibración se midió la absorbancia de soluciones 0,5 ppm, 1,5 ppm, 2,5 ppm, 3,5 ppm y 4,5 ppm empleando acetona como solvente. La curva de calibración se calculó a partir de 6 repeticiones, cuyo R^2 fue de 0,99515, sensibilidad de 0,1488 y un error medio de 0,39 μ g/mL. Con la determinación de la ecuación de la recta se halló la concentración de carotenoides totales, cuya concentración se expresó en $\left(\frac{mg \beta \text{ caroteno}}{kg \text{ extracto}}\right)$.

3.2.7 Determinación del color de los extractos oleosos

Se determinaron en transmisión las coordenadas triestímulo del espacio CIELAB, donde L^* representa la luminosidad, a^* color verde-rojo y b^* color azul-amarillo, empleando un colorímetro CM-5 (Konica Minolta, Japón).

3.2.8 Determinación de peróxidos en aceite y extractos oleosos (IP)

Este análisis se hizo siguiendo el método AOCS CD 8b-90 (American Oil Chemists' Society, 2017). Se pesaron 5 g de muestra en un Erlenmeyer cubierto con aluminio y se adicionaron 10 mL de cloroformo que se disolvieron por agitación suave. Luego se agregaron 15 mL de ácido acético y 1 mL de yoduro de potasio, se cubrió el recipiente, se agitó suavemente durante 1 minuto y se dejó en reposo durante 5 minutos más a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 75 mL de agua, se agitó la mezcla, se agregaron unas gotas de solución de almidón como indicador y se tituló con solución de tiosulfato de sodio 0,02 N. También se realizó un blanco. El índice de peróxidos se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{mEq \text{ Oxígeno activo}}{kg \text{ muestra}} = \frac{(V_1 - V_2) \times N}{m} \times 1000 \quad (3-2)$$

Donde:

V_1 : Volumen de la solución de tiosulfato de sodio empleado en muestra (mL)

V_2 : Volumen de la solución de tiosulfato de sodio empleado en el blanco (mL)

N: Normalidad

m: Peso de la muestra (g)

3.2.9 Determinación de índice de p-anisidina en aceite y extractos oleosos (IpA)

Para la evaluación de este índice, se siguió la metodología AOCS CD 18-90 (American Oil Chemists' Society, 2017). Se pesaron 2 g de muestra en un matraz de 25 mL, el cual se llevó a volumen con isooctano, luego se transfirieron 5 mL de la solución a un tubo de ensayo, al cual se agregó 1 mL de ácido acético glacial. Se midió la absorbancia a 350 nm en un espectrofotómetro UV Vis GENESYS 10S (Thermo Scientific, EE.UU.). Seguido de esto, se transfirieron 5 ml de la solución a otro tubo de ensayo, se adicionó 1 mL de p-

anisidina y se dejó en reposo por 10 minutos alejado de la luz; posteriormente se midió la absorbancia a 350 nm. También se realizó un blanco. El índice de p-anisidina se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$IpA = \frac{25 \times [1.2(A_s - A_b)]}{m} \quad (3-3)$$

Siendo:

As: Absorbancia de la muestra después de la reacción

Ab: Absorbancia de la muestra antes de la reacción

m: Peso de la muestra (g)

3.2.10 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el programa Microsoft Excel® en el que se realizó la estadística descriptiva, análisis de varianza ANOVA y la prueba t de Student para identificar con un nivel de significancia del 95% las diferencias en el CCT, coordenadas colorimétricas e índices de estabilidad oxidativa de los extractos oleosos. Los diferentes análisis se realizaron por triplicado.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Extracción de carotenoides convencionalmente

La Tabla 3-1 muestra el contenido de carotenoides extraído para las diferentes relaciones matriz-mezcla en los diferentes tiempos evaluados, así como los parámetros de color en el espacio CIELCH para cada tratamiento. A partir de estos resultados es posible evidenciar que a medida que incrementó el contenido de ahuyama (matriz) en la mezcla, aumentó el CCT, obteniendo así que la mayor concentración de carotenoides en el extracto se presentó en la relación matriz-mezcla de 60% en la cual se consiguió la extracción de 1244 mg β -caroteno_{eq}/kg extracto oleoso luego de 24 h, lo que representa dos veces más de lo extraído en la menor relación matriz/mezcla evaluada (40%) en el mismo tiempo de extracción. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Razi et al., (2015) que,

en su trabajo referente a la influencia del solvente sobre la eficiencia en la extracción de carotenoides de residuos de camarón, evidenciaron que incrementar la relación de matriz-mezcla tenía un efecto positivo sobre el contenido de carotenoides, ya que se obtenían mayores concentraciones de estos pigmentos. A una conclusión similar llegaron Salazar-González et al., (2019) en su trabajo sobre extracción verde de carotenoides de polen empleando aceite de girasol a diferentes tiempos y relaciones matriz-solvente, donde afirmaron que una mayor relación soluto-solvente genera un mayor gradiente de concentración y por lo tanto una mayor velocidad de difusión de los carotenoides en el solvente.

En los resultados de la Tabla 3-1 se observa en los parámetros de color que los valores de la coordenada de luminosidad (L) variaron desde $66,03 \pm 1,42$ hasta $47,66 \pm 0,00$, del croma que variaron desde $80,77 \pm 0,00$ hasta $85,69 \pm 0,08$, y del tono que disminuyeron desde $58,76 \pm 1,23$ hasta $47,27 \pm 0,01$ por efecto del incremento en la relación matriz-mezcla; esto en términos visuales representa un color más opaco, que parte de una coloración amarilla a una más rojiza, evidenciando un aumento en la concentración del contenido de carotenoides. Resultados similares obtuvieron Pandurangaiah y Rao (2020) quienes determinaron los coeficientes de correlación entre el contenido de carotenoides y las coordenadas de color, encontrando una correlación negativa entre este CCT y la coordenada L^* , el croma y el tono.

Tabla 3-1: Contenido de carotenoides totales en extractos obtenidos convencionalmente

Relación matriz/mezcla (%p/p)	Tiempo de extracción (h)	CCT (mg β -caroteno eq/kg extracto oleoso)	Parámetros de color		
			L*	Croma	Tono
40	4	522 \pm 33 ^a	66,03 \pm 1,42 ^d	85,69 \pm 0,08 ^d	58,76 \pm 1,23 ^d
	8	585 \pm 56 ^{ab}	62,83 \pm 0,91 ^c	85,01 \pm 0,35 ^{bc}	56,72 \pm 0,53 ^c
	24	691 \pm 49 ^b	61,38 \pm 0,15 ^b	84,56 \pm 0,05 ^b	55,80 \pm 0,10 ^b
	72	664 \pm 19 ^b	59,96 \pm 0,28 ^a	84,03 \pm 0,11 ^a	54,99 \pm 0,16 ^a
50	4	725 \pm 25 ^a	59,19 \pm 0,27 ^d	84,47 \pm 0,08 ^c	53,99 \pm 0,18 ^d
	8	828 \pm 105 ^a	57,41 \pm 0,05 ^c	84,29 \pm 0,37 ^{bc}	52,65 \pm 0,23 ^{bc}
	24	840 \pm 55 ^a	56,64 \pm 0,11 ^b	83,74 \pm 0,06 ^b	52,41 \pm 0,06 ^b
	72	802 \pm 36 ^a	54,76 \pm 0,07 ^a	83,15 \pm 0,13 ^a	51,29 \pm 0,05 ^a
60	4	1117 \pm 22 ^a	49,51 \pm 0,01 ^d	81,99 \pm 0,01 ^c	47,94 \pm 0,01 ^d
	8	1170 \pm 21 ^{bc}	49,17 \pm 0,06 ^c	81,95 \pm 0,02 ^b	47,70 \pm 0,04 ^c
	24	1244 \pm 6 ^c	48,97 \pm 0,01 ^b	82,04 \pm 0,01 ^d	47,50 \pm 0,01 ^b
	72	1220 \pm 35 ^c	47,66 \pm 0,00 ^a	80,77 \pm 0,00 ^a	47,27 \pm 0,01 ^a

CCT: Contenido de carotenoides totales en extractos

Letras diferentes en una misma columna del mismo bloque de relación matriz-mezcla de extracción indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

En la Figura 3-4 se muestra de manera gráfica el contenido de carotenoides para cada relación matriz-mezcla evaluada a lo largo del tiempo de extracción, donde se observa que entre las 4 y las 24 horas se alcanzó la máxima tasa de extracción, así como también se observa que entre las 24 y 72 horas no aumentó el contenido de carotenoides en ninguna de las relaciones matriz/mezcla. De acuerdo con estos resultados, el proceso de extracción convencional ocurrió en dos fases. La primera fase (0 a 4 h de extracción) caracterizada por un aumento rápido de la concentración de carotenoides en el extracto, es aquella en la cual el solvente penetró en la estructura celular, permitiendo la disolución de los

compuestos más solubles en el aceite y aquellos localizados de forma más externa en la superficie de las partículas de la matriz sólida; en la segunda fase, más lenta (aproximadamente de 4 a 24 h de extracción), es probable que haya ocurrido una extracción de los compuestos solubles mediante la estructura porosa de los sólidos residuales gobernada por un mecanismo difusivo y posterior transferencia desde la solución en contacto con las partículas al seno del solvente (Goula, 2013). Posteriormente, se observó una leve disminución (no significativa estadísticamente) que sugiere que mayores tiempos de extracción podrían inducir pérdidas de carotenoides debido a reacciones de degradación.

Aunque se observa que el mayor contenido de carotenoides se alcanzó a las 24 horas, en la Figura 3-5 se puede observar que la eficiencia de la extracción no alcanzó el 100%, de hecho, se obtuvieron eficiencias de 70%, 69% y 85% para relaciones matriz-mezcla de 40%, 50% y 60%, respectivamente. La eficiencia se calculó partiendo del contenido de carotenoides de la matriz el cual fue 2449,82 mg β -caroteno_{eq}/kg de ahuyama seca, del cual se estimó el porcentaje máximo que se podía extraer según la relación matriz-mezcla evaluada, a saber, para la relación del 40% el contenido máximo que se podía extraer era 979,93 mg β -caroteno_{eq}/mg extracto oleoso, para la relación del 50% era 1224,91 mg β -caroteno_{eq}/mg extracto oleoso y para la relación del 60% era 1469,89 mg β -caroteno_{eq}/mg extracto oleoso. Se observa entonces que a medida que incrementó el contenido de ahuyama en la mezcla, aumentó también la eficiencia de extracción de carotenoides, para las extracciones realizadas al 60% de matriz. Este resultado es distinto al reportado en extracciones de carotenoides de polen empleando aceite de girasol (Salazar-González et al., 2019), en las cuales se encontró que proporciones de matriz inferiores al 50% favorecían una mayor eficiencia en términos de recuperación de carotenoides extraíbles. Por otra parte, el resultado es similar al encontrado por Sun et al., (2011) que en su trabajo sobre la determinación de los efectos del ultrasonido sobre la eficiencia de extracción de carotenoides trans- β -caroteno a partir de cáscaras de cítricos, encontró que para las relaciones sólido/solvente 1:30 a 3:30 hubo un incremento en la eficiencia de extracción. Lo anterior resalta que el efecto de la proporción matriz/solvente sobre la tasa de extracción, así como sobre la eficiencia de extracción son altamente dependientes del tipo de material vegetal que se usa como fuente de estos compuestos.

Figura 3-4: Cinética del contenido de carotenoides durante 72 horas a diferentes relaciones matriz/mezcla de extracción: (40% p/p, 50% p/p, 60% p/p)

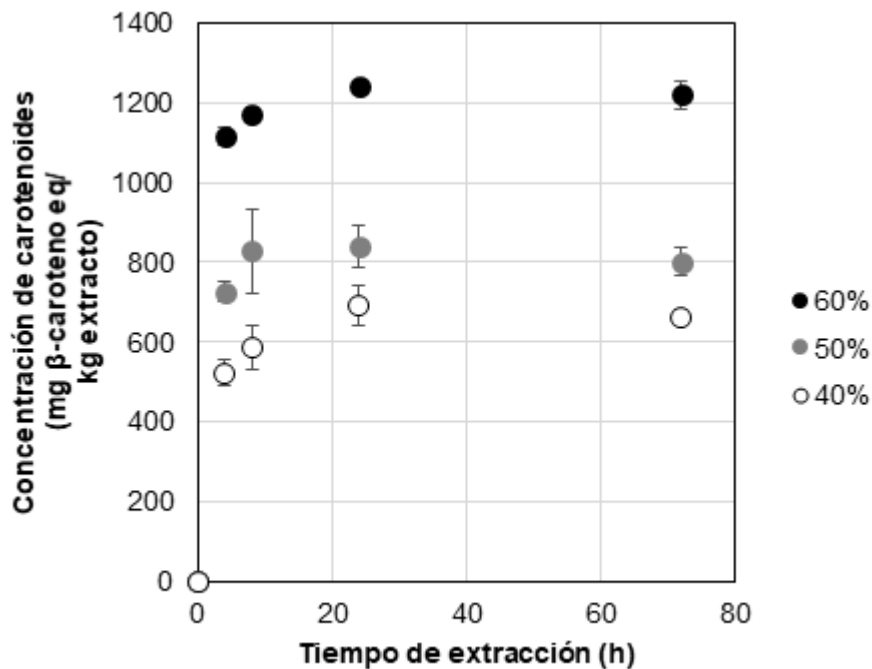
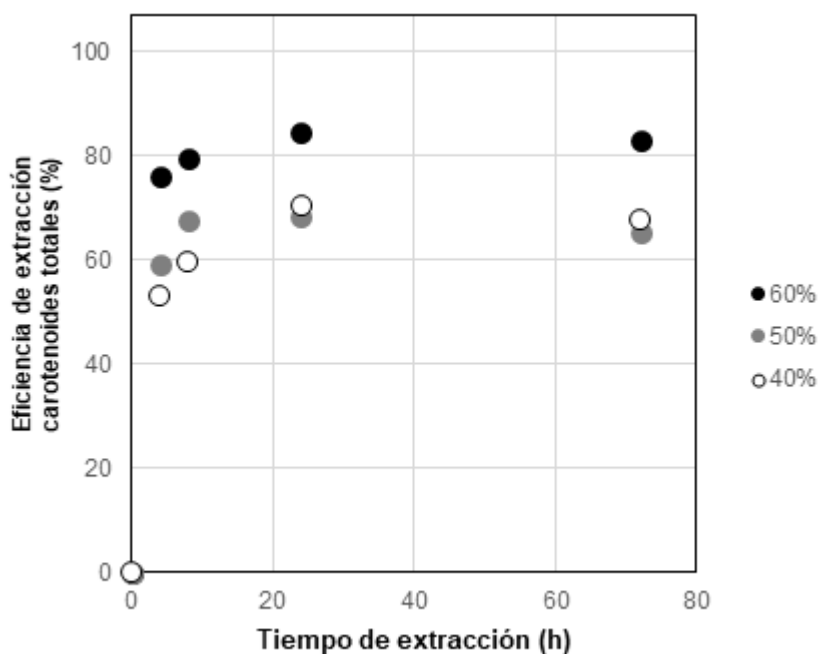


