

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y AMBIENTAL



EFFECTO DEL PROCESAMIENTO TÉRMICO DE ZANAHORIA (*D. CAROTA*) EN LA BIODISPONIBILIDAD DE β -CAROTENO OBTENIDA MEDIANTE ESTUDIOS *IN VITRO*

CAMILA ANDREA HAUCK SABADINI
MEMORIA DE TITULACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
INGENIERO CIVIL QUÍMICO

PROFESOR GUÍA: Dr. CRISTIAN RAMIREZ B.
PROFESOR GUÍA: Dr. RICARDO SIMPSON R.

Noviembre – 2017
VALPARAÍSO



Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los profesores Cristian Ramírez y Ricardo Simpson por darme la oportunidad de desarrollar esta memoria bajo su supervisión, especialmente al profesor Cristian Ramírez por su apoyo, disponibilidad y amistad.

Mi más cariñoso agradecimiento a mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional y por su ejemplo a seguir.

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio, por la buena convivencia y amistad, y al grupo BEST por su ayuda y disposición.

A mis amigos y a mi equipo de atletismo por enriquecer mi paso en la universidad día a día.

Finalmente le agradezco al proyecto Fondecyt 1160811 por su financiamiento en la realización de esta memoria.



Resumen

En el presente trabajo se investigó el efecto que tiene el procesamiento térmico de zanahoria y el rol que tiene la masticación en la bioaccesibilidad de β -caroteno mediante ensayos *in vitro*. Las variables del diseño de experimentos son los parámetros de esterilización (tiempo y temperatura de proceso), y la distribución de tamaño de la muestra.

Se tienen dos tratamientos térmicos de esterilización, un proceso térmico a 110°C por 66 min y a 120°C por 9 min, ambos con un valor de letalidad $F_0=6$ min.

La masticación reduce el tamaño del alimento, originando muestras con una distribución de tamaño de partículas determinadas por el número de ciclos de masticación y el tipo de alimento. Cubos de zanahoria cruda de 1 cm³ fueron masticados *in vitro* aplicando 10, 30 y 50 ciclos de masticación. Mediante un análisis de imágenes se caracterizó la distribución de tamaño de partícula de la muestra, ajustando esta al modelo de Rosin-Rammler. Se obtuvo el parámetro X_{50} , que representa la apertura de un tamiz teórico a través del cual puede pasar el 50% en peso de la muestra. Para los cubos de zanahoria procesada se aplicaron números de ciclos que originan un mismo X_{50} que la zanahoria cruda.

Para obtener el contenido bioaccesible, las muestras masticadas se digieren *in vitro* considerando una digestión gástrica de 30 min y luego una digestión intestinal de 120 min. Finalmente se analiza la digesta mediante espectrofotometría UV-Vis (451nm).

Los resultados indican que para una misma distribución de tamaños (i.e., $X_{50} = 0,7\text{mm}$), en el caso de muestras crudas se obtiene bioaccesibilidad de β -caroteno de 2,2%, la cual es menor a la obtenida en muestras procesadas, ya sea en aquellas a 110 °C (3,01%) como en aquellas procesadas a 120°C (6,34%). En cuanto a las muestras procesadas, para una misma distribución de tamaño ($X_{50}=0,8\text{mm}$), la bioaccesibilidad cuando se procesó a 110°C fue de 2,39%, y para las muestras procesadas a 120°C, este valor aumenta a un 5,73%.

En cuanto a la masticación, al aumentar los ciclos de masticación en la zanahoria cruda de 10 a 50 ($X_{50}=1\text{mm}$ a $X_{50}=0,7\text{mm}$, respectivamente) hay un aumento de 39% en la liberación de β -caroteno. Para un mismo cambio en la distribución de tamaño, la zanahoria procesada a 120°C tuvo un aumento de 69%.

Se puede concluir que la masticación es una etapa influyente en la bioaccesibilidad de β -caroteno. Por otro lado, los parámetros de procesamiento (tiempo y temperatura) en un proceso térmico cuya letalidad es de $F_0=6$ min, tienen un rol fundamental en el contenido de β -caroteno bioaccesible.



Abstract

The aim of this research is to evaluate the effect of mastication (particle size distribution) and thermal processing parameters (temperature and time), on β -carotene bioaccessibility in carrots.

Two combination of time and temperature were tested, one thermal process at 110°C for 66 minutes and other at 120°C for 9 minutes, both with an F_0 value of 6 min.

Chewing reduces the size of food, originating samples with particle size distribution determined by chewing cycles and food texture. Raw carrots cubes (1cm³) were masticated *in vitro* at 10, 30 and 50 chewing cycles. To determine particle size distribution, samples were scanned and image was analyzed, then samples were distributed according to Rosin Rammler function, obtaining X_{50} parameter, which represent the aperture of a theoretical sieve through which 50%(w/w) of the sample can pass. For thermal processed carrot cubes, different chewing cycles were tested to seek the particle size distribution originating the same distributions than raw carrots.

To determine bioaccessible content, masticated samples were put through *in vitro* digestion, containing a 30 minutes gastric stage and a 2-hour intestinal stage. Digesta was analyzed through UV-Vis spectroscopy at 451 nm wavelength.

Results indicates that for the same size distribution (i.e., $X_{50} = 0.07\text{cm}$), raw samples bioaccessibility is about 2,2%, while for thermal processed samples releasing was 3,01% for processed at 110°C and 6,34% for processed at 120°C. For thermal processed samples, process at 120°C demonstrate to improve bioaccessibility more than process at 110°C. At the same size distribution ($X_{50}=0,08$), process at 110°C bioaccessibility was 2,39%, while for process at 120°C this goes up to 5,73%.

Regarding mastication stage, raw carrots β -carotene release increases 39% when chewing cycles increase from 10 to 50 ($X_{50}=1\text{mm}$ to $X_{50}=0,7\text{mm}$, respectively). At that same change for size distribution (from $X_{50}=1\text{mm}$ to $X_{50}=0,7\text{mm}$), for samples processed at 120°C, release increase by 69%.

Therefore, it can be concluded that mastication stage has an important role in β -carotene bioaccessibility. Also, thermal processing parameters (time and temperature) are critical factor to bioaccessibility, even though they are equivalent in sterilization terms.



Índice

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Índice	5
Capítulo 1. Introducción	8
Hipótesis y Objetivos.....	9
Hipótesis.....	9
Objetivo general	9
Objetivos específicos	9
Capítulo 2: Antecedentes teóricos	10
2.1. Zanahoria y β -caroteno	10
2.2. Tratamiento térmico del alimento.....	12
2.2.1. Esterilización	12
2.2.2. Proceso de enlatado del alimento a procesar	16
2.2.3. Efecto de tratamiento térmico en el alimento	17
2.3. Proceso digestivo	18
2.3.1. Masticación.....	19
2.3.2. Masticación in vitro.....	20
2.3.3. Digestión estomacal	21
2.3.4. Digestión intestinal.....	22
2.3.5. Digestión in vitro	22
2.4. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad	23
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	26
3.1. Materia prima y reactivos.....	26
3.2. Equipos.....	26
3.3. Diseño de experimentos	27
3.4. Metodología experimental.....	27



3.4.1. Curva de calibración.....	27
3.4.2. Extracción de contenido total de β -caroteno	28
3.4.3. Preparación de muestras	29
3.4.4. Humedad.....	30
3.4.5. Tratamiento térmico	30
3.4.6. Medición de color y textura.....	35
3.4.7. Masticador	38
3.4.8. Análisis de tamaño de partículas post masticación	39
3.4.9. Digestión in vitro	40
3.4.10. Extracción de β -caroteno bioaccesible	41
3.4.11. Liofilización.....	42
3.4.12. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	44
Capítulo 4: Análisis y resultados.....	47
4.1. Tratamiento térmico	47
4.1.1. Proceso 1.....	47
4.1.2. Proceso 2.....	48
4.2. β -caroteno total	49
4.3. Parámetros de muestras.....	50
4.3.1. Humedad.....	50
4.3.2. Dureza.....	50
4.4. Efecto del procesamiento térmico en color del alimento	51
4.5. Masticación.....	52
4.5.1. Comparación métodos in vivo e in vitro	52
4.5.2. Efecto de los ciclos de masticación en el tamaño de partícula	54
4.6. Bioaccesibilidad de β -caroteno.....	56
4.6.1. Comparación según ciclos de masticación	57
4.6.2. Comparación según distribución de tamaño (X_{50}).....	60
4.6.3. Bioaccesibilidad (%)	62
4.4.7. Análisis estructural.....	63
Conclusiones	65