Figura 3-5: Cinética de la eficiencia de extracción de carotenoides totales durante 72 horas a diferentes relaciones matriz/mezcla de extracción: (40% p/p, 50% p/p, 60% p/p)



3.3.2 Extracción asistida con ultrasonido

La Tabla 3-2 muestra para las diferentes combinaciones de tiempo-amplitud que se usaron en cada tratamiento, el correspondiente CCT obtenido, así como la eficiencia de extracción. El contenido de carotenoides varió entre $811,30 \pm 4,33$ y $1176,21 \pm 22,32$ mg β -caroteno_{eq}/kg extracto oleoso, y la eficiencia entre $55,19 \pm 0,29$ y $80,02 \pm 1,52\%$, encontrándose los resultados más altos en el tratamiento en el que se empleó un tiempo de 15 minutos y una amplitud de 45%. En comparación con el trabajo realizado por Li et al. (2013), quienes obtuvieron 364,65 mg β -caroteno_{eq}/ kg extracto oleoso a partir de zanahoria como matriz, se evidencia que el CCT de ahuyama fue mayor. Así mismo, estos autores reportaron una eficiencia del 80% pasados 30 minutos de extracción empleando una intensidad ultrasónica de 22,5 W/cm², mientras que en la extracción asistida con ultrasonido en el caso de la ahuyama se logró esta eficiencia en un tiempo de 15 minutos. Con respecto a los parámetros de color, los valores del tono se encontraron entre $47,23 \pm 2,47$ y $48,98 \pm 1,04$, que corresponden a tonalidades naranjas.

Tabla 3-2: Contenido de carotenoides totales y color en extractos obtenidos por extracción asistida con ultrasonido

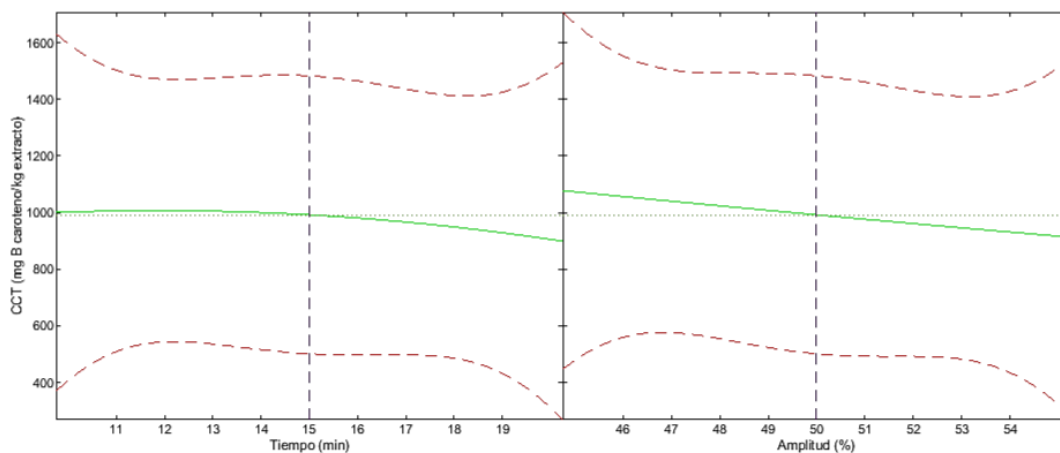
Tiempo (min)	Amplitud (%)	CCT (mg β -caroteno _{eq} / kg extracto oleoso)	Eficiencia de extracción (%carotenoides extraídos)	Parámetros de color		
				L*	Croma	Tono
20	50	$811,30 \pm 4,33$ ^a	$55,19 \pm 0,29$ ^a	$50,19 \pm 1,02$	$81,89 \pm 0,49$	$48,52 \pm 0,59$
10	55	$819,47 \pm 31,78$ ^{ac}	$55,75 \pm 2,16$ ^{ac}	$49,21 \pm 3,49$	$81,99 \pm 1,17$	$47,73 \pm 2,11$
15	55	$841,83 \pm 62,81$ ^{ac}	$57,27 \pm 4,27$ ^{ac}	$49,62 \pm 0,93$	$81,62 \pm 0,51$	$48,24 \pm 0,42$
20	55	$1011,31 \pm 22,19$ ^d	$68,80 \pm 1,51$ ^d	$48,60 \pm 4,14$	$82,07 \pm 1,06$	$47,23 \pm 2,47$
20	45	$898,31 \pm 25,82$ ^c	$61,11 \pm 1,76$ ^c	$49,27 \pm 5,51$	$82,34 \pm 1,34$	$47,63 \pm 3,67$
15	45	$1176,21 \pm 22,32$ ^e	$80,02 \pm 1,52$ ^e	$49,75 \pm 3,12$	$82,32 \pm 1,04$	$47,95 \pm 2,14$
15	50	$1057,91 \pm 3,54$ ^{bd}	$71,97 \pm 0,24$ ^{bd}	$49,66 \pm 1,04$	$81,38 \pm 0,67$	$48,43 \pm 0,43$
10	45	$1067,45 \pm 50,80$ ^{bde}	$72,62 \pm 3,46$ ^{bde}	$50,52 \pm 0,90$	$82,57 \pm 1,07$	$48,38 \pm 1,30$
10	50	$1123,79 \pm 65,35$ ^{bde}	$76,45 \pm 4,45$ ^{bde}	$49,50 \pm 1,39$	$82,02 \pm 0,95$	$47,93 \pm 1,21$

CCT: Contenido de carotenoides totales. Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%

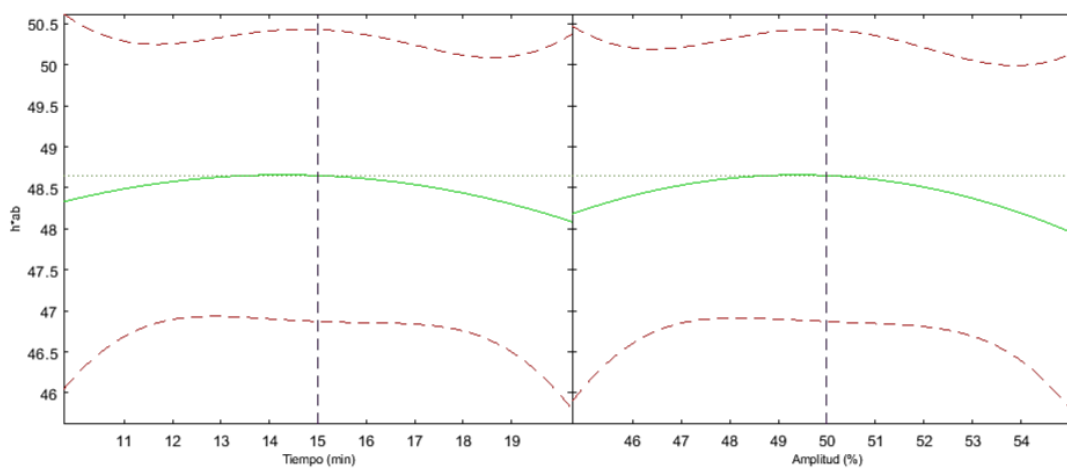
Es importante tener en cuenta el efecto generado por el pretratamiento de ultracizalla al que se sometió la mezcla mediante el ultra túrrax con el fin de homogenizar la mezcla y mejorar la propagación de ondas del ultrasonido. Con el fin de evaluar este efecto, se llevó a cabo una serie adicional de experimentos, en la que se logró determinar que este pretratamiento es responsable de la extracción del $49,38 \pm 1,33\%$ de la eficiencia, esto debido a que el proceso de cizalla disminuye el tamaño de partícula, aumentando el área de contacto y generando la ruptura de paredes celulares de la ahuyama, lo que promueve la liberación de los carotenoides al medio (Xu et al., 2016).

Si bien no se evidenciaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0,05$), se logró identificar mediante los contornos de superficie de respuesta los factores que tuvieron un efecto más importante sobre las variables respuesta. El propósito de la combinación de los diferentes niveles del tiempo y amplitud fue encontrar las condiciones que permitieran obtener el mayor CCT, el cual tiene una relación directa con la eficiencia de extracción. En la Figura 3-6 se observa el efecto de estas variables sobre el CCT (a) y el tono (b). En los dos casos la amplitud tuvo una influencia más importante que el tiempo en un proceso de extracción. Roohani et al. (2016) encontraron el mismo resultado en su trabajo sobre evaluación del efecto del tiempo y la amplitud ultrasónica en la extracción de compuestos carotenoides del estambre de azafrán, evidenciando que al aumentar la amplitud y manteniendo el tiempo constante, se observaron CCT superiores. Estos autores indicaron que el esfuerzo cortante de las ondas ultrasónicas permitió romper las células vegetales, generando emulsificación, difusión y daño tisular que condujo a aumentar la difusión del contenido celular. Goula et al. (2017) argumentaron que el efecto positivo de la amplitud puede ser debido a que con mayores amplitudes el colapso de las burbujas es más violento y al efecto mecánico del ultrasonido que conlleva a una mayor superficie de contacto entre la matriz y el solvente, permitiendo una mayor penetración del líquido en el sólido. Esto permite identificar una relación inversa entre el CCT y la coordenada del tono, pues mayores CCT refieren valores más bajos de tono.

Figura 3-6: Efecto de las condiciones de operación (tiempo y amplitud) en CCT (a) y tono (b)



(a)



(b)

3.3.3 Identificación y cuantificación de carotenoides

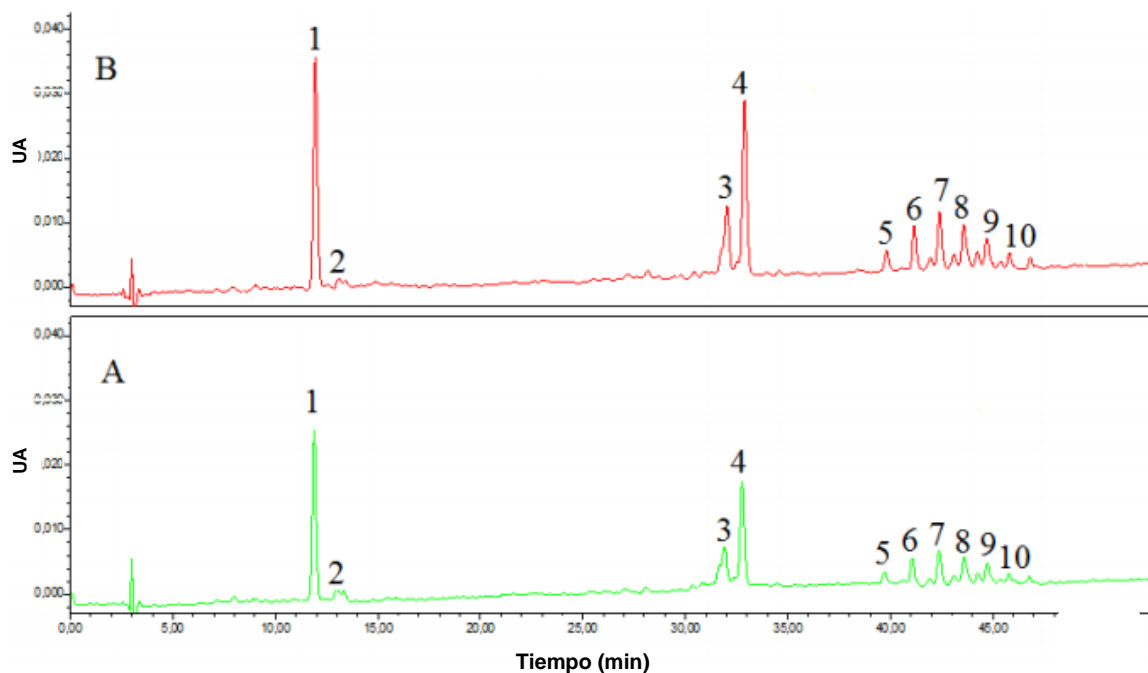
Se realizó la identificación y cuantificación de carotenoides mediante HPLC a los extractos obtenidos mediante CNV y US que tuvieron los CCT más altos, a saber, el extracto CNV obtenido en una relación matriz-solvente del 60% con un tiempo de extracción de 24 horas que arrojó una concentración de $1244,00 \pm 6,00$ mg β -caroteno_{eq}/kg extracto. Y el extracto US obtenido a una amplitud de 45%, un tiempo de extracción de 15 minutos, con una concentración obtenida de $1176,2 \pm 22,3$ mg β -caroteno_{eq}/kg extracto. La identificación del perfil de carotenoides en los extractos permitió determinar específicamente las moléculas

de carotenoides presentes y sus concentraciones con el fin de reconocer aquellos que otorgan coloración a los extractos.