Referencias.....	66
Anexos	70
Anexo 1. Curvas de calibración	70
Anexo 2. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Zanahoria cruda	71
Anexo 3. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Proceso 1	73
Anexo 4. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Proceso 2	76
Anexo 5. X_{50} debido a ciclos masticación	81
Anexo 6. Contenido total de β -caroteno	82
Anexo 7. Humedad	82
Anexo 8. Dureza	83
Anexo 9. Color	83
Anexo 10. Contenido de β -caroteno bioaccesible	84



Capítulo 1. Introducción

En nuestra sociedad es frecuente la recomendación de aumentar la ingesta de frutas y verduras frescas con el fin de llevar una dieta saludable y nutritiva, debido a que se consideran los alimentos frescos más saludables que aquellos alimentos procesados (en conserva). Esta premisa se basa en los efectos negativos que posee el tratamiento térmico de esterilización, como degradación de vitaminas termolábiles, cambios en las propiedades del alimento, entre otros.

Es cierto que el consumo de alimentos como frutas y verduras otorga múltiples efectos positivos para la salud, los cuales están estrechamente relacionados con el alto contenido compuestos bioactivos (e.g., vitaminas, carotenoides, entre otros.) (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014). Sin embargo, estos compuestos deben ser liberados de la matriz alimentaria para poder realizar su función metabólica, lo cual ocurre sólo cuando se rompen las células de la matriz alimentaria, como suele ocurrir en la preparación del alimento, el procesamiento y/o la masticación de éste (Parada & Aguilera, 2007).

El tratamiento térmico que esteriliza un alimento en conserva, si bien degrada algunos compuestos nutritivos como las vitaminas, también rompe la estructura en la que éstos están contenidos, lo que implica una mayor liberación y por ende mayor aprovechamiento. Por lo tanto es relevante cuestionarse: ¿Qué tipo de alimento me aporta un mayor valor nutritivo?

En el presente trabajo de investigación se evalúa la bioaccesibilidad del β -caroteno en muestras de zanahoria a diferentes parámetros de esterilización (combinación tiempo-temperatura). Para ello se utilizan métodos de simulación *in vitro* del sistema digestivo humano, en el que se replican la masticación y las condiciones de acidez, temperatura y agitación del alimento en el tracto digestivo.

La combinación de las variables nos permitirá determinar el tratamiento con mayor contenido biodisponible, y por ende, aquel que optimiza el aprovechamiento nutritivo de los alimentos en la dieta.



Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Las diferentes combinaciones tiempo-temperatura de un proceso térmico de zanahoria que logran un valor de F_0 de 6 min, afectan la microestructura del alimento, favoreciendo la liberación de β -caroteno posterior a la masticación y la digestión.

Objetivo general

Evaluar el efecto de la combinación tiempo-temperatura de un proceso térmico y los ciclos de masticación en la bioaccesibilidad de β -caroteno en muestras de zanahoria mediante ensayos de masticación y digestión *in vitro*.

Objetivos específicos

- Estimar contenido de β -caroteno total y β -caroteno bioaccesible de la zanahoria mediante espectrofotometría UV-Vis.
- Implementar un método *in vitro* que permita simular la masticación y la digestión humana.
- Determinar el efecto de la combinación tiempo-temperatura de un proceso térmico para esterilizar zanahorias en la bioaccesibilidad de β -caroteno.
- Evaluar mediante análisis de imágenes el efecto de la masticación *in vitro* en la distribución de tamaño de partícula y en la bioaccesibilidad de β -caroteno.
- Evaluar las diferencias de color y dureza en las muestras procesadas térmicamente respecto de la muestra de zanahoria cruda.
- Estudiar el efecto del proceso térmico en la microestructura resultante de la zanahoria y su relación con el β -caroteno liberado tras la digestión *in vitro*.

Capítulo 2: Antecedentes teóricos

En este capítulo se expone el marco teórico de este trabajo de investigación. Se exponen 4 secciones principales: zanahoria y β -caroteno, tratamiento térmico en los alimentos, proceso digestivo del ser humano, y biodisponibilidad.

2.1. Zanahoria y β -caroteno

La zanahoria es una hortaliza de alto valor nutritivo. La parte utilizada es la raíz (Ver figura 1), la cual se consume en ensaladas, jugos, o cocida. Se caracteriza por su alto contenido de carotenoides (Cásseres, 1966).

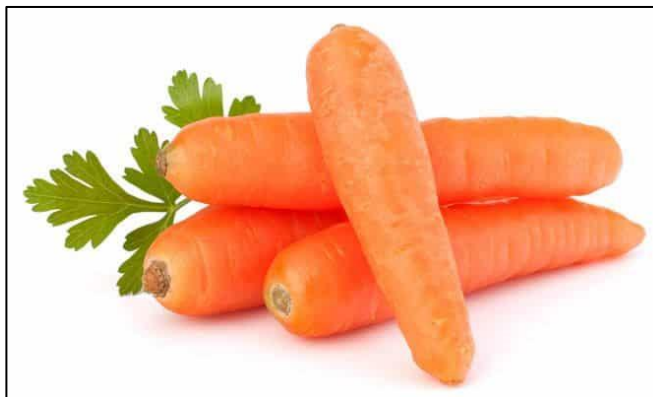


Figura 1. Zanahoria

Los carotenoides son los pigmentos presentes en muchas sustancias vegetales. Existen más de 563 carotenoides de estructura conocida, y la coloración que presentan va desde el amarillo al rojo (García, López-Munguía, & Quintero, 2004). El carotenoide más conocido es el β -caroteno, y la zanahoria es el alimento vegetal que lo contiene en mayor cantidad (Pamplona, 2002).

El β -caroteno actúa como provitamina o precursor de la vitamina A. Esta vitamina se encuentra únicamente en productos animales (mantequilla, huevo, leche, carne y algunos pescados), sin embargo, el ser humano la puede sintetizar a partir de β -caroteno, que es la fuente más importante de vitamina A en la mayoría de las personas que viven en países en desarrollo (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016).

Estructuralmente el β -caroteno es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal. Presenta dos anillos β -ionona lo que permite la síntesis de vitamina A con ambos extremos. La molécula se encuentra representada en la Figura 2:

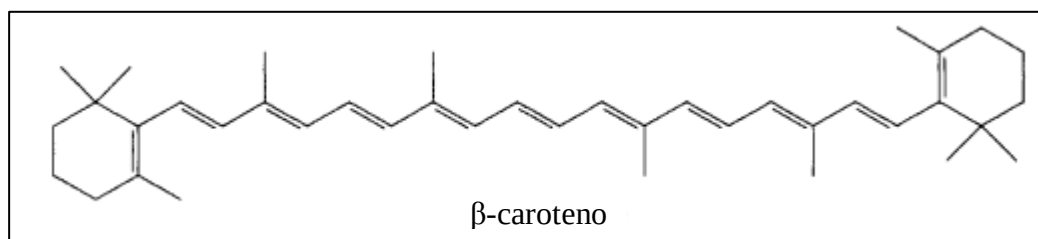


Figura 2. Estructura de β-caroteno (Coultate, 2002)

El β-caroteno es soluble en solventes apolares y tiende a dar color anaranjado. En la Figura 3 se observa el espectro de absorción, éste es generalmente similar entre solventes, variando levemente su longitud de onda máxima según la naturaleza del solvente. La longitud de onda máxima es a 449 nm en acetona y 451 nm en hexano.

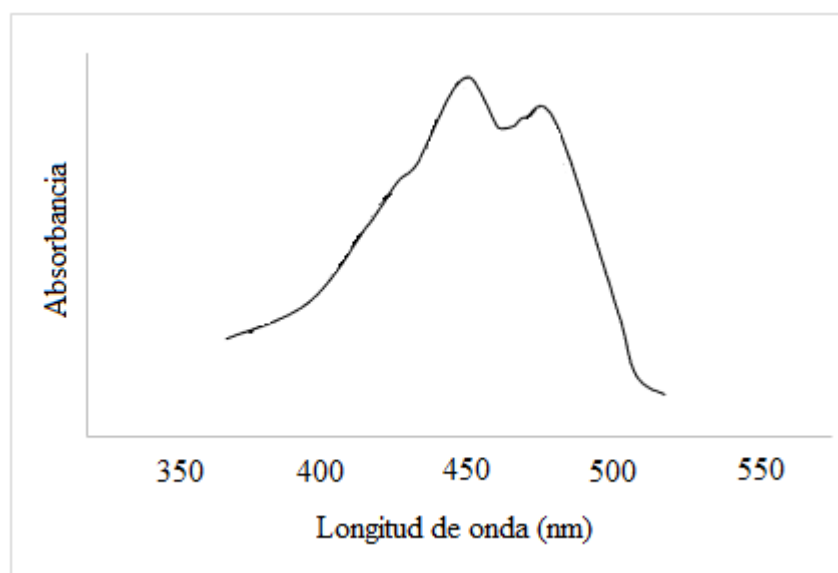


Figura 3. Espectro de absorción de β-caroteno (Coultate, 2002)

La obtención de la concentración de β-caroteno mediante espectrofotometría UV-Vis se puede realizar debido a la ley de Lambert-Beer, indicada en la ecuación 1, que estipula que hay una relación proporcional entre la absorbancia y la concentración a una radiación monocromática. Esta ley se cumple a bajas concentraciones y a valores de λ máximo.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C \quad (1)$$

Siendo A la absorbancia, ε el coeficiente de absorción, l la longitud atravesada por la luz en el medio y C la concentración del absorbente en el medio (Sierra, Gómez, Pérez, & Morante, 2010).



Para poder interpretar los resultados de absorbancia, se debe realizar una curva de calibración de β -caroteno para el solvente utilizado en el análisis.

2.2. Tratamiento térmico del alimento

2.2.1. Esterilización

El tratamiento térmico en los alimentos es requerido para destruir los microorganismos que causan descomposición y enfermedades. Por otro lado, se debe tener en cuenta que el procesamiento puede destruir algunos nutrientes y hay pérdida de cualidades organolépticas del alimento. Es por tanto que se debe lograr una optimización del tratamiento, para evitar excesivo calentamiento, y también evitar que los alimentos se encuentren bajo la condición de proceso (*underprocessing*) (Simpson & Holdsworth, 2016)

Para definir un procesamiento térmico que esterilice la muestra, primero se requiere conocer la cinética microbiana, la cual se observa en la ecuación 2

$$N = N_0 \exp(-kt) \quad (2)$$

Siendo N el número de microorganismos presentes para el tiempo t , y k la cinética de destrucción.

Para que la concentración de microorganismos al final del tratamiento sea nula, se requiere un tiempo de tratamiento infinito. Es por esto que la esterilización total del alimento es imposible de lograr, y por ende se define una concentración final N_F de microorganismos que considera una *esterilidad comercial*, en vez de una esterilidad total (Ibarz & Barbosa-Cánovas, 2011).

Para garantizar la inactivación del 90%, o la supervivencia del 10%, de los microorganismos se requiere un tiempo de calentamiento definido como *tiempo de reducción decimal D* (Simpson & Holdsworth, 2016).

El valor de D se puede determinar a partir de la *curva de destrucción térmica*, que se obtiene graficando $\log N$ en el tiempo (ver Figura 4). Se obtiene la ecuación 3:

$$\log(N) = \log(N_0) - \frac{t}{D} \quad (3)$$

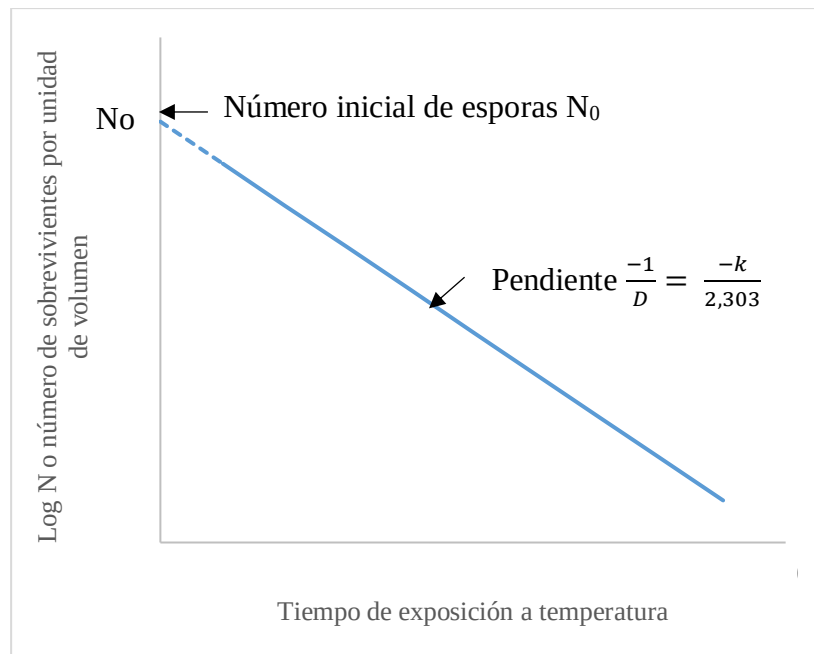


Figura 4. Gráfico log N en el tiempo

La pendiente de este gráfico es $-1/D$.

El valor D va a depender de la temperatura del proceso. Cuando el valor $\log D$ es graficado con la temperatura (ver Figura 5) se observa una relación lineal. Esta es la curva de *tiempo de muerte térmica (TDT)* (Simpson & Holdsworth, 2016). Se obtiene de este gráfico la ecuación 4:

$$\log \left(\frac{D_1}{D_2} \right) = \frac{T_2 - T_1}{z} \quad (4)$$

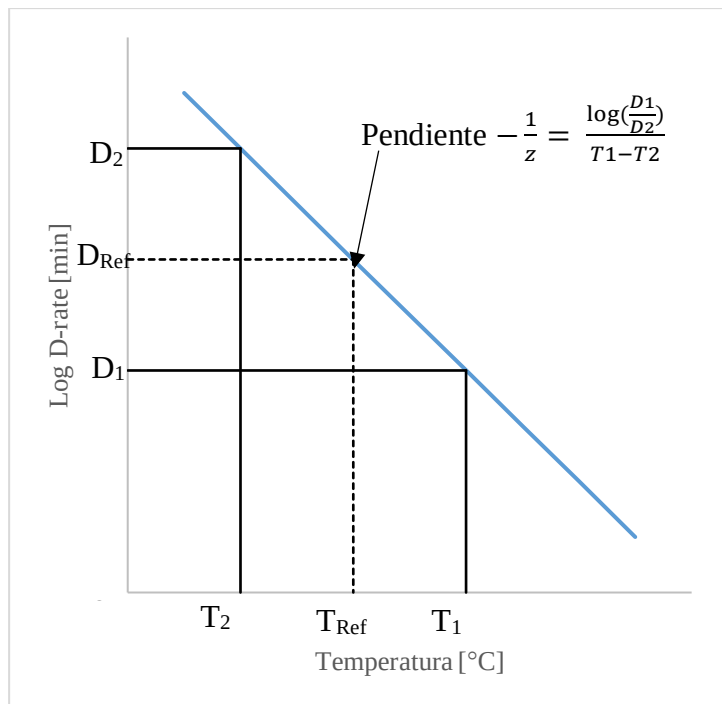


Figura 5. Gráfico log D con temperatura

La pendiente de este grafico es $-1/z$.