En la Figura 3-7 se pueden observar los cromatogramas correspondientes a los extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama y obtenidos mediante dos metodologías diferentes: convencional (CNV) y por extracción asistida con ultrasonido (US). Los carotenoides identificados en los dos extractos (A: US y B: CNV) fueron la luteína, la zeaxantina, el α -caroteno, el β -caroteno y moléculas de luteína esterificadas con diferentes ácidos grasos como ácido palmítico, láurico y mirístico, lo que se observa en los picos 5 a 10. Se observa que todas estas moléculas estaban presentes en los dos extractos, pero variaban en su concentración, lo que se puede ver por la altura de los picos de cada una de las moléculas.

En la Tabla 3-3 se muestra la concentración de cada carotenoide, lo cual se logró mediante el método de estándar interno usando equinena. Se observa que los perfiles de carotenoides identificados en los extractos CNV y US son similares a los reportados por Quijano, (2020) en pulpa de ahuyama *Cucurbita moschata* liofilizada donde encontró mayor concentración de luteína, seguida de β -caroteno, violaxantina y α -caroteno; así como Norshazila et al., (2017) evidenció también mayor concentración de luteína, β -caroteno y α -caroteno en esta misma variedad de ahuyama. (Bergantin et al., 2018) encontraron una mayor concentración de β -caroteno, seguido de α -caroteno, violaxantina y luteína en *Cucurbita moschata*, Los reportes del contenido de carotenoides pueden variar según la especie, el cultivar, el estado de madurez, clima factores geográficos, condición del suelo, disponibilidad de nutrientes y condiciones de proceso y almacenamiento, que pueden afectar la biosíntesis y metabolismo de carotenoides en las plantas (Provesi et al., 2011).

Figura 3-7: Cromatograma de carotenoides presentes en extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama obtenidos por diferentes métodos: US (A) y CNV (B).



Los picos señalados corresponden a: 1: Luteína, 2: Zeaxantina, 3: α -caroteno, 4: β -caroteno, 5: Luteína esterificada con ácido palmítico, 6: Luteína esterificada con ácido laurico, 7: Luteína esterificada con ácido láurico y mirístico, 8: Luteína esterificada con ácido di mirístico, 9: Luteína esterificada con ácido palmítico y láurico, 10: Luteína esterificada con ácido palmítico – ácido palmítico.

Tabla 3-3: Contenido de carotenoides en extractos oleosos enriquecidos en carotenoides de ahuyama obtenidos por diferentes métodos de extracción

Muestra	Luteína ($\mu\text{g/mL}$)	α -caroteno ($\mu\text{g/mL}$)	β -caroteno ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto CNV	100,8 \pm 19,7	40,5 \pm 12,5	134,5 \pm 20,7
Extracto US	76,1 \pm 17,4	28,5 \pm 13,9	83,2 \pm 13,0

El perfil cromatográfico de las dos muestras se mantuvo, no hubo formación de nuevos carotenoides, ni se evidenciaron procesos de esterificación u oxidación. La presencia de estos carotenoides otorgan un importante valor biológico a los extractos, teniendo en cuenta que los seres humanos no tienen la capacidad de sintetizar carotenoides, por lo que estos deben ser incluidos en la dieta, considerando que dentro de sus propiedades está su capacidad antioxidante lo que les permite inhibir la peroxidación lipídica, mejoran

el sistema inmune, disminuyen las enfermedades degenerativas y las enfermedades visuales (Baiano y del Nobile, 2015); este último rol es desempeñado por los carotenoides provitamina A, que son capaces de transformarse biológicamente en vitamina A. Para que un carotenoide sea provitamina A debe tener un anillo β no sustituido con una cadena poliélica de 11 carbonos, como es el caso del β -caroteno y el α -caroteno (Rodríguez-Amaya, 1999). El β -caroteno tiene una actividad provitamina A del 100%, el α -caroteno una actividad del 53%, mientras que la luteína no tiene esta propiedad debido a que en sus anillos β tiene un grupo oxigenado (Rodríguez-Amaya, 1999). La vitamina A cobra su importancia en razón a que tiene un aporte nutricional y de salud del ser humano, principalmente en el proceso de la visión, en la absorción del hierro y en el mantenimiento de las estructuras oculares, adicional a que se ha identificado su importante rol como hormona en el control del desarrollo celular y en la expresión de genes, lo que está relacionado con un efecto anticancerígeno (ICBF, 2005).

Con respecto a los datos cuantitativos, se encontró mayor contenido de β -caroteno, α -caroteno y luteína en el extracto CNV en comparación con el US, esto se puede atribuir al efecto degradativo que puede tener la cavitación e incremento de temperatura sobre los carotenoides durante la extracción asistida con ultrasonido (Hernández-Santos et al., 2016). (Pingret et al., 2013) indican que la extracción mediada con ultrasonido está sujeta al medio, la temperatura, el tiempo y el tipo de solvente. En este sentido, se debe considerar que al trabajar con solventes de alta viscosidad como lo es el aceite, es necesario emplear amplitudes mayores a las de otros solventes, dado que los solventes de alta viscosidad ejercen una resistencia al movimiento del ultrasonido; es por esto que al aumentar la amplitud, se incrementa el movimiento vibratorio a fin de generar una adecuada cavitación; sin embargo se debe considerar que esta condición tiene un efecto degradativo sobre los carotenoides, tal como lo evidenciaron (Chuyen et al., 2017) donde observaron una disminución en el contenido de luteína y β -caroteno en la extracción asistida con ultrasonido de carotenoides a partir de cáscaras de Gac, por un incremento en la potencia de ultrasonido. Con base en esto se puede afirmar que la menor concentración de carotenoides del extracto US en comparación con el CNV está relacionado con el efecto degradativo ejercido por el ultrasonido en un medio de alta viscosidad.

3.3.4 Extracción sucesiva

La torta sobrante de la extracción convencional de carotenoides empleando los parámetros que arrojaron los mejores resultados (relación matriz-mezcla: 60%; tiempo de extracción: 24 h), se empleó para realizar una segunda extracción por el método CNV y por US (20 min de extracción y 45% de amplitud), a fin de evaluar la recuperación de carotenoides tanto de la ahuyama como del aceite circundante adherido a esta, luego de la primera extracción. En la Tabla 3-4 se observan los resultados obtenidos comparando el CCT el primer extracto, la eficiencia de extracción, las coordenadas de color y la estabilidad oxidativa (estas dos últimas variables también para el aceite empleado como solvente).

Tabla 3-4: Contenido de carotenoides totales y color de extractos obtenidos por extracción sucesiva

	Aceite de girasol	Primera extracción		Re-extracción		
		CNV	US	CNV	US	
CCT (mg β -caroteno eq/kg extracto)	-	1244,00 \pm 6,00 ^{Bb}	1176,2 \pm 22,3 ^{Ba}	1133,83 \pm 0,03 ^{Aa}	1137,61 \pm 0,09 ^{Aa}	
Eficiencia (%)	-	85 ^{Bb}	80 ^{Ba}	35 ^{Aa}	41 ^{Ab}	
Parámetros de color	L	97,00 \pm 0,17 ^D	48,97 \pm 0,01 ^{Aa}	49,75 \pm 3,12 ^{Aa}	56,4 \pm 0,4 ^{Bb}	53,5 \pm 1,1 ^{Ca}
	Croma	4,08 \pm 1,53 ^D	82,04 \pm 0,01 ^{Aa}	82,32 \pm 1,04 ^{Aa}	88,3 \pm 0,3 ^{Cb}	86,3 \pm 0,5 ^{Ba}
	Tono	105,79 \pm 2,03 ^D	47,50 \pm 0,01 ^{Aa}	47,95 \pm 2,14 ^{Aa}	49,2 \pm 0,1 ^{Cb}	48,3 \pm 0,5 ^{Ba}
Estabilidad oxidativa	Índice peróxidos	1,24 \pm 0,12 ^A	2,37 \pm 0,47 ^{Bb}	0,58 \pm 0,12 ^{Aa}	0,90 \pm 0,10 ^{Aa}	0,73 \pm 0,12 ^{Aa}
	Índice p-anisidina	10,34 \pm 0,65 ^A	10,90 \pm 0,26 ^{Aa}	12,76 \pm 0,43 ^{Ab}	11,03 \pm 0,38 ^{Aa}	12,17 \pm 0,49 ^{Aa}

Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de los valores con diferentes métodos de extracción (CNV y US)

Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los promedios de los valores obtenidos entre extracción y re-extracción.

CNV: Extracción convencional; US: Extracción asistida por ultrasonido

De acuerdo con los resultados obtenidos se observa que para todos los parámetros evaluados hay diferencias significativas entre la primera y la segunda extracción empleando la misma tecnología. De manera interesante, los valores del CCT de los extractos obtenidos en la primera y segunda extracción, sin importar la metodología, son numéricamente similares, es decir, se pueden obtener extractos con alto contenido de carotenoides al emplear la torta residual de una primera extracción. Sin embargo, teniendo en cuenta que en la primera extracción la cantidad de aceite que se enriqueció en carotenoides fue del 85% para extracción convencional y del 80% para extracción asistida por ultrasonido, el aceite restante que quedó en la torta paso a formar parte del extracto obtenido en la segunda extracción, por lo que la eficiencia real de esta re-extracción fue del 35% para la extracción convencional y del 41% para la extracción asistida por ultrasonido. Se evidenció, por tanto, que la adherencia del aceite a la “torta” sobrante de la primera extracción es un aspecto crítico a considerar en las extracciones sólido-líquido y que puede ser optimizado mediante las extracciones sucesivas, que representan un incremento en la eficiencia acumulada, optimización en el uso de la matriz alimentaria y disminución en el uso de solventes de extracción (Pagels et al., 2020; Trivedi et al., 2016).. La disminución de la eficiencia en la segunda extracción es acorde con lo reportado por Strati y Oreopoulou (2011) quienes también evidenciaron que en la primera extracción de carotenoides, realizada en un extractor en agitación continua al cual se agregaron residuos secos de tomate y etil acetato como solvente de extracción, se obtuvo la mayor eficiencia y que esta tendió a disminuir conforme se realizaban las siguientes extracciones sucesivas.

Comparando el CCT y la eficiencia entre las tecnologías de extracción (CNV y US), tanto en la primera como en la segunda extracción se observaron diferencias significativas. En la primera extracción el CCT y la eficiencia fueron mayores en el extracto CNV, mientras que en la re-extracción los mayores valores se presentaron en el extracto US. Para lo observado en la re-extracción, podría considerarse la primera extracción con tecnología convencional como un pretratamiento, en el cual la ahuyama estuvo en contacto con el aceite, tiempo en el cual hubo transferencia de carotenoides al aceite adherido a la torta y en que se reforzó esta transferencia por efecto de la cavitación generada por el ultrasonido.

Se evaluó la estabilidad oxidativa de los extractos obtenidos debido a que los aceites vegetales (solvente empleado en las extracciones) son susceptibles a condiciones de

temperaturas elevadas y/o a la presencia de oxígeno, los cuales favorecen la oxidación lipídica originando olores y sabores indeseados. Las moléculas con presencia de dobles enlaces son más propensas a sufrir reacciones de oxidación, que resultan en la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados debido a la formación de productos de oxidación lipídica volátiles y no volátiles (Pignitter y Somoza, 2012).

Para evaluar la estabilidad oxidativa se determinó el índice de peróxidos (IP) para cuantificar los productos de oxidación primaria en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra; también se determinó el índice de p-anisidina (IpA) para cuantificar los productos de oxidación secundaria. Se observa que, en los valores de IP, el extracto US mostró ser significativamente menor al aceite de girasol y al extracto CNV tanto en la primera como en la segunda extracción, pero significativamente mayor en los valores de IpA, lo que permite inferir que el proceso de extracción asistido con ultrasonido tiene un efecto prooxidante.