El valor z se define como el cambio de temperatura necesario para variar el valor de TDT en un ciclo logarítmico. Si se tiene un valor de referencia para la variación, se escribe como se indica en la ecuación 5:

$$\log\left(\frac{D}{D_{ref}}\right) = \frac{T_{ref} - T}{z} \quad (5)$$

Para cuantificar la tasa de inactivación de microorganismos existe la *letalidad* L , que corresponde a la razón entre valor D a una temperatura de referencia y el valor D a una temperatura determinada, como lo muestra la ecuación 6:

$$L = \frac{D_{ref}}{D} = 10^{\frac{T - T_{ref}}{z}} \quad (6)$$

La unidad de valor del proceso térmico es conocida como valor F . Para una temperatura constante, el valor F coincide con el valor L , sin embargo, las temperaturas del autoclave varían durante el calentamiento y enfriamiento, por lo que se deben integrar las tasas de letalidad alcanzada a distintas temperaturas (ver ecuación 7). El valor F puede ser

equivalente en distintos procesos si varían sus combinaciones de tiempo y temperatura (ver Figura 6)

$$F = \int 10^{\frac{T-T_{ref}}{z}} dt \quad (7)$$

En la siguiente ilustración se observa el comportamiento del valor F durante el procesamiento térmico.

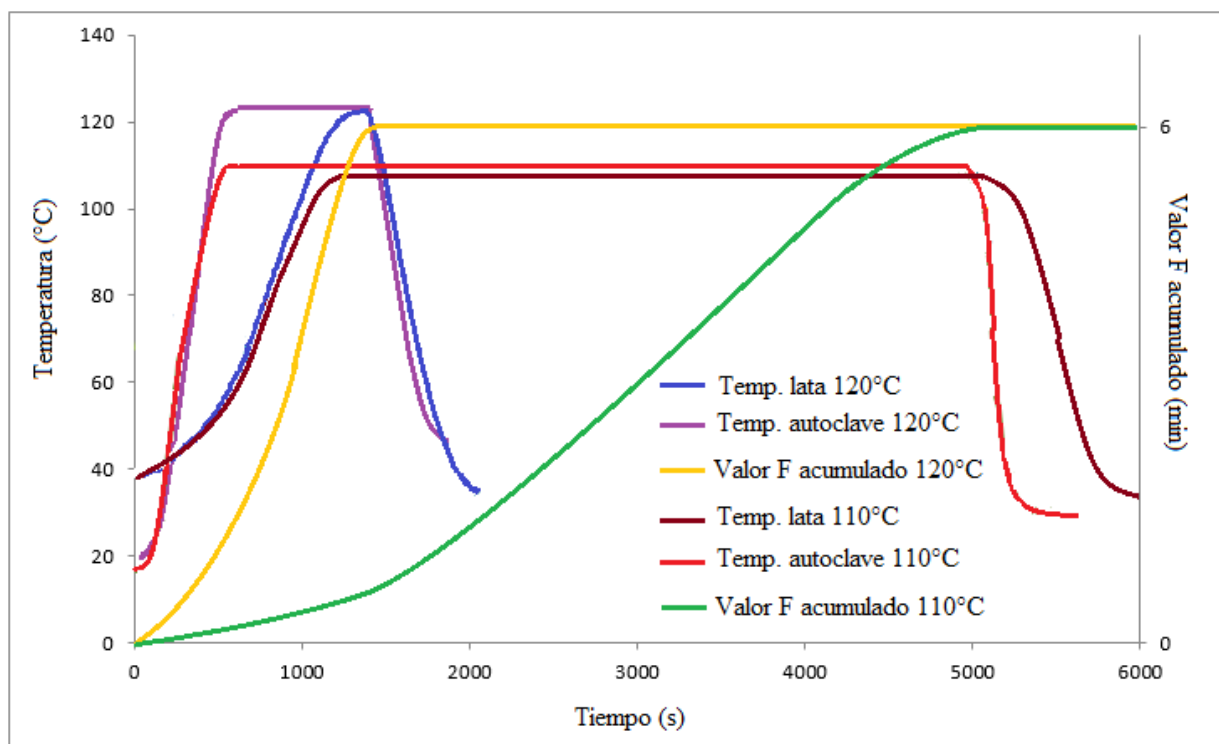


Figura 6. Curva de penetración de calor de procesos equivalentes con diferentes parámetros

Para determinar una letalidad en un proceso se debe especificar el microorganismo patrón, el cual se escoge según el alimento a procesar. Al igual que la mayoría de los vegetales, la zanahoria es un alimento de baja acidez (pH mayor a 4,6), por lo tanto, el microorganismo patrón corresponde al *Clostridium botulinum*, bacteria que vive en condiciones anaeróbicas y cuya esporas termoresistentes forman la neurotoxina causante del botulismo (UNL Food, 2017).

Para este microorganismo, la temperatura de referencia utilizada corresponde a 121,1 °C y el valor z es de 10 °C. Por lo tanto, el valor F_0 es calculado como se indica en la ecuación 8:



$$F_0 = \int 10^{\frac{T-121,1}{10}} dt \quad (8)$$

Para todos los tamaños de latas se tiene que para las zanahorias un valor mínimo de F_0 es de 3-4 min (Simpson & Holdsworth, 2016).

2.2.2. Proceso de enlatado del alimento a procesar

Los alimentos en conserva permiten extender la vida útil del alimento. Los envases utilizados deben tener un sellado hermético que impida la re-contaminación una vez esterilizado el alimento. Las conservas más utilizadas son en recipientes de metal (o latas), pero también se encuentran en otros formatos como vidrio, o bolsas plásticas o de aluminio. (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017)

Para el proceso de enlatado se tienen las siguientes etapas (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2016):

1. *Cosecha.*
2. *Recepción.*
3. *Lavado.*
4. *Clasificación.* Las zanahorias de pequeña longitud se enlatan enteras, las grandes en cubos o en rodajas
5. *Escaldado:* Tiene como finalidad inactivar enzimas que puedan alterar propiedades del alimento. Para el caso de las zanahorias en cubos el tiempo de escaldado es de 3 a 5 minutos a 90°C.
6. *Pelado y cortado/ descorazado del alimento.*
7. *Llenado de latas*
8. *Llenado de líquido de cobertura:* El líquido de cobertura (NaCl 1%) llena la lata a una temperatura de 80 °C aproximadamente. Esto permite crear un vacío en la lata al enfriarse.
9. *Sellado de lata.*
10. *Tratamiento térmico.* Las condiciones del tratamiento térmico dependerán del alimento.
11. *Enfriado.*
12. *Etiquetado.*
13. *Empacado.*

2.2.3. Efecto de tratamiento térmico en el alimento

Si bien el tratamiento térmico de un alimento tiene por objetivo eliminar el contenido microbiano, altera inevitablemente el alimento y sus propiedades, como su dureza y pigmentación.

La degradación del β -caroteno puede ocurrir por reacciones provocadas por la luz, oxidación, temperatura, entre otros factores. Aunque la termolabilidad del β -caroteno es relativamente baja en comparación con otras vitaminas, el proceso térmico y el escaldado catalizan reacciones de isomerización en la molécula de β -caroteno.

El 98% del β -caroteno contenido en la zanahoria cruda se encuentra en la forma *trans*. Esta forma *trans* de la molécula de β -caroteno es la más importante como precursor de la vitamina A debido a su alta transformación (teóricamente 100%) (Chen, Chen, & Chien, 1994).

Según (von Doering, Sotiriou-Leventis, & Roth, 1995), el tratamiento térmico de *trans*- β -caroteno a temperaturas por debajo de 100°C produce predominantemente la formación de 13- y 15-*cis*- β -caroteno, mientras que el isómero 9-*cis* se forma principalmente por encima de 100 °C. Estos se encuentran representados en la Figura 7.

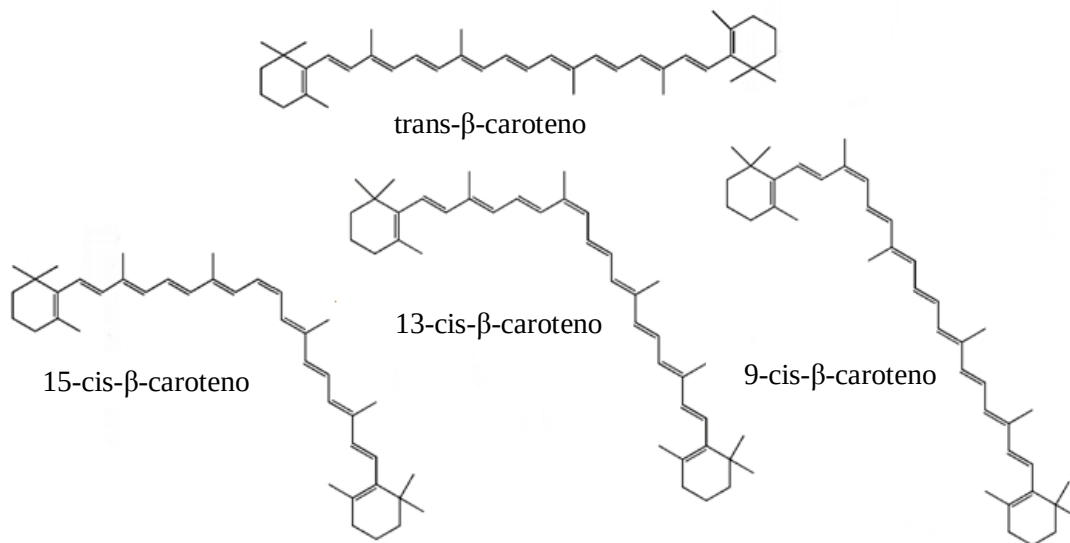


Figura 7. Representación de isómeros de la molécula β -caroteno

Si bien los isómeros formados por temperatura también tienen actividad de vitamina A, esta es menor a la del *trans*- β -caroteno. Según lo estudiado por (Sweeney & Marsh, 1971), el procesamiento de vegetales puede resultar en un 15-35% de pérdida de vitamina A debido a la conversión del *trans*- β -caroteno en sus isómeros *cis*.

Aunque los espectros de absorbancia de los isómeros pueden ser diferentes (Ver Figura 8), el mayor pico de absorbancia se encuentra en la misma longitud de onda (451nm) en todos los isómeros de β -caroteno, por lo que no es posible distinguir mediante espectrofotometría UV-Vis la concentración de cada isómero.

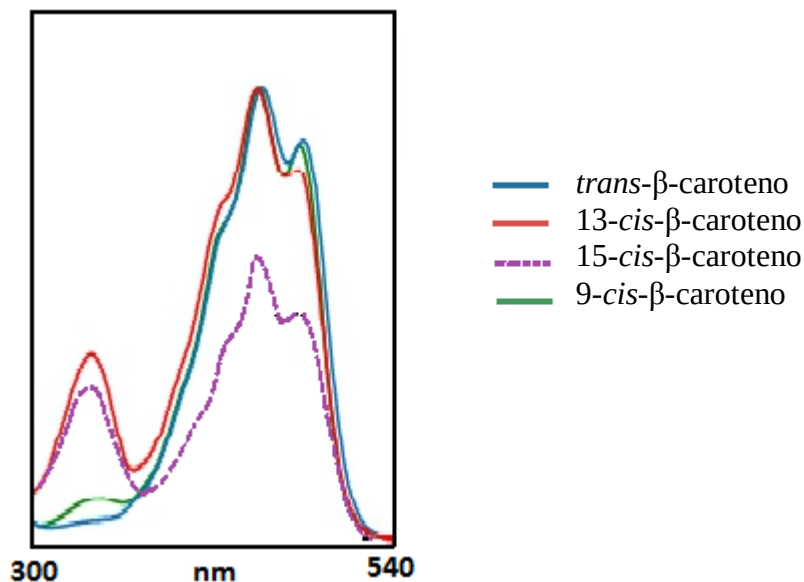


Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis de β -caroteno

Si bien los isómeros anteriormente mencionados son los más frecuentes en tratamientos térmicos, hay otros isómeros producidos por la oxidación, luz y acidez del entorno. La oxidación por ejemplo puede dar origen a compuestos *epoxi*, que son compuestos hidrosolubles que no poseen actividad de vitamina A.

2.3. Proceso digestivo

El proceso digestivo humano consta de diferentes órganos que abarcan desde la boca hasta el ano (ver Figura 9). En este trabajo de investigación se simularán básicamente 3 etapas: masticación, digestión estomacal y digestión intestinal.

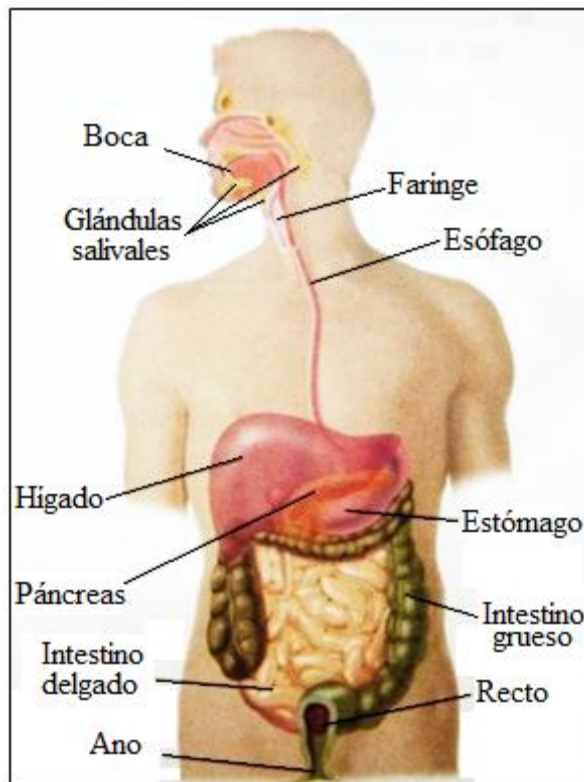


Figura 9. Sistema digestivo humano

2.3.1. Masticación

La masticación es la primera etapa en el proceso de la digestión, y consiste en preparar la comida para poder ser tragada y continuar con las etapas restantes. Durante la masticación el alimento se reduce a partículas pequeñas, las cuales son mezcladas con la saliva. El agua contenida en la saliva humedece las partículas de comida, mientras las mucinas salivares convierten el alimento masticado en una masa homogénea y resbaladiza que puede ser tragada fácilmente. Esta es conocida como *bolo alimenticio*.

Hay una serie de factores que determinan la masticación, como los dientes, fuerza de mordedura, textura y sabor de los alimentos, entre otros. Las superficies de masticación de los dientes molares forman la *zona oclusal*, que es donde las partículas de alimento son fragmentadas. La fragmentación depende del área oclusal y del número de dientes. Los factores que influyen en la fuerza de la mordedura son el volumen, actividad y coordinación de los músculos de la mandíbula. Hay otros parámetros importantes que influyen en el proceso de masticación: la producción de saliva, y cómo la lengua y las mejillas manipulan las partículas del alimento entre los dientes (van der Bilt, Engelen, Pereira, van der Glas, & Abbink, 2006).