El Códex Alimentarius establece que el valor máximo permitido de IP es de 10 mEq. de Oxígeno activo/kg de aceite. Los valores obtenidos para las muestras evaluadas son inferiores a este valor, por lo que cumplen con la norma mencionada. Con respecto al IpA, al comparar los valores obtenidos para los extractos en las dos extracciones con el IpA del aceite de girasol, que se toma como el punto inicial de los compuestos de oxidación secundaria, no se observa en el caso del CNV un incremento significativo como efecto del proceso de extracción, caso contrario con el US que sí mostró un aumento significativo, lo que puede ser explicado por la formación de especies de oxidación secundaria que se originan como consecuencia de la cavitación acústica y del incremento de temperatura (Perrier et al., 2017). Que el IP sea menor en el US y mayor en el IpA, puede atribuirse a que los productos de oxidación primaria disminuyen a medida que avanza el proceso de oxidación, pasando a la segunda fase de oxidación, también llamada propagación, en la que los hidroperóxidos se convierten en aldehídos, cetonas y otros compuestos, los cuales son identificados mediante la prueba de p-anisidina. Lo anterior permitiría afirmar que el US se encontraba en la segunda fase de oxidación lipídica.

3.4 Conclusiones parciales

La extracción de carotenoides mediante agitación continua (convencional) permitió obtener extractos ricos en carotenoides con concentraciones entre 522 ± 33 y 1244 ± 6 mg β -caroteno_{eq}/kg extracto oleoso empleando relaciones matriz-mezcla entre el 40 y 60% con tiempos de extracción entre 4 y 72 horas. El croma osciló entre $80,77 \pm 0,00$ y $85,69 \pm 0,08$, observando que no hubo un efecto significativo causado por la variación de la concentración de la ahuyama en la mezcla con el aceite. En cuanto al tono, se encontraron valores entre $47,27 \pm 0,01$ y $58,76 \pm 1,23$, tomando tonalidades más naranjas en las relaciones matriz-mezcla superiores, dado que en estas había mayor concentración de carotenoides. Las condiciones que permitieron obtener el extracto con mayor CCT fueron la relación matriz-mezcla del 60% con un tiempo de extracción de 24 horas.

La extracción asistida con ultrasonido permitió obtener extractos con CCT entre $811,30 \pm 4,33$ y $1176,21 \pm 22,32$ mg β -caroteno_{eq}/kg extracto oleoso, empleando amplitudes entre 45 y 55% y tiempos de extracción entre 10 y 20 minutos. Los valores del tono se encontraron entre $47,23 \pm 2,47$ y $48,98 \pm 1,04$, que corresponden a colores naranja, y los valores del croma oscilaron entre $81,38 \pm 0,67$ y $82,57 \pm 1,07$, en los que no hubo diferencias significativas, mostrando una coloración saturada. Las condiciones a partir de las cuales se obtuvo el extracto con mayor CCT fueron una amplitud de 45% con un tiempo de extracción de 15 minutos. Se observó también que entre la amplitud y el tiempo, el factor que tuvo un mayor efecto sobre el CCT y el tono fue la amplitud y que el pretratamiento de homogenización con ultra-túrrax promovió la difusión de carotenoides de ahuyama al aceite gracias a la ruptura de las paredes celulares y a la reducción del tamaño de partícula.

Tanto en la extracción convencional como en la asistida con ultrasonido se logró obtener colorantes amarillo-naranja con CCT diferentes entre sí y unas eficiencias de 85% para CNV y 80% para US, que aunque no tienen una diferencia importante, el costo energético sí es menor en la extracción US ya que se requiere de aproximadamente 15 minutos para obtener un extracto con un CCT similar al de CNV que requiere de 24 horas de extracción.

La identificación del perfil de carotenoides y su cuantificación permitió evidenciar la variedad y el importante aporte de la ahuyama como fuente de carotenoides, en los que

se encuentra principalmente el β -caroteno (83 y 134 $\mu\text{g/mL}$), la luteína (76 y 100 $\mu\text{g/mL}$) y el α -caroteno (28 y 40, $\mu\text{g/mL}$) para extractos US y CNV, dos de estos carotenoides con actividad provitamina A (α -caroteno y β -caroteno). Este orden se mantuvo tanto para el extracto CNV como para el US, sin embargo el extracto US mostró valores inferiores, lo que se atribuye al efecto de la cavitación.

La extracción sucesiva de carotenoides mediante tecnología CNV como US permitió extraer más carotenoides, pero con una eficiencia mucho menor en comparación con las primeras extracciones realizadas, ya que el mayor CCT se transfirió al aceite en la primera extracción. El croma osciló entre $82,04 \pm 0,01$ y $82,32 \pm 1,04$ para la primera extracción y entre 88,3 y 86,3 para la re-extracción, y el tono estuvo entre $47,50 \pm 0,01$ y $47,95 \pm 2,14$ para la primera extracción y entre $49,2 \pm 0,1$ y $48,3 \pm 0,5$ para la re-extracción, valores que en general mostraron que los extractos se mantuvieron en tonalidades naranjas y saturadas, y que no hubo un efecto sobre las coordenadas del color por efecto de la re-extracción. En cuanto a la estabilidad oxidativa, se evidenció que los procesos de extracción y re-extracción no tuvieron un efecto oxidante sobre los extractos.

4. Estabilidad de extractos oleosos fuente de carotenoides

4.1 Introducción

Los carotenoides son compuestos bioactivos de gran valor no solo por sus llamativos colores sino por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, aporte en la mejora de la salud visual, función cognitiva y actividad provitamina A (Stephenson et al., 2021). Dadas sus múltiples aptitudes, los carotenoides son empleados en la industria en forma de emulsiones, suspensiones coloidales y complejos con proteínas que derivan su uso en productos como margarinas, mantequillas, jugos de frutas, bebidas, sopas enlatadas y lácteos (Li et al., 2018). Sin embargo, los carotenoides son compuestos complejos dada su alta lipofiliidad, la presencia de insaturaciones y la alta sensibilidad al aire, luz y pH, que podrían afectar su uso como aditivos en alimentos (Mendes et al., 2014).

Dicho lo anterior, resulta relevante estudiar la estabilidad de los carotenoides ya que esta se relaciona con la resistencia de los lípidos a los efectos del oxígeno y la temperatura, teniendo en cuenta que la oxidación lipídica genera pérdidas nutricionales y en la bioactividad, deterioro en la calidad de la matriz oleosa, generación de olores y sabores desagradables, e incluso desarrollo de compuestos dañinos para el organismo (Li et al., 2018). Esta estabilidad oxidativa tiene un efecto directo sobre la determinación de vida útil del compuesto o matriz estudiada, sus métodos de conservación y usos adecuados.

En este sentido, este capítulo estudió la estabilidad en almacenamiento del extracto oleoso de carotenoides de ahuyama a dos temperaturas (refrigeración y ambiente), evaluando durante 28 días los cambios en el contenido de carotenoides totales, color, índice de peróxidos e índice de p-anisidina. También se estudió mediante análisis termogravimétrico la estabilidad térmica del extracto de carotenoides de ahuyama obtenido mediante dos tecnologías de extracción (con agitación magnética y asistida con ultrasonido). Finalmente, se hizo la inclusión este colorante en un yogurt el cual fue almacenado en refrigeración durante 28 días, en los cuales se evaluó la variación de color y se comparó con un yogurt sin colorante y un yogurt con colorante artificial.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Estudio de estabilidad de extractos oleosos en almacenamiento

Se realizó un breve estudio de estabilidad en almacenamiento al extracto con mayor CCT, es decir, el CNV (relación matriz-solvente: 60%; tiempo de extracción: 24 h; CCT: 1244 ± 6 mg β -caroteno_{eq}/kg extracto) bajo dos condiciones de temperatura: 5°C y 20°C. Se almacenaron muestras de 30 mL de extracto en refrigeración (5°C) y a temperatura ambiente (20°C) en envases ámbar que fueron llenados completamente a fin de reducir el ingreso de aire. Las muestras fueron almacenadas durante 28 días y cada semana se tomó una muestra para evaluar su CCT, color, índice de peróxidos e índice de p-anisidina. Con base en estos resultados se realizó una cinética para cada parámetro evaluado. Cada análisis se realizó por duplicado.

- *Determinación de contenido de carotenoides totales por espectrofotometría UV-Vis*

Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.9.

- *Determinación del color de los extractos oleosos*

Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.10.

- *Determinación de peróxidos en aceite y extractos oleosos*

Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.11.

- *Determinación de índice de p-anisidina en aceite y extractos oleosos*

Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.12.

- *Análisis Termogravimétrico*

Se empleó un programa de calentamiento de rampa de 10°C/min de 25°C a 400°C y una etapa de calentamiento isotérmico a esta temperatura durante 30 minutos. Se empleó un flujo de oxígeno de 60 mL/min.

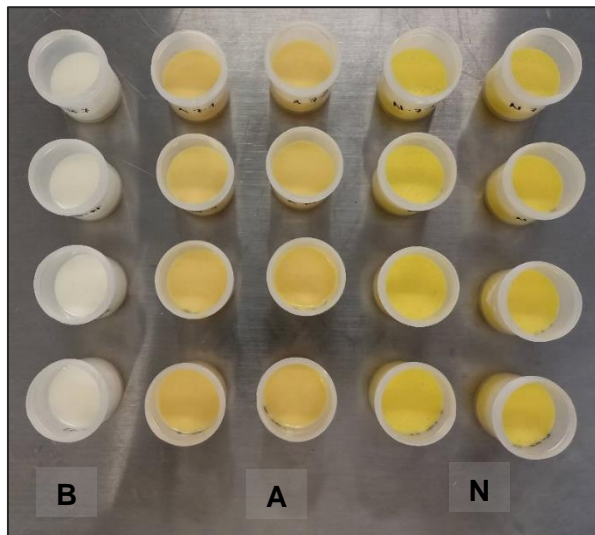
4.2.2 Inclusión de colorante en yogurt

Se adquirieron yogures naturales frescos sin dulce (grasa 3%; proteína 10%; carbohidratos 3%) en supermercados de cadena. Se prepararon tres grupos de yogures (25 g/muestra) así:

Grupo B	Grupo A	Grupo N
<i>Muestras control</i> Yogurt natural sin adición de colorantes	<i>Yogurt con colorante artificial</i> Adición de 0,0036% de colorante Amarillo No. 6 (E-110)	<i>Yogurt con extracto de carotenoides de ahuyama (colorante natural)</i> 0,6% de goma xantana + 1,84% de extracto oleoso fuente de carotenoides

Se aseguró que en el día 0 el ΔE entre los yogures del grupo A y los del grupo N fuera inferior a 2, a fin de asegurar que no hubiera diferencias perceptibles a la vista. Los yogures fueron almacenados en refrigeración (4°C) durante 28 días, y cada 8 días se tomaron muestras por triplicado, en las que se midió el color en el espacio CIELAB.

Figura 4-1: Yogures sin colorante (B), con colorante natural (N) y artificial (A)



- *Determinación del color en el yogurt*

Se siguió el procedimiento descrito en el numeral 3.2.10.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Análisis de estabilidad en almacenamiento de extractos

Se realizó un breve estudio de la estabilidad de los extractos oleosos en almacenamiento, donde se evaluó como variables de respuesta el CCT, color, índice de peróxidos e índice de p-anisidina. Estos resultados se pueden observar en la Figura 4-2.

En el CCT (Figura 4-2 (a)) el comportamiento fue muy similar tanto en temperatura de refrigeración como ambiente, donde se observó una leve disminución desde el día 0 hasta el día 21 y luego tendió a estabilizarse. Este comportamiento es acorde a lo reportado por Bechoff et al., (2015) donde afirman que la degradación de los carotenoides ocurre en las primeras semanas de almacenamiento y luego se reduce, tomando como principales causales de la degradación las altas temperaturas y la presencia de oxígeno. Sin embargo,

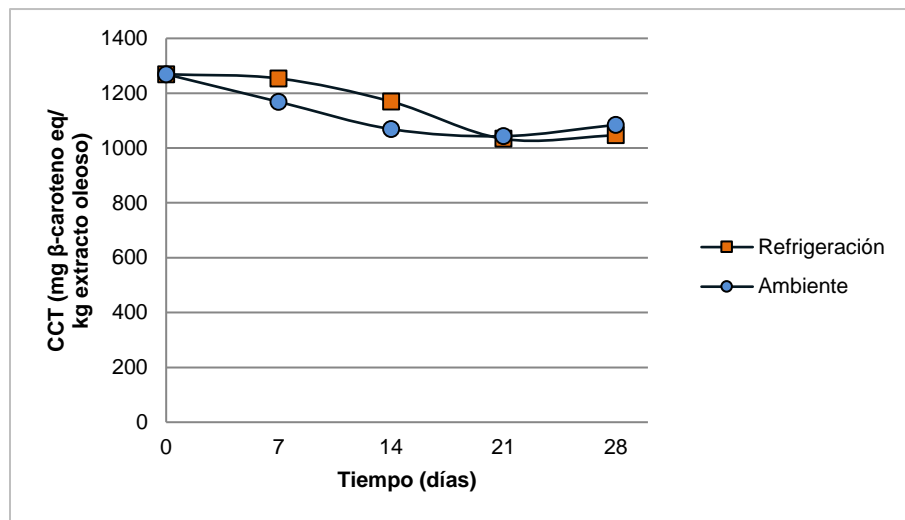
estos fueron factores que se contemplaron previo al almacenamiento de los extractos de carotenoides de ahuyama, por lo cual se emplearon envases ámbar los cuales se llenaron completamente, de igual manera, el aceite como solvente actúa como protector de los carotenoides (Delgado-Vargas et al., 2012). Gracias a estas condiciones, no hubo una degradación importante en el CCT durante los 28 días de almacenamiento (18% en refrigeración y 14% en temperatura ambiente), pero es posible que al envasar se hayan formado burbujas de aire que hayan podido afectar la retención de los carotenoides. Si bien no hubo cambios importantes en el contenido de carotenoides, a fin de conservar mejor el CCT, la mejor opción sería almacenar el extracto en refrigeración.