La variación de la masticación puede otorgar resultados diferentes en la bioaccesibilidad, tal como lo muestra (Stahl, y otros, 2002), cuando comprobó que la bioaccesibilidad de β -caroteno en zanahorias crudas era menor al 1%, sin embargo éste valor aumentaba aproximadamente a 25% en zanahorias intensamente masticada.

2.3.2. Masticación *in vitro*

Si bien hay formas de modelar la reducción de tamaños de partículas de los alimentos durante la masticación, la simulación *in vitro* de esta etapa es poco común. La naturaleza compleja y los numerosos factores que varían considerablemente entre cada persona hacen que la masticación sea un proceso complicado de simular. (Bornhorst & Singh, 2012)

(Steiner, Mitsias, Ludwig, & Kern, 2009) propone simular la masticación con un equipo que consta de 8 cámaras de masticación con cargas idénticas. La fuerza es producida por un motor de dos pasos que permite movimientos verticales y horizontales controlados por un computador en cada una de las cámaras. Este equipo resulta en un perfil de fuerzas que carece de las características fisiológicas de la masticación, pero puede utilizarse para experimentos de fatiga a largo plazo o pruebas de desgaste.

Otra simulación de masticación *in vitro* fue llevado a cabo por (Woda, y otros, 2010), en la que menciona un equipo llamado *Artificial masticatory advanced machine* (AM2). Este equipo consta de dos superficies opuestas que buscan imitar la masticación recreando fuerzas de compresión y de corte. Se comparan las medianas de las muestras obtenidas por el AM2 y aquellas obtenidas por la masticación de voluntarios, concluyendo que ambos métodos originaban bolos de similares características volumétricas, tanto para muestras de maní como para muestras de zanahoria cruda.

Otro ejemplo de simulación de masticación humana fue el que desarrollaron (Olthoff, Van der Bilt, De Boer, & Bosman, 1986), en el que diseñaron un sistema *in vitro* que comprime los alimentos con una sonda cuyo extremo tiene forma de cúspide en un ángulo variable (60°, 90° o 120°).

Contrasta sus resultados con la distribución de tamaños de un alimento modelo obtenido tras la masticación real de 10 personas. El trabajo de (Olthoff, Van der Bilt, De Boer, & Bosman, 1986) modeló la distribución de tamaños de partículas de sus muestras con el método de Rosin Rammler, lo que permite representar y comparar las muestras del alimento modelo obtenidas por el equipo y aquellas obtenidas por los voluntarios.

El modelo de Rosin Rammler es una función de distribución descrita por la ecuación 9:

$$Q_w = 100 \left(1 - \exp \left(\frac{x}{x_{50}} \right)^b \ln 2 \right) \quad (9)$$

Donde x corresponde al tamaño de partícula, Q_w corresponde al porcentaje en peso de las partículas con tamaño menor a x , y x_{50} corresponde a la apertura teórica por la cual para el 50% en peso de la muestra. La variable b indica la amplitud de la distribución y varía entre 0 e infinito. Los parámetros x_{50} y b se ajustan a las curvas de distribución de tamaños de la muestra a modelar (Olthoff, Van der Bilt, Bosman, & Kleizen, 1984)

2.3.3. Digestión estomacal

Una vez tragado el bolo alimenticio, éste es desplazado por el esófago mediante movimientos rítmicos de contracción de las paredes musculares llamados *movimientos peristálticos*. Estos continúan por todo el tracto digestivo y permiten el funcionamiento del estómago en 3 modalidades: almacenamiento, mezclado y vaciado.

El estómago se divide en 4 regiones: fundus, cuerpo, antro y píloro (ver Figura 10). La zona proximal compuesta por el fundus y el cuerpo actúan como zona de reserva para alimentos sin digerir, mientras que la zona distal mezcla los alimentos, y actúa como una bomba para vaciar el estómago.

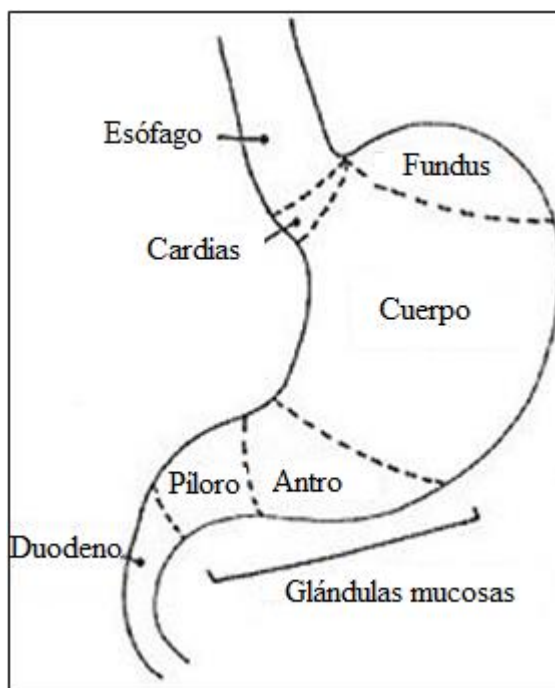


Figura 10. Estómago humano y sus partes



La digestión en el estómago de una persona adulta sana tiene un pH en torno a 2. Los jugos gástricos secretados en las glándulas estomacales contienen ácido clorhídrico, sales biliares y enzimas gástricas. Estos jugos penetran y diluyen el bolo alimenticio. El contenido que ya pasó por la digestión estomacal forma una mezcla de fases acuosas, grasas, y sólidos, y se le denomina *quimo* (Kong & Singh, 2008).

2.3.4. Digestión intestinal

Una vez pasado por el estómago, el quimo es desplazado hacia el intestino delgado y el intestino grueso. La mayor parte de los nutrientes son absorbidos en el intestino delgado, en el cual el contenido es disuelto por los jugos intestinales provenientes del páncreas, hígado y glándulas del intestino (Kong & Singh, 2008).

La digestión en el intestino en una persona adulta sana tiene un pH en torno a 6,9. Las secreciones pancreáticas son alcalinas y son esenciales para neutralizar el quimo ácido proveniente del estómago, y así activar enzimas. Las enzimas pancreáticas son indispensables para la completa digestión de los hidratos de carbono, grasas y proteínas (Sernka & Jacobson, 1982).

Los nutrientes digeridos se absorben a través de las paredes intestinales y los productos de desecho son impulsados hacia el colon para su excreción.

2.3.5. Digestión in vitro

La simulación del tracto digestivo a nivel de laboratorio ha sido llevada a cabo por varios autores como (Donhowe, Flores, Kerr, Wicker, & Kong, 2014); (Garrett, Failla, & Sarama, 1999); (Lemmens, Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2011), entre otros.

Debido a la gran cantidad de factores involucrados en los procesos fisiológicos, la simulación contempla un amplio rango de parámetros, tales como tiempos en cada etapa, agitación, composición de jugos digestivos, entre otros. El modelo a utilizar va a depender del tipo de alimentos y del objetivo de la investigación, los cuales pueden variar mucho entre sí, tal como expone (Hur, Lim, Decker, & McClements, 2011).

Una digestión *in vitro* típicamente cuenta con 2 etapas: gástrica e intestinal (o duodenal), sin embargo algunos autores como (Donhowe, Flores, Kerr, Wicker, & Kong, 2014) y (Roman, Burri, & Singh, 2012) contemplan una etapa salival (sin considerar masticación)

En la Tabla 1 se exponen modelos de digestión *in vitro* utilizados en estudios similares.