En cuanto al color (Figura 4-2 (b)), se observa también un comportamiento similar en las dos temperaturas de almacenamiento, donde hubo un aumento significativo en el ΔE desde el día 0 hasta el día 21, pero los cambios de color realmente perceptibles a la vista fueron después del día 15. Después del día 21, el ΔE tendió a disminuir. El cambio perceptible a la vista ($\Delta E > 3$) corresponde a los días en que el CCT disminuyó.

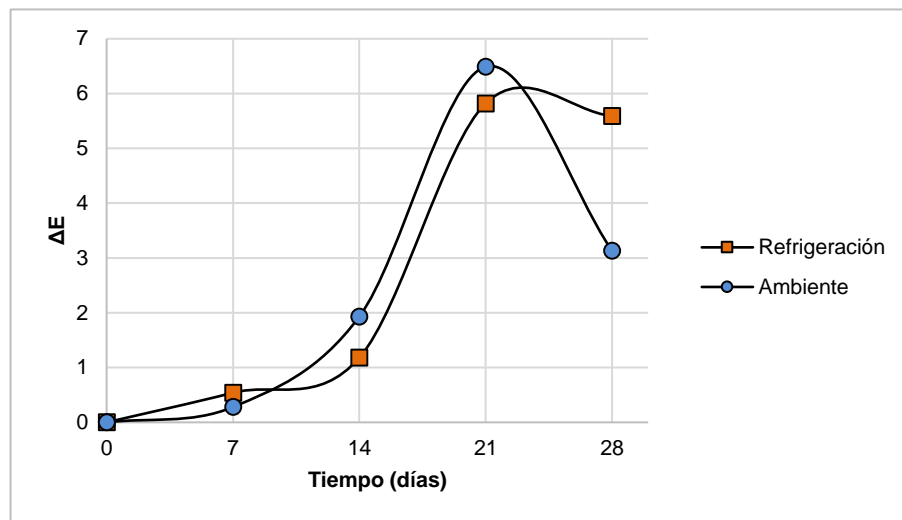
Para determinar la estabilidad oxidativa de los extractos obtenidos se determinó el índice de peróxidos (IP) para cuantificar los productos de oxidación primaria en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de muestra y se determinó el índice de p-anisidina (IpA) para cuantificar los productos de oxidación secundaria. Los resultados obtenidos se pueden ver en las Figuras 4-2(c) y 4-2(d), donde se observa que durante los 28 días de almacenamiento, el índice de peróxidos se mantuvo inferior al límite establecido por el Códex Alimentarius que es 10 mEq de oxígeno activo/kg de aceite. En general, el IP tendió a mantenerse constante pero fue hasta el día 21 donde mostró un aumento significativo, lo cual estaría relacionado con el comportamiento observado en el caso del CCT y del ΔE y que se podría atribuir a un efecto oxidativo del extracto. En razón a la presencia de cadenas hidrocarbonadas con presencia de dobles enlaces, los carotenoides son más propensos a sufrir reacciones de oxidación, isomerización y degradación térmica, lo que se ve aún más favorecido al ser estar el aceite de girasol compuesto principalmente por ácido linoleico, que tiende a acelerar la oxidación del β -caroteno (Delgado-Vargas et al., 2012; Rodríguez-Concepción et al., 2018). En el trabajo realizado por Montesano et al., (2019) encontraron que el aceite de oliva enriquecido con carotenoides de goji, mantuvo un IP constante durante 16 semanas de almacenamiento y solo se mostró un incremento al final del tiempo de almacenamiento.

Con respecto al IpA, se tomó como referente el aceite de girasol para comparar el comportamiento de los extractos, encontrando que la tendencia fue muy similar y que el extracto en general se mantuvo estable oxidativamente durante los 28 días de almacenamiento tanto a temperatura de refrigeración como ambiente, por lo que se podría afirmar que no hubo oxidación secundaria.

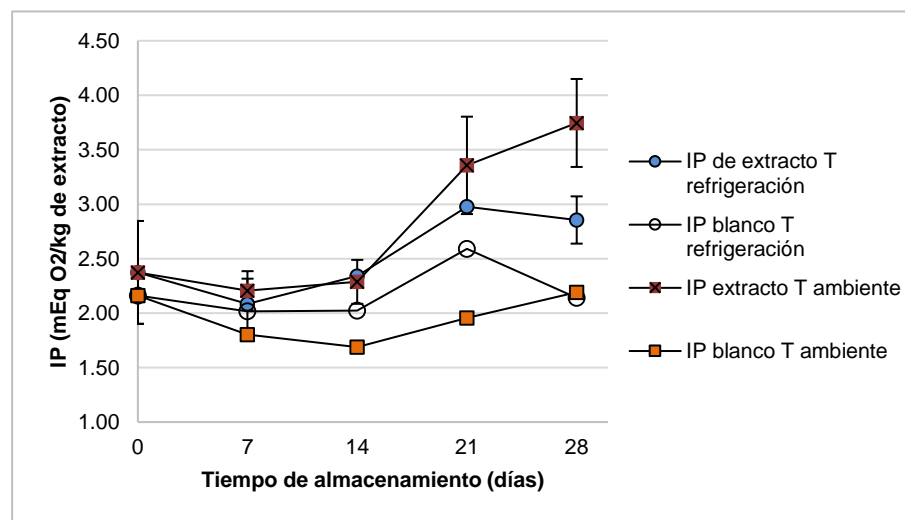
Figura 4-2: Cinética de extractos oleosos en almacenamiento



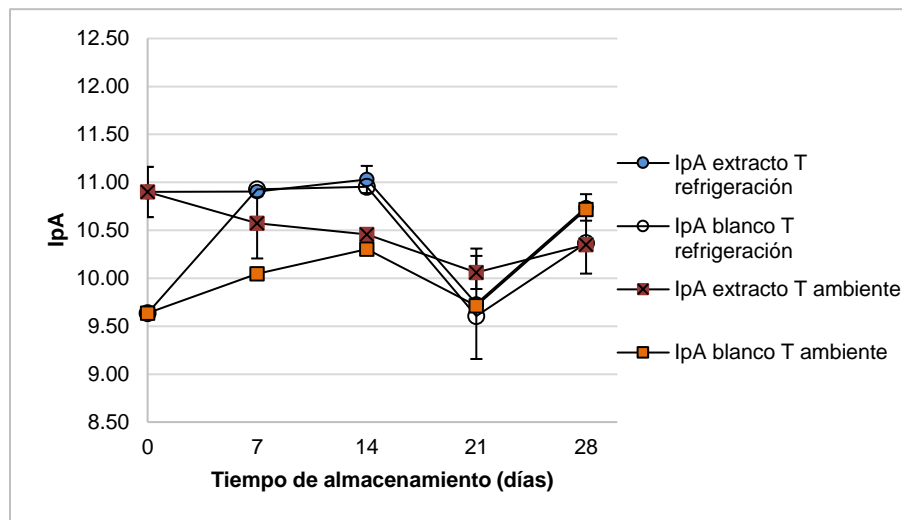
(a) Contenido de carotenoides (CCT)



(b) ΔE



(c) Índice de peróxidos (IP)



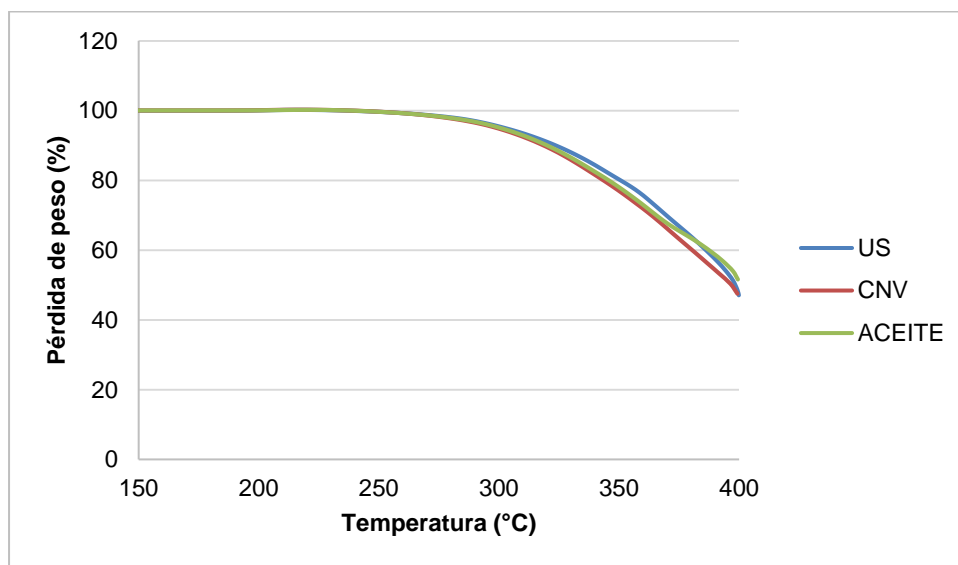
(d) Índice de p-anisidina (IpA)

4.3.2 Análisis termogravimétrico

Se evaluó la estabilidad térmica del extracto de carotenoides obtenido mediante extracción convencional (CNV), el extracto de carotenoides obtenido de forma asistida por ultrasonido (US) y el aceite de girasol (ACEITE) empleado como solvente de los extractos previamente mencionados a través de un programa de calentamiento bajo una dinámica de atmósfera de aire. A fin de comparar estas muestras, las condiciones térmicas fueron las mismas para todas.

En la Figura 4-3 se muestran las curvas de degradación térmica para las tres muestras evaluadas. Estas curvas de degradación térmica de los aceites están compuestas por tres etapas. La primera etapa corresponde al comienzo de la oxidación de las muestras que se caracteriza por un incremento en la masa inicial dado por la ganancia de oxígeno a través de la cadena de ácidos grasos, que da lugar a la formación de otros productos de oxidación -como los peróxidos- y también se destaca la pérdida exotérmica de los compuestos volátiles. Esta etapa se puede visualizar para las tres muestras a los 183°C aproximadamente. Este resultado es consistente con la temperatura de 182°C obtenida por Corbu et al., (2019) para aceite de girasol.

Figura 4-3: Curvas termogravimétricas para aceite de girasol (ACEITE), extracto de carotenoides obtenido mediante extracción convencional (CNV) y extracto de carotenoides obtenido de forma asistida con ultrasonido (US)



En la segunda etapa ocurre la descomposición de los ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico; en esta etapa los dobles enlaces se rompen y se convierten en enlaces sencillos, es decir en ácidos grasos saturados. Las temperaturas de degradación y porcentajes de pérdida de peso generados en esta etapa se muestran en la Tabla 4-1 donde se observa que la temperatura de degradación del aceite de girasol y del extracto CNV son muy similares, sin embargo, la temperatura de degradación del extracto US es mucho menor, lo que la hace más inestable térmicamente. Esto puede ser debido al efecto de la cavitación en el cual la temperatura del medio aumenta, lo que puede llevar a un mayor deterioro de los ácidos grasos poliinsaturados o los dobles enlaces conjugados (Hernández-Santos et al., 2016). También tiene relación el colapso de las burbujas generadas durante la sonicación, ya que se liberan muchas especies de oxígeno libre que aumentan los radicales presentes en el aceite y que inducen a la oxidación lipídica (Halim y Thoo, 2018).

A temperaturas superiores (entre 480°C y 550°C) ocurre la descomposición total de los ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (Gouveia de Souza et al., 2004).

Tabla 4-1: Efecto del calentamiento en muestras oleosas

Muestra	Temperatura de degradación (°C)	Pérdida de peso (%)
Aceite	238,1	82
CNV	238,7	80
US	235,9	82
















Es importante resaltar que la estabilidad de un aceite está dada en gran parte por su composición de ácidos grasos, ya que los ésteres con insaturaciones son más propensos a oxidarse, por esto son menos estables que aquellos aceites compuestos por enlaces sencillos en sus cadenas de carbono saturadas. El aceite de girasol está compuesto principalmente por ácido oleico (14%) y ácido linoleico (52%) (Li et al., 2018) que son ácidos grasos mono y poliinsaturados, lo que causa que el aceite de girasol sea inestable térmicamente. Teniendo en cuenta que los carotenoides sufren cambios estructurales y de degradación a altas temperaturas, es posible afirmar que durante la segunda etapa no hubo incidencia o efecto prooxidante de estos pigmentos en razón a que ya habían sido descompuestos térmicamente en la primera etapa (Corbu et al., 2019), por lo que la diferencia de estabilidad térmica de los extractos se atribuye directamente al proceso de extracción y su efecto en el aceite de girasol, empleado como solvente vegetal.

4.3.3 Evaluación del color en yogurt adicionado con colorante oleoso enriquecido con carotenoides

Se realizó la inclusión del colorante natural en un yogurt y se le hizo seguimiento al color durante 28 días. Este fue comparado con el color de un yogurt sin colorante y con el de un yogurt adicionado con colorante artificial (Amarillo No. 6). Los resultados se muestran en la Tabla 4-2. Se destaca que el colorante natural obtenido de ahuyama logró una coloración amarilla muy similar a la coloración dada por el pigmento artificial, donde el ΔE entre estos en el día 0 fue 1,68. En las muestras control, la luminosidad disminuyó, el croma se mantuvo constante y el tono aumentó, tomando una coloración más grisácea y clara. La luminosidad del grupo A y del grupo N estuvo comprendida entre 77 y 81,6 durante los 28 días de almacenamiento, mostrando que sus valores se mantuvieron altos. Los valores del croma tendieron a aumentar en las dos muestras con colorante, es decir se tornaron menos intensas. El tono en el grupo A tendió a disminuir lo que se puede relacionar con que el colorante artificial se siguió disolviendo con el paso del tiempo, acentuando la coloración del yogurt. En el grupo N el tono tendió a mantenerse constante en coloración amarilla, lo cual resulta favorable para este tipo de pigmentos que resultan ser muy sensibles a factores externos.

Para una mejor medida en el cambio del color de los yogures, se calculó el ΔE , el cual se muestra en la Figura 4-4 donde se observa la cinética de ΔE durante los 28 días de almacenamiento. Se observa que para las muestras con colorante el ΔE es superior a 3 previo al día 7, es decir en este momento los cambios de color son perceptibles a la vista humana. Las muestras del grupo A y del grupo N mostraron un comportamiento muy similar en el tiempo lo cual resulta conveniente ya que no hay variaciones muy perceptibles para el consumidor al momento de escoger el yogurt con colorante natural en comparación con un yogurt con colorante artificial.

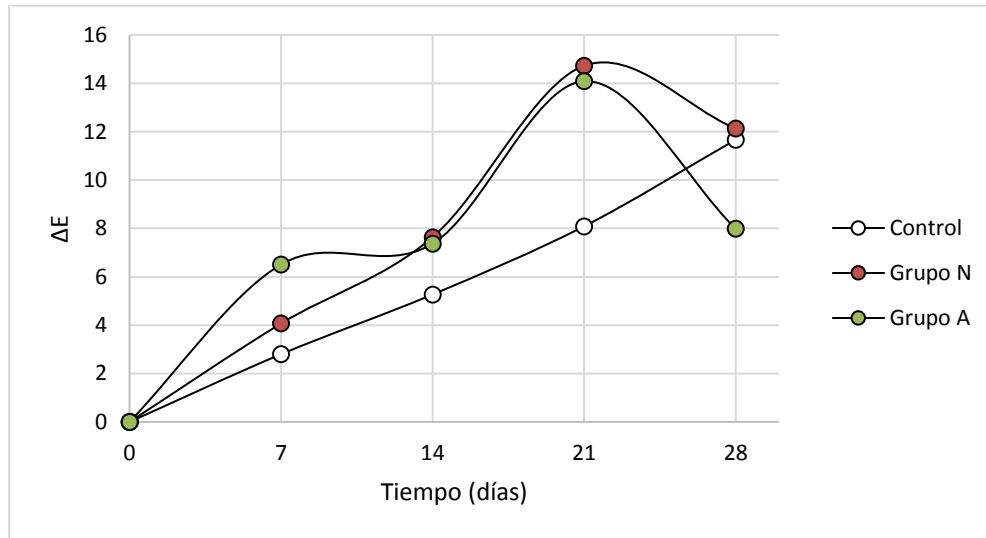
Tabla 4-2: Coordenadas de color para yogurt con y sin adición de colorantes

Día	Muestras control				Yogures grupo A				Yogures grupo N			
	L	Croma	Tono	Color	L	Croma	Tono	Color	L	Croma	Tono	Color
0	84,7 ± 0,2 ^d	4,6 ± 0,2 ^a	112,5 ± 1,1 ^a		81,6 ± 0,3 ^e	28,9 ± 0,5 ^a	97,9 ± 0,2 ^d		79,4 ± 0,5 ^d	31,5 ± 1,1 ^a	89,7 ± 0,1 ^b	
7	82,0 ± 0,0 ^{bc}	5 ± 0,0 ^a	116,9 ± 3,0 ^{ac}		77,7 ± 0,3 ^{bcd}	31,9 ± 0,5 ^c	89,6 ± 0,4 ^{bc}		78,2 ± 0,7 ^{cd}	35,1 ± 0,6 ^b	89,4 ± 0,2 ^{cd}	
14	79,5 ± 2,0 ^{ac}	5,3 ± 0,1 ^a	116,7 ± 0,3 ^{bc}		77,6 ± 0,4 ^{ac}	32,7 ± 0,6 ^{bc}	88,9 ± 0,3 ^{ac}		75,2 ± 0,8 ^b	38,3 ± 0,8 ^c	89,0 ± 0,3 ^{ac}	
21	73,1 ± 1,5 ^a	5,3 ± 0,7 ^a	123,3 ± 4,8 ^{bc}		77,0 ± 0,3 ^a	33,3 ± 0,3 ^b	88,8 ± 0,2 ^a		72,9 ± 1,2 ^a	43,1 ± 1,4 ^d	89,2 ± 0,1 ^{ac}	
28	74,3 ± 0,9 ^a	5,1 ± 0,4 ^a	125,6 ± 2,9 ^{bc}		77,3 ± 0,4 ^{ad}	33,1 ± 0,5 ^b	88,5 ± 0,2 ^a		73,1 ± 0,3 ^a	38,7 ± 1,2 ^{ce}	89,6 ± 0,5 ^{ad}	

Muestras control: Yogurt sin adición de colorante; Grupo A: yogurt + colorante artificial (Amarillo N. 6); Grupo N: yogurt + colorante natural. Letras diferentes corresponden a diferencias significativas en el tiempo para la misma muestra.

Así mismo, se calcula que una porción de yogurt de 200 g con adición de 1,8% de extracto colorante de ahuyama tendría un aporte del 12% al requerimiento diario de Vitamina A, de acuerdo con la normatividad colombiana. (Resolución 810 de 2021)

Figura 4-4 Variación del color en yogurt con y sin colorantes



4.4 Conclusiones parciales

El estudio de estabilidad del extracto de carotenoides de ahuyama permitió observar su comportamiento en diferentes condiciones de almacenamiento, evidenciando la persistencia del color (valores de tono constantes durante todo el almacenamiento), estabilidad oxidativa (valor de peróxidos inferior a 10 mEq. O₂/kg de aceite) y una baja reducción de carotenoides (máximo 18%).

El análisis termogravimétrico es un método adecuado para determinar la estabilidad térmica de muestras oleosas y para esto se debe considerar la presencia de ácidos grasos poliinsaturados, ya que esta favorece la degradación térmica de los lípidos. Las temperaturas de degradación térmica para los extractos CNV y US fueron 238,7 y 235,9, respectivamente.

La adición del colorante natural en el yogurt permitió obtener una coloración similar a la de un yogurt adicionado con colorante artificial, con una ventaja adicional y es su aporte al requerimiento diario de vitamina A.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Se puede considerar la ahuyama *Cucurbita moschata* Duch como una fuente rica en compuestos carotenoides donde predomina el β -caroteno, la luteína y el α -caroteno. Estos pigmentos brindan coloraciones amarillo naranja intensos que adicionalmente tienen propiedades antioxidantes y con actividad provitamina A, lo que la hace una matriz de importancia y viabilidad agroindustrialmente.

Con el objetivo de obtener los compuestos carotenoides de la pulpa de ahuyama, es necesario realizar procesos de adecuación como secado y molienda que, aunque generan una reducción en el contenido de carotenoides, permiten obtener una matriz estable oxidativa y microbiológicamente con un tamaño de partícula adecuado para emplear en los procesos de extracción.

Las metodologías de extracción empleadas permitieron acceder a los carotenoides obteniendo unas eficiencias importantes. En el caso de la extracción convencional, se logró un CCT de 1244 ± 6 mg β -caroteno _{eq}/kg extracto oleoso con una eficiencia de extracción de 85%, y en el caso de la extracción asistida con ultrasonido, el CCT fue de $1176,21 \pm 22,32$ mg β -caroteno _{eq}/kg extracto oleoso con una eficiencia del 80%. Los CCT entre las dos metodologías fueron muy similares, pero se destaca de la extracción asistida con ultrasonido que permitió obtener extractos fuente de carotenoides en un menor tiempo de extracción (15 minutos) en comparación con la metodología convencional (24 horas), lo que representa un relevante ahorro energético.

El extracto fuente de carotenoides de ahuyama arrojó valores de oxidación primaria aptos para su empleo como aditivos, al ser inferiores a 10 mEq. O₂/kg de aceite, por lo que se podría considerar como un colorante de buena calidad.

Se evidenció que el proceso de ultrasonido tiene un efecto importante sobre la estabilidad térmica del colorante natural, dados los efectos de la cavitación sobre el aumento de temperatura y la incorporación de oxígeno. Se encontró que el aceite de girasol y el extracto obtenido convencionalmente fueron más estables térmicamente.

El colorante natural de ahuyama mostró una buena aptitud como aditivo al demostrar que da pigmentaciones similares a las obtenidas por colorantes artificiales y que es una buena fuente de provitamina A.


5.2 Recomendaciones

Se recomienda evaluar coberturas o pretratamientos que protejan la pulpa de ahuyama durante el secado, a fin de disminuir la degradación de carotenoides.

Se sugiere evaluar la estabilidad del colorante natural en otras matrices como de panificación y snacks.

A. Anexo: Ficha técnica de colorante natural obtenido a partir de ahuyama

Entidad	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá
Proyecto	“Estudio espectroscópico y perfil de compuestos carotenoides de matrices alimentarias con alto potencial agroindustrial para la extracción y microencapsulación de colorantes amarillo-naranja”
Coordinador Técnico	Sandra Ballesta Santana
Equipo técnico	Carlos Fuenmayor, Consuelo Díaz, Sandra Ballesta
Nombre del Producto	Colorante natural de ahuyama
Breve descripción del proceso de elaboración	<ol style="list-style-type: none"> 1. Adecuación ahuyama 2. Secado de ahuyama 3. Molienda de ahuyama 4. Extracción por agitación continua de carotenoides empleando aceite de girasol como solvente 5. Centrifugación 6. Envase
Objetivo del producto	Pigmentar alimentos
Objetivo del Documento	Exponer el procedimiento técnico para la elaboración de un colorante natural fuente de carotenoides empleando como materias primas ahuyama y aceite de girasol

Definiciones	Colorante natural: Es la sustancia obtenida a partir de un vegetal o eventualmente de un animal, cuyo principio colorante ha sido aislado mediante proceso tecnológico adecuado. (Ministerio de salud, Resolución 10593 de 1985)
Descripción del producto	Extracto natural oleoso fuente de carotenoides de ahuyama
¿Qué diferencia al producto?	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Propiedades funcionales, capacidad antioxidante ▫ Fuente de Vitamina A ▫ Para su desarrollo se apoya la agricultura colombiana ▫ Capital humano colombiano
Beneficios del producto (para el consumidor)	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Al emplear ahuyama como materia prima, se reducen las pérdidas postcosecha generadas en la cadena agrícola ▫ Al ser un colorante en matriz oleosa, se promueve su biodisponibilidad en el organismo
Empaque y Presentación	<p>Envases ámbar de vidrio en presentaciones de 20 g, 100 g y 300 g.</p> 
Mercado	Orientado a personas en búsqueda de alimentación saludable, sin conservantes químicos, que buscan alternativas a los aditivos colorantes convencionales
Conservación del producto	Almacenamiento en refrigeración (5°C). Mantener envase con tapa
Características generales y beneficios	Colorante natural oleoso fuente de carotenoides con aporte al requerimiento diario de Vitamina A. Presentaciones de 20 g, 100 g y 300 g.

esperados por el consumidor en el producto	Soluble en matrices alimentarias oleosas.	
Características organolépticas	Olor	Ligeramente a ahuyama
	Sabor	Ligeramente a ahuyama
	Textura	Líquida aceitosa
	Color	Naranja
Normatividad regente sobre el producto	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Resolución 2154 de 2012 ▫ Resolución 10593 de 1985 	
Equipos utilizados	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Horno ▫ Molino ▫ Tanque agitador ▫ Centrífuga ▫ Nevera 	
Ingredientes mínimos	<ul style="list-style-type: none"> ▫ Ahuyama ▫ Aceite de girasol 	
Utensilios necesarios para la preparación	Cuchillos, balanza, jarras, envases ámbar	
Empaques utilizados	Envases de vidrio ámbar con tapa	
Formulación del producto	Formulación para obtener 15 g de colorante natural de ahuyama	
	Ingredientes	Cantidad (g)
	Ahuyama en polvo	60
	Aceite de girasol	40

<p>Composición del producto</p>	<p>Aceite de girasol Carotenoides totales: 1240 mg β-caroteno_{eq}/kg colorante Carotenoides individuales: □ Luteína: 109 μg/g colorante □ β-caroteno: 145 μg/g colorante □ α-caroteno: 44 μg/g colorante</p>
<p>Procedimiento de elaboración</p>	<pre> graph TD 1["1 Alistamiento de ahuyama Pelado, porcionamiento y tajado de ahuyama hasta un espesor de 1 mm"] --> 2["2 Secado de ahuyama Temperatura: 58°C Tiempo: horas"] 2 --> 3["3 Molienda de ahuyama Hasta obtener un tamaño de partícula de aproximadamente 0,7 mm"] 3 --> 4["4 Extracción Calcular una relación 60:40 de ahuyama: aceite. Pesar primero el aceite y luego la ahuyama en polvo. Mezclar en tanque de agitación"] 4 --> 5["5 Centrifugación Realizar centrifugaciones sucesivas hasta que no se logre extraer más colorante. Filtrar el colorante a fin de asegurar que no pasen sólidos"] 5 --> 6["6 Envasado Se debe realizar en condiciones de oscuridad, procurando exponer lo menos posible el colorante a la luz, humedad y aire. Llenar hasta el tope del envase y tapar"] 6 --> 7["7 Almacenamiento En condiciones de refrigeración"] </pre>