Tabla 1. Encuesta de modelos de digestión in vitro

Muestra	Medición	Enzimas o químicos	Duración de etapas digestivas	Referencia
Método de microencapsulación	Bioaccesibilidad de β -caroteno	NaCl, KCl, NaHCO_3 , urea, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , HCl, NH_4Cl , MgCl_2 , mucina, pepsina, pancreatina, bilis, α -amilasa, lipasa	5min 2h 2h	(Donhowe, Flores, Kerr, Wicker, & Kong, 2014)
Comidas preparadas	% de carotenoides en micelas	Pepsina pancreatina	1 h 2 h	(Garrett, Failla, & Sarama, 1999)
Zanahoria	Bioaccesibilidad de β -caroteno	NaCl, KCl $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pancreatina de porcino, extracto de bilis de porcino, pirogalol, tocoferol	30min 2h	(Lemmens, Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2011)
Zanahoria	Bioaccesibilidad β -caroteno	NaCl, pepsina, lipasa, taurocolato de sodio, glicodeoxicolato de sodio, CaCl_2	30 min 2h	(Tydeman, y otros, 2010)
Alimento modelo con alginato de sodio	Digestibilidad de almidón	Pepsina, pancreatina, amiloglucosidasa, invertasa	30 min 2h	(Ramírez, y otros, 2014)
Manteca de almendra fortificada	Bioaccesibilidad β -caroteno	mucina, α -amilasa, NaCl, KCl, NaHCO_3 , Pepsina, lipasa A, mucina, NaCl, Pancreatina, extracto de bilis, NaHCO_3 .	30s 2h 2h	(Roman, Burri, & Singh, 2012)
Zanahoria	Bioaccesibilidad carotenoides	Pepsina, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl, KCl, KH_2PO_4 , pancreatina, sales biliares, DL- α -tocoferol	1h 30min	(Hedrén, Diaz, & Svanberg, 2002)

2.4. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad

La cantidad de nutrientes total contenido en el alimento no es igual a la cantidad de nutrientes que se liberan. La manipulación y tratamiento del alimento (proceso térmico,



masticación, preparación, entre otros) provoca rupturas en el complejo proteico al que se encuentra asociado el pigmento en la matriz alimentaria, lo que permite la liberación de los compuestos. El contenido liberado de la matriz alimentaria se define como el contenido *bioaccesible*, que corresponde a la fracción de nutrientes liberada (respecto de la total) y que por ende el organismo puede utilizar para ser absorbida intestinalmente.

La cantidad de nutriente que efectivamente ingresa al organismo para su aprovechamiento metabólico se denomina contenido *biodisponible*. La absorción va a depender, en parte, de factores intrínsecos de las personas, como lo son su dieta, la actividad física, el género, entre otros, y por supuesto también de la cantidad de contenido bioaccesible.

En los métodos *in vitro* se puede medir la biodisponibilidad si se simula digestión y absorción, o bioaccesibilidad si se simula únicamente la digestión (Parada & Aguilera, 2007). Si se absorbe todo el contenido bioaccesible, se puede decir que la bioaccesibilidad es equivalente a la biodisponibilidad.

Para efectos de este trabajo de investigación se considera que la absorción intestinal es capta la totalidad del contenido bioaccesible, es decir que no hay diferencias numéricas entre el contenido bioaccesible y el biodisponible, a pesar de que conceptualmente no son lo mismo.

Dado que el tratamiento térmico del alimento provoca ruptura en la estructura, la cocción y esterilización juegan un papel importante en la bioaccesibilidad de los nutrientes. Un estudio *in vitro* sobre la cocción de la zanahoria y su efecto en la bioaccesibilidad de β -caroteno es realizado por (Hedrén, Diaz, & Svanberg, 2002), en el que compara pulpa de zanahoria cruda, en la que se libera un 21% de β -caroteno, y al cocinar la pulpa, la liberación aumenta a un 27%. En piezas de zanahoria cruda es un 3% y al cocinarlas aumenta a un 6% (en agua hirviendo por 20 minutos). Otro similar estudio realiza (Lemmens, Van Buggenhout, Indrawati, Van Loey, & Hendrickx, 2009) evalúa muestras crudas y cocinadas (a 95°C por 20 min). También prueba 2 tipos de escaldado, uno leve de 60°C por 40 min (LTB) y uno intenso de 90°C por 4 min (HTB). Los resultados indican que para zanahoria cruda el contenido bioaccesible es de $3,33 \pm 1,06$ [$\mu\text{g/g}$], para la zanahoria cocinada sin pretratamiento el contenido es de $22,37 \pm 2,17$ [$\mu\text{g/g}$]. Los experimentos con pretratamiento indican que aquel con LTB es $10,48 \pm 1,63$ [$\mu\text{g/g}$] y aquel con HTB $20,46 \pm 0,22$ [$\mu\text{g/g}$].

Otro estudio, esta vez enfocado en la esterilización industrial de los alimentos, que investiga la bioaccesibilidad de β -caroteno fue llevado a cabo por (Lemmens, Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2011). Para este experimento, únicamente se evalúan dos tamaños de muestras, cuyo tratamiento térmico abarca temperaturas desde 80°C hasta 130°C en intervalos fijo de tiempo de 15 min. Se concluye que para tamaños pequeños de muestra (menores a 125 μm) la bioaccesibilidad aumenta cuando se procesa a temperaturas



hasta 110°C, pero desciende cuando se procesa a temperaturas mayores. Para tamaños de partículas grandes (entre 500 and 4000 μm), la bioaccesibilidad aumenta cuando se procesa a temperaturas hasta 120°C y desciende cuando se procesa a temperaturas mayores. Esto se explica debido que a partículas menores el β -caroteno se encuentra menos protegido y, por ende, más vulnerable a degradaciones en comparación con partículas de mayor tamaño.

Si bien ha comparado procesos térmicos variando tiempo y temperatura de proceso, estos no son equivalentes en términos de esterilidad microbiana, parámetro crítico en la producción de alimentos en conserva. Por otro lado, los tratamientos térmicos utilizados son menos intensos, ya sea en temperatura o tiempo de proceso. Estos están mayormente asociados a rangos de pasteurización, esterilizaciones leves o cocción doméstica, y no de esterilización intensa a la que normalmente se someten los vegetales como la zanahoria.

Aquel que sí compara zanahoria a valores F equivalentes ($F_0=3,5\text{min}$, con $T_{\text{ref}}=121^\circ\text{C}$ y $z = 7,8^\circ\text{C}$) con distintas combinaciones de proceso es (Howard, Braswell, & Aselage, 1996), donde evalúa procesos de 118,3°C por 34,2min, 121,1°C por 29,2 min y 123,9°C por 27 min. Este estudio evalúa cambios de color, contenido de sacarosa, glucosa, fructosa, azúcar y fenoles totales y carotenoides totales. De este estudio se concluye que el proceso a 123,9°C presenta una degradación del color respecto del proceso a 118,3 y 121,1, posiblemente una reacción de pardeamiento de Millard. Los fenoles solubles son mayores en 123,9°C, posiblemente debido a un aumento de solubilidad debido a degradación térmica. Los niveles de sacarosa, glucosa, fructosa y carotenoides totales parecen no verse afectados por la temperatura del autoclave.



Capítulo 3. Materiales y métodos

3.1. Materia prima y reactivos

- Zanahorias frescas (zona central, Chile)
- β -caroteno (Sigma-Aldrich) (>97%)
- Pancreatina de páncreas de cerdo (Sigma-Aldrich) 4 x USP.
- Acetona (Emsure) P.A.
- Hexano (Emsure) P.A.
- Etanol (Emsure) P.A.
- Ácido clorhídrico técnico (32%)
- Hidróxido de sodio (G.A. Ventas)
- Fosfato de potasio (Winkler)
- Cloruro de sodio (G.A. Ventas)
- Agua destilada
- Papel filtro (Advantec 5C y papel de membrana 0,45um)

3.2. Equipos

- Autoclave (Loveless Manufacturing Corporation, EEUU)
- Masticador UTFSM (Chile)
- Selladora de latas (GmbH & Co. KG, Alemania)
- Centrífuga (Hermle, Alemania)
- Baño termostático (PolyScience, EEUU)
- Agitador (DragonLab, China)
- Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 5 (Spectronic Instrument Inc., EEUU)
- Balanzas analíticas (Radwag, España)
- pHímetro (Bante Instrument, China)
- Horno (Mettler GmbH & Co. KG, Alemania)
- Agitador vortex (Fine PCR, Corea del sur)
- Equipo de sistema de filtrado (bomba vacío, matraz kitasato, embudo de microfiltración portamembrana con tapón de silicona, vaso bridado, pinza metálica para sujetar)
- Texturómetro (Brookfield, Canadá)
- Colorímetro (Konika Minolta, Japón)
- Ultraturrax digital T 25 (IKA, EEUU).
- Liofilizador LSC Plus (Martin Christ, Alemania)
- Microscopio electrónico de barrido o SEM (Scanning Electron Microscopy) ZEISS (Oxford Instrument, EEUU).