Instrucciones de consumo	Después de abierto, consúmase en el menor tiempo posible.
Sistema de distribución	Tiendas naturistas, redes sociales, página web

Bibliografía

- Agronet. (2018). *Reporte: Área, Producción y Rendimiento Nacional por Cultivo: Ahuyama*. <https://www.agronet.gov.co/estadistica/paginas/home.aspx?cod=1>
- Albanese, D., Adiletta, G., D'Acunto, M., Cinquanta, L., y di Matteo, M. (2014). Tomato peel drying and carotenoids stability of the extracts. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(11), 2458–2463. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12602>
- American Oil Chemists' Society. (2017). *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS* (7th ed.).
- Annisa, A., Suryono, S., Suseno, J., y Kurniawati, R. (2018). Ultrasound-assisted extraction optimization of phenolic compounds from *Psidium guajava* L. using artificial neural network-genetic algorithm Related content The Best Extraction Technique for Kaempferol and Quercetin Isolation from Guava Leaves (*Psidium guajava*). *Journal of Physics: Conference Series*, 1025. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1025/1/012020>
- AOAC. (2012). *Official Method of Analysis: Association of Analytical Chemists* (G. Latimer, Ed.; 19th ed.). AOAC International.
- Assous, M. T. M., Saad, E. M. S., & Dyab, A. S. (2014). Enhancement of quality attributes of canned pumpkin and pineapple. *Annals of Agricultural Sciences*, 59(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2014.06.002>
- Azizah, A. H., Wee, K. C., Azizah, O., y Azizah, M. (2009). Effect of boiling and stir frying on total phenolics, carotenoids and radical scavenging of pumpkin *Cucurbita moschata*. *International Food Research Journal*, 16, 45–51.
- Baiano, A., y del Nobile, M. A. (2015). Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 2053–2068. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.812059>
- Barreiro, J., y Sandoval, A. (2002). *Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas* (Equinoccio, Ed.). https://www.researchgate.net/publication/299461004_Operaciones_de_Conservacion_de_Alimentos_por_Bajas_Temperaturas
- Bechoff, A. (2010). *Investigating carotenoid loss after drying and storage of orange-fleshed sweet potato*. University of Greenwich.

- Bechoff, A., Chijioke, U., Tomlins, K. I., Govinden, P., Ilona, P., Westby, A., y Boy, E. (2015). Carotenoid stability during storage of yellow gari made from biofortified cassava or with palm oil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 44, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.002>
- Becker, D. (2016). Color Measurement. In *Color trends and selection for product design: every color sells a story* (1st ed.). Plastics Design Library.
- Bergantin, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Font, G., Manyes, L., y Marchetti, N. (2018). HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS determination of major carotenoids and their bioaccessibility from “delica” (*Cucurbita máxima*) and “violina” (*Cucurbita moschata*) pumpkins as food traceability markers. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/molecules23112791>
- Boon, C. S., McClements, D. J., Weiss, J., y Decker, E. A. (2010). Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(6), 515–532. <https://doi.org/10.1080/10408390802565889>
- Carocho, M., Morales, P., y Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 45, Issue 2, pp. 284–295). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.007>
- Cásseres, E. (1981). *Producción de hortalizas* (IICA, Ed.; 3rd ed.).
- Catalán, L. F. (2016). *Extracción y caracterización de β -caroteno obtenido de la cáscara de banano (*Musa paradisiaca* L.) evaluando el rendimiento de tres diferentes solventes de distinta polaridad para su utilización como colorante natural a escala laboratorio*. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Chemat, F., Fabiano-Tixier, A. S., Vian, M. A., Allaf, T., y Vorobiev, E. (2015). Solvent-free extraction of food and natural products. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 71, pp. 157–168). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.021>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., y Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. In *Ultrasonics Sonochemistry* (Vol. 34, pp. 540–560). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chemat, F., Vian, M. A., y Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: Concept and principles. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8615–8627. <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chuyen, H. v., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., y Parks, S. E. (2017). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac

- peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science and Nutrition*, 6(1), 189–196. <https://doi.org/10.1002/fsn3.546>
- Corbu, A. R., Rotaru, A., y Nour, V. (2019). Edible vegetable oils enriched with carotenoids extracted from by-products of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *sinensis*): the investigation of some characteristic properties, oxidative stability and the effect on thermal behaviour. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 142(2), 735–747. <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08875-5>
- de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. de O., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A., y Ramos, S. R. R. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.07.040>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O., y Francis, F. J. (2012). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Demiray, E., Tulek, Y., y Yilmaz, Y. (2013). Degradation kinetics of lycopene, β -carotene and ascorbic acid in tomatoes during hot air drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.001>
- Departamento Nacional de Planeación. (2016, April). *Pérdida y desperdicio de alimentos en Colombia - Estudio de la Dirección de Seguimiento y Evaluación de Políticas Públicas*. https://mrv.dnp.gov.co/Documentos%20de%20Interes/Perdida_y_Desperdicio_de_Alimentos_en_colombia.pdf
- FDA. (2010). *Overview of Food Ingredients, Additives y Colors | FDA*. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>
- Freedman, B. (2021). *Gourd Family (Cucurbitaceae)*. The Gale Encyclopedia of Science. <https://www.encyclopedia.com/science-and-technology/biographies/genetics-and-genetic-engineering-biographies/cucurbitaceae>
- Gajic, I. M. S., Savic, I. M., Gajic, D. G., y Dasic, A. (2021). Ultrasound-assisted extraction of carotenoids from orange peel using olive oil and its encapsulation in ca-alginate beads. *Biomolecules*, 11(2), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11020225>
- García-Pacheco, Y. E., Prieto-Tapias, M. J., y Fuenmayor, C. A. (2016). Cinética, modelación y pérdidas de carotenoides para el secado de ahuyama (*Cucurbita moschata*) en cubos. *Agronomía Colombiana*, 32, S57-S576. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58382>

- Gerardi, C., Tommasi, N., Albano, C., Blando, F., Rescio, L., Pinthus, E., y Mita, G. (2015). *Prunus mahaleb* L. fruit extracts: a novel source for natural food pigments. *European Food Research and Technology*, 241(5), 683–695.
- Ghosh, S., Sarkar, T., Das, A., Chakraborty, R., (2022). Natural colorants from plant pigments and their encapsulation: An emerging window for the food industry. *LWT – Food science and technology*. V: 153 (1-12). doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112527
- González Cárdenas, I. A. (2010). Caracterización química del color de diferentes variedades de guayaba (*Psidium guajava* L.) colombiana. *Tesis*, 84.
- Goula, A. M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil - Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 492–498. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.10.009>
- Goula, A. M., Ververi, M., Adamopoulou, A., y Kaderides, K. (2017). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids from pomegranate wastes using vegetable oils. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.07.022>
- Gouveia de Souza, A., Oliveira Santos, J. C., Conceição, M. M., Dantas Silva, M. C., y Prasad, S. (2004). A thermoanalytic and kinetic study of sunflower oil. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(02), 265–273.
- Grant, A., y Parveen, S. (2017). All natural and clean-label preservatives and antimicrobial agents used during poultry processing and packaging. In *Journal of Food Protection* (Vol. 80, Issue 4, pp. 540–544). International Association for Food Protection. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-146>
- Guiné, R. P. F., Pinho, S., y Barroca, M. J. (2011). Study of the convective drying of pumpkin (*Cucurbita máxima*). *Food and Bioproducts Processing*, 89(4), 422–428. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.09.001>
- Häckl, K., y Kunz, W. (2018). Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 572–580. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.03.010>
- Halim, H. H., y Thoo, Y. Y. (2018). Effect of ultrasound treatment on oxidative stability of sunflower oil and palm oil. In *Article in International Food Research Journal*. <http://www.ifrj.upm.edu.my>
- Handayani, A. D., Sutrisno, Indraswati, N., y Ismadji, S. (2008). Extraction of astaxanthin from giant tiger (*Panaeus monodon*) shrimp waste using palm oil: Studies of extraction kinetics and thermodynamic. *Bioresource Technology*, 99(10), 4414–4419. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.028>

- Hernández-Santos, B., Rodríguez-Miranda, J., Herman-Lara, E., Torruco-Uco, J. G., Carmona-García, R., Juárez-Barrientos, J. M., Chávez-Zamudio, R., y Martínez-Sánchez, C. E. (2016). Effect of oil extraction assisted by ultrasound on the physicochemical properties and fatty acid profile of pumpkin seed oil (*Cucurbita pepo*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 429–436. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.01.029>
- Hooshmand, H., Shabanpour, B., Moosavi-Nasab, M., y Golmakani, M. T. (2017). Optimization of carotenoids extraction from blue crab (*Portunus pelagicus*) and shrimp (*Penaeus semisulcatus*) wastes using organic solvents and vegetable oils. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.13171>
- ICBF. (2005). *Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia*.
- Iltle, R. A., y Kabelka, E. A. (2009). Correlation Between Lab Color Space Values and Carotenoid Content in Pumpkins and Squash (*Cucurbita* spp.). *HortScience*, 44(3), 633–637.
- Jacobo-Valenzuela, N., Maróstica-Junior, M. R., Zazueta-Morales, J. de J., y Gallegos-Infante, J. A. (2011). Physicochemical, technological properties, and health-benefits of *Cucurbita moschata* Duchense vs. Cehualca. A Review. *Food Research International*, 44(9), 2587–2593. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.039>
- Jones, S. T., Aryana, K. J., y Losso, J. N. (2005). Storage stability of lutein during ripening of cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1661–1670. [doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72838-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72838-1)
- Kaur, P., Elsayed, A., Subramanin, J., Singh, A. (2021). Encapsulation of carotenoids with sucrose by co-crystallization: Physicochemical properties, characterization and thermal stability of pigments. *LWT – Food science and technology*. 140, 110810, 1-10 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110810>
- Kim, D. Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J. I., Lee, K., Park, J. Y., Chang, W. S., Lee, J. S., y Oh, Y. K. (2016). Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. In *Bioresource Technology* (Vol. 199, pp. 300–310). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Kim, S., Park, J.-B., y Hwang, I.-K. (2002). *Quality Attributes of Various Varieties of Korean Red Pepper Powders (Capsicum annuum L.) and Color Stability During Sunlight Exposure*. 67.
- Konica Minolta. (2014). *Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B* - Konica Minolta Sensing*. <https://sensing.konicaminolta.us/mx/blog/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Kourouma, V., Mu, T.-H., Zhang, M., y Sun, H.-N. (2019). Effects of cooking process on carotenoids and antioxidant activity of orange-fleshed sweet potato. *LWT*, 104, 134–141. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.01.011>

- Kristianto, Y., Wignyanto, W., Argo, B. D., y Santoso, I. (2021). Antioxidant increase by response surface optimization and bayesian neural network modelling of pumpkin (*Cucurbita moschata* duch) freezing. *Food Research*, 5(3), 73–82. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.5\(3\).598](https://doi.org/10.26656/fr.2017.5(3).598)
- Leong, H. Y., Show, P. L., Lim, M. H., Ooi, C. W., y Ling, T. C. (2018). Natural red pigments from plants and their health benefits: A review. In *Food Reviews International* (Vol. 34, Issue 5, pp. 463–482). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/87559129.2017.1326935>
- Li, J., Liu, J., Sun, X., y Liu, Y. (2018). The mathematical prediction model for the oxidative stability of vegetable oils by the main fatty acids composition and thermogravimetric analysis. *LWT*, 96, 51–57. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.003>.
- Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Tomao, V., Cravotto, G., y Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.07.005>
- Markets and markets. (2020). *Natural Food Colors & Flavors Market Trends, Growth, Industry Analysis - Forecasts to 2025 | Covid-19 Impact Analysis*. https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/natural-colors-flavors-market-676.html?utm_medium=Email&utm_source=HSFB-NA-%20Natural-Food-Colors-%26-Flavors-Market-6-Nov-20
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., y Ferreira, I. C. F. R. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1–15. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.03.009>
- Mendes, L., Petit, N., Gonçalves Costa, V., Falcão, D. Q., y de Lima Araújo, K. G. (2014). *Inclusion complexes of red bell pepper pigments with b-cyclodextrin: Preparation, characterisation and application as natural colorant in yogurt*. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.065>
- Mezzomo, N., y Ferreira, S. R. S. (2016). Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *Journal of Chemistry*, 2016, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/3164312>
- Mezzomo, N., Maestri, B., dos Santos, R. L., Maraschin, M., y Ferreira, S. R. S. (2011). Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: Influence of extraction method on carotenoid concentration. *Talanta*, 85(3), 1383–1391. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.06.018>
- Mínguez, M., Pérez, A., y Hornero, D. (2005). *Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales: mucho más que simples “colorantes” naturales*.

- Minsalud. (2015). *Estrategia nacional para la prevención y control de las deficiencias de micronutrientes en Colombia 2014 – 2021*. <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/SNA/Estrategia-nacional-prevencion-control-deficiencia-micronutrientes.pdf>
- Montesano, D., Rocchetti, G., Cossignani, L., Senizza, B., Pollini, L., Lucini, L., y Blasi, F. (2019). Untargeted metabolomics to evaluate the stability of extra-virgin olive oil with added *Lycium barbarum* carotenoids during storage. *Foods*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/foods8060179>
- Mutsokoti, L., Panozzo, A., Tongonya, J., Kebede, B. T., van Loey, A., y Hendrickx, M. (2017). Carotenoid stability and lipid oxidation during storage of low-fat carrot and tomato based systems. *LWT - Food Science and Technology*, 80, 470–478. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.021>
- Nagarajan, J., Nagasundara, R., Eshwaraiah, M., Galanakis, C., y Prasad, N. (2017). Carotenoids. In *Antioxidants in Higher Plants*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1201/9781315149899>
- Norshazila, S., Koy, C., Rashidi, O., Ho, L., Azrina, I., Nurul, Z. R., y Zarinah, Z. (2017). The Effect of Time, Temperature and Solid to Solvent Ratio on Pumpkin Carotenoids Extracted Using Food Grade Solvents. *Sains Malaysiana*, 46(2), 231–237. <https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4602-07>
- Nour, V., Corbu, A. R., Rotaru, P., Karageorgou, I., y Lalas, S. (2018). Effect of carotenoids, extracted from dry tomato waste, on the stability and characteristics of various vegetable oils. *Grasas y Aceites*, 69(1). <https://doi.org/10.3989/gya.0994171>
- Onwude, D. I., Hashim, N., Janius, R. B., Nawi, N., y Abdan, K. (2016). Modelling effective moisture diffusivity of pumpkin (*Cucurbita moschata*) slices under convective hot air drying condition. *International Journal of Food Engineering*, 12(5), 481–489. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0382>
- Ordoñez-Santos, L. E., Martínez-Girón, J., y Rodríguez-Rodríguez, D. X. (2019). Extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) peel by means of ultrasound application and vegetable oil. *DYNA (Colombia)*, 86(209), 91–96. <https://doi.org/10.15446/dyna.v85n207.74840>
- Ordóñez-Santos, L. E., Pinzón-Zarate, L. X., y González-Salcedo, L. O. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 560–566. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.010>
- Ortiz Grisales, S. (2012). *Fruto y semilla de Cucurbita moschata fuente de carotenoides y aceite con valor agregado* (Vol. 30, Issue 2).

- Pagels, F., Salvaterra, D., Amaro, H. M., Lopes, G., Sousa-Pinto, I., Vasconcelos, V., y Guedes, A. C. (2020). Bioactive potential of *Cyanobium* sp. pigment-rich extracts. *Journal of Applied Phycology*, 32(5), 3031–3040. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02213-1>
- Pandurangaiah, S., y Rao, S. D. (2020). Carotenoid Content in Cherry Tomatoes Correlated to the Color Space Values L*, a*, b*: A Non-destructive Method of Estimation. In *J. Hortl. Sci* (Vol. 15, Issue 1).
- Patsilidakos, A., Ragno, R., Carradori, S., Petralito, S., y Cesa, S. (2018). Carotenoid content of Goji berries: CIELAB, HPLC-DAD analyses and quantitative correlation. *Food Chemistry*, 268(May), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.013>
- Paznocht, L., Kotíková, Z., Orsák, M., Lachman, J., y Martinek, P. (2019). Carotenoid changes of colored-grain wheat flours during bun-making. *Food Chemistry*, 277, 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.019>
- Perrier, A., Delsart, C., Boussetta, N., Grimi, N., Citeau, M., y Vorobiev, E. (2017). Effect of ultrasound and green solvents addition on the oil extraction efficiency from rapeseed flakes. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.003>
- Pignitter, M., & Somoza, V. (2012). Critical Evaluation of Methods for the Measurement of Oxidative Rancidity in Vegetable Oils. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20(3), 772–777. <https://doi.org/10.6227/jfda.2012200305>
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., & Chemat, F. (2013). Ultrasound-assisted extraction. *RSC Green Chemistry*, 89–112. <https://doi.org/10.1039/9781849737579-00089>
- Portillo-López, R., Morales-Contreras, B. E., Lozano-Guzmán, E., Basilio-Heredia, J., Mui-Rangel, M. D., Ochoa-Martínez, L. A., Rosas-Flores, W., y Morales-Castro, J. (2021). Vegetable oils as green solvents for carotenoid extraction from pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber) byproducts: Optimization of extraction parameters. *Journal of Food Science*, 86(7), 3122–3136. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15815>
- Priori, D., Valduga, E., Branco, J., Mistura, C., Vizzotto, M., Valgas, R., y Barbieri, R. (2017). Characterization of bioactive compounds, antioxidant activity and minerals in landraces of pumpkin (*Cucurbita moschata*) cultivated in Southern Brazil. *Food Science and Technology*, 37(1), 33–40. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.05016>
- Provesi, J. G., y Amante, E. R. (2015). Carotenoids in Pumpkin and Impact of Processing Treatments and Storage. In *Processing and Impact on Active Components in Food* (pp. 71–80). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00009-3>
- Provesi, J. G., Dias, C. O., y Amante, E. R. (2011). Changes in carotenoids during processing and storage of pumpkin puree. *Food Chemistry*, 128(1), 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.027>

- Quijano, N. (2020). *Evaluación de espectroscopía FTIR-ATR, colorimetría triestímulo y análisis de imagen como herramientas para la determinación de carotenoides en ahuyama*. Universidad Nacional de Colombia.
- Quintana, S. E., Marsiglia, R. M., Machacon, D., Torregroza, E., y Garcia-Zapateiro, L. A. (2018). Chemical composition and physicochemical properties of squash (*Cucurbita moschata*) cultivated in Bolivar department (Colombia). *Contemporary Engineering Sciences*, 11(21), 1003–1012. <https://doi.org/10.12988/CES.2018.8384>
- Rahimi, S., y Mikani, M. (2019). Lycopene green ultrasound-assisted extraction using edible oil accompany with response surface methodology (RSM) optimization performance: Application in tomato processing wastes. *Microchemical Journal*, 146, 1033–1042. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.039>
- Rammuni, M. N., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., y Attalage, R. A. (2019). Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*, 277, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.066>
- Razi, B., Bahij, R., Fretté, X., y Christensen, K. (2015). Influence of green solvent extraction on carotenoid yield from shrimp (*Pandalus borealis*) processing waste. *Journal of Food Engineering*, 155, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.009>
- Research Nester. (2015, August). *Natural Food Colors Market Size & Share | Industry Report, 2023*. <https://www.researchnester.com/reports/natural-food-colors-market/232>
- Rodriguez-Amaya, D. (2019). “Natural food pigments and colorants.” In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.08.004>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. In *Current Opinion in Food Science* (Vol. 7, pp. 20–26). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2018). Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>
- Rodriguez-Amaya, Delia. (1999). Carotenoides y Preparación de Alimentos: La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados. *Universidade Estadual de Capinas*, 99. <https://doi.org/10.3390/su8060570>
- Rodriguez, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., y Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

- Roohani, R., Einafshar, S., y Ghavidel, R. (2016). Effect of time and ultrasonic amplitude on extraction carotenoid compounds from saffron stamen 1 Introduction1 . In *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* (Vol. 18, Issue 4). <http://www.cigrjournal.org>
- Rutkowska, M., Namieśnik, J., y Konieczka, P. (2017). Ultrasound-Assisted Extraction. In *The Application of Green Solvents in Separation Processes* (pp. 301–324). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3>
- Sahar, A., Rahman, U. U., Aadil, R. M., y Ishaq, A. (2018). Stabilization of Carotenoids in Foods. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (Vol. 2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.21670-3>
- Saini, R., y Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Salazar-González, C., Díaz-Moreno, C., y Fuenmayor, C. A. (2019). Green extraction of carotenoids from bee pollen using sunflower oil: Evaluation of time and matrix-solvent ratio. *Chemical Engineering Transactions*, 75, 541–546. <https://doi.org/10.3303/CET1975091>
- Sánchez-Muniz, F. J., Bastida, S., & Benedí, J. (2016). Sunflower Oil. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 217–226). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00674-7>
- Saxena, A., Maity, T., Raju, P. S., y Bawa, A. S. (2012). Degradation Kinetics of Colour and Total Carotenoids in Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Bulb Slices During Hot Air Drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5(2), 672–679. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0409-2>
- Seremet, L., Botez, E., Nistor, O. V., Andronoiu, D. G., y Mocanu, G. D. (2016). Effect of different drying methods on moisture ratio and rehydration of pumpkin slices. *Food Chemistry*, 195, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.125>
- Sharma, M., y Bhat, R. (2021). Extraction of carotenoids from pumpkin peel and pulp: Comparison between innovative green extraction technologies (ultrasonic and microwave-assisted extractions using corn oil). *Foods*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/foods10040787>
- Sigurdson, G. T., Tang, P., y Giusti, M. M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. In *Annual Review of Food Science and Technology* (Vol. 8, pp. 261–280). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>
- Simal, S., A. Femenia, M.C. Garau y C. Rosselló. 2005. Use of exponential, Page's and diffusional models to simulate the drying kinetics of kiwi fruit. *J. Food Eng.* 66, 323-328. Doi: 10.1016/j.jfoodeng.2004.03.025

- Singh, A., Ahmad, S., y Ahmad, A. (2015). Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. *RSC Advances*, 5(77), 62358–62393. <https://doi.org/10.1039/c5ra10243j>
- Sogi, D., Siddiq, M., Dolan, M., (2015). Total phenolics, carotenoids and antioxidant properties of *Tommy Atkin* mango cubes as affected by drying techniques. (*LWT – Food science and technology*. 62(1), 564 – 568.
- Song, J., Wang, X., Li, D., Liu, C., Yang, Q., y Zhang, M. (2018). Effect of starch osmo-coating on carotenoids, colour and microstructure of dehydrated pumpkin slices. *Journal of Food Science and Technology*, 55(8), 3249–3256. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3258-z>
- Song, J., Yang, Q., Huang, W., Xiao, Y., Li, D., y Liu, C. (2018). Optimization of trans lutein from pumpkin (*Cucurbita moschata*) peel by ultrasound-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 107, 104–112. <https://doi.org/10.1016/J.FBP.2017.10.008>
- Stephenson, R. C., Ross, R. P., y Stanton, C. (2021). Carotenoids in milk and the potential for dairy based functional foods. In *Foods* (Vol. 10, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods10061263>
- Stinco, C. M., Rodríguez-Pulido, F., Escudero-Gilete, M. L., Gordillo, B., Vicario, I. M., Meléndez-Martínez, A., (2013). Lycopene isomers in fresh and processed tomato products: Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. *Food Research International*. 50, 111-120. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.011>
- Stoll, L., Rech, R., Flôres, S. H., Nachtigall, S. M. B., y de Oliveira Rios, A. (2019). Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. *Food Chemistry*, 281, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.100>
- Strati, I. F., y Oreopoulou, V. (2011). Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste. *International Journal of Food and Science Technology*, 46, 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02496.x>
- Strati, I. F., y Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products - A review. *Food Research International*, 65(PC), 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., y Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.05.014>
- TFO Canadá. (2012). *Colombia: El Mercado Canadiense de Ingredientes para Cosméticos 2012*.

- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013>
- Trivedi, N., Baghel, R. S., Bothwell, J., Gupta, V., Reddy, C. R. K., Lali, A. M., y Jha, B. (2016). An integrated process for the extraction of fuel and chemicals from marine macroalgal biomass. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep30728>
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., y Sharma, A. K. (2015). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 52, Issue 8, pp. 4669–4678). Springer India. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>
- USDA. (2018). *Food Composition Databases Show Foods -- Pumpkin, raw*. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/11422>
- U.S.D.A. (2019). *Pumpkin, raw*. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168448/nutrients>
- Vallejo Cabrera, F., y Estrada Salazar, E. (2004). *Producción de hortalizas de clima cálido* (Universidad Nacional de Colombia, Ed.).
- Vásquez, M. (2015). *Estimación de las coordenadas CIEL *a*b* en concentrados de tomate utilizando imágenes digitales*.
- Velásquez Reyes, G. A., y Carrillo Cetina, J. P. (2016). *Evaluación del efecto de las aplicaciones edáficas de diferentes niveles de nitrógeno sobre los componentes de rendimiento e incidencia de algunos problemas fitosanitarios en ahuyama valluna (Cucúrbita máxima)*.
- Vinatoru, M., Mason, T. J., y Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 97, pp. 159–178). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Xu, W. J., Zhai, J. W., Cui, Q., Liu, J. Z., Luo, M., Fu, Y. J., y Zu, Y. G. (2016). Ultra-turrax based ultrasound-assisted extraction of five organic acids from honeysuckle (*Lonicera japonica* Thunb.) and optimization of extraction process. *Separation and Purification Technology*, 166, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.04.003>
- Yara-Varón, E., Li, Y., Balcells, M., Canela-Garayoa, R., Fabiano-Tixier, A. S., y Chemat, F. (2017). Vegetable oils as alternative solvents for green oleo-extraction, purification and formulation of food and natural products. In *Molecules* (Vol. 22, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules22091474>

Zaccari, F., Cabrera, M. C., y Saadoun, A. (2017). Variation in glucose, α - And β -carotene and lutein content during storage time in winter squash type Butternut. *Acta Horticulturae*, 1151, 273–277. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1151.42>

Zalbidea Muñoz, M. A. (2017). *Nociones básicas sobre materiales colorantes*. Universidad Politécnica de Valencia, España. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/82159/Zalbidea%20-%20Nociones%20b%C3%A1sicas%20sobre%20materiales%20colorantes.pdf?sequence=1>.