3.3. Diseño de experimentos

El estudio se basó en un diseño con 2 variables o factores, de 3 niveles cada uno, resultando un diseño que origina 9 experiencias. En la Tabla 2 se muestra el diseño experimental, con cada variable y sus niveles.

Tabla 2. Diseño de experimentos

Número de experimentos	X ₅₀ [mm]	Número de ciclos de masticación	Proceso térmico	Tipo de proceso
1	1,0	10	Control	Sin proceso térmico
2	1,0	-	Proceso 1	110°C – 66min aprox.
3	1,0	5	Proceso 2	120°C – 9min aprox.
4	0,8	30	Control	Sin proceso térmico
5	0,8	3	Proceso 1	110°C – 66min aprox.
6	0,8	18	Proceso 2	120°C – 9min aprox.
7	0,7	50	Control	Sin proceso térmico
8	0,7	15	Proceso 1	110°C – 66min aprox.
9	0,7	30	Proceso 2	120°C – 9min aprox.

Para el experimento 2, la variable de tamaño de partícula requerida no es lograda a través de ningún ciclo de masticación por lo que se ha suprimido del diseño. Esto se debe a que las muestras del proceso 1 se fragmentan fácilmente, por lo que se alcanzan rápidamente los niveles, teniendo que con tan solo 3 ciclos se logra el nivel 2 que corresponde a un X₅₀ de 0,8[mm].

3.4. Metodología experimental

3.4.1. Curva de calibración

Curva calibración de acetona

La curva de calibración de acetona es realizada a partir de una solución estándar de β -caroteno en acetona a una concentración de 1 [mg/mL]. A partir de esta se realizan 2 diluciones seriadas desde 32 hasta 0,03 [μ g/mL], cuyos datos están graficados en Anexo 1.



Se han extraído de la línea de tendencia los datos que escapan visiblemente de la linealidad debido a que no cumple con la Ley de Lambert-Beer.

Se tiene según la curva de calibración que la concentración de β -caroteno puede ser estimada a partir de la ecuación 10 presentada a continuación

$$C = \frac{A}{0,2176} - 0,00405 \quad (10)$$

$$R^2=0,9702$$

Donde C corresponde a la concentración de β -caroteno en $\mu\text{g/mL}$, y A es la absorbancia.

Curva de calibración hexano

La curva de calibración de hexano es realizada a partir de una solución estándar de β -caroteno en hexano a una concentración de 1 [mg/mL]. A partir de esta se realizan 2 diluciones seriadas desde 32 hasta 0,031 [$\mu\text{g/mL}$], cuyos datos están graficados en Anexo 1.

son graficados en la figura 12. Se han extraído de la línea de tendencia los datos que escapan de la linealidad debido a que no cumple con la Ley de Lambert-Beer.

Se tiene según la curva de calibración que la concentración de β -caroteno puede ser estimada a partir de la ecuación 11 presentada a continuación:

$$C = \frac{A}{0,1278} + 0,00155 \quad (11)$$

$$R^2=0,9843$$

Donde C corresponde a la concentración de β -caroteno en $\mu\text{g/mL}$, y A es la absorbancia.

3.4.2. Extracción de contenido total de β -caroteno

Para la extracción de β -caroteno total de la zanahoria cruda, se detalla el método a continuación, basándose en el método propuesto por (Biswas, Sahoo, & Chatli, 2011) y el propuesto por (Nauman Ahamad, Saleemullah, Ullah Shah, Khalil, & Saljoqi, 2007).

Se obtiene $1,000 \pm 0,001\text{g}$ de muestra en tubos de ensayos y se le adicionan 5,00 mL de acetona, y se homogeniza en el homogeneizador Ultraturrax a 10.000 rpm por 10 minutos.

Se filtra con el equipo de filtración a vacío y papel filtro (5C Advantec ®) y posteriormente se centrifuga a 1380g por 10 min a 4 °C. Se separa el extracto líquido en un tubo con tapa.

A la muestra sólida que queda se agrega nuevamente 5,00 mL de acetona y se repite el método de extracción 3 veces o hasta que el residuo sólido salga decolorado.

Los 3 extractos líquidos filtrados se mezclan y se centrifugan a 1380g por 10 min a 4 °C. Luego se deposita en una celda espectrofotométrica de cuarzo UV-Vis a 449 nm de longitud de onda (Spectronic Instrument Genesys 5, EEUU). A partir de la curva de calibración de acetona se tiene un valor de concentración.

3.4.3. Preparación de muestras

Antes de realizar los experimentos se debe seleccionar y preparar la materia prima. La selección de la materia prima consiste en buscar de un mismo proveedor zanahorias frescas de alta calidad, que no muestren defectos en la forma y color. Se seleccionan zanahorias de similar tamaño y que contengan una superficie lisa. Estas son adquiridas y conservadas por un tiempo máximo de 2 semanas en un ambiente refrigerado a 4 °C.

Al momento de utilizar la zanahoria se lava con agua potable la superficie con el fin de remover tierra y otras partículas contaminantes que pueda tener (hojas, piedras, fungicidas, etc.), esto para evitar corrosión en el envase y alteraciones de cualidades organolépticas del alimento.

La preparación de la muestra consiste en retirar el exceso de agua de la superficie de la zanahoria. Luego se procede a pelar la zanahoria manualmente con un cuchillo, descorazarla y se remueven los extremos para analizar la región central.

Las zanahorias previamente preparadas, se rebanan con un cortador de alimentos de 1 cm² de sección, y posteriormente se corta el largo manualmente para formar cubos de 1 cm³. Estos cubos de zanahoria (Figura 11) se utilizan para los 8 experimentos.

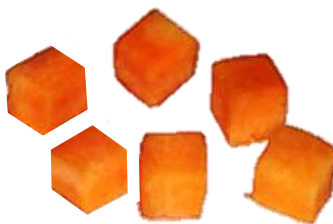


Figura 11. Cubos de zanahoria de 1 cm³



3.4.4. Humedad

Para cada tipo de muestra (con o sin procesamiento térmico) se analiza el porcentaje de humedad de la zanahoria. Esto con la finalidad de entregar resultados en base seca y poder compararlos entre sí.

Se pesan muestras de zanahoria de cada variable de tratamiento térmico. Se dejan en un desecador al vacío a 60 ° C durante 3 días. Luego se pesan nuevamente y se calcula el % de humedad como indica la ecuación 12.

$$[\%] \text{ de humedad} = \frac{\text{masa húmeda} - \text{masa seca}}{\text{masa húmeda}} \cdot 100\% \quad (12)$$

3.4.5. Tratamiento térmico

El tratamiento térmico de la zanahoria consiste en enlatar los cubos de zanahoria. Para enlatar alimentos hay una serie de pasos requeridos, como se detalla a continuación:

- Limpieza: Las latas deben ser limpiadas por el interior antes de ser llenadas. Esta es una práctica necesaria para eliminar efectivamente cualquier tipo de suciedad, polvo, material extraño o microorganismos que pueda alterar el producto.
- Inserción de termopar: en la lata se abre una apertura lateral por la cual se inserta un termopar, que registrará la temperatura de todo el proceso térmico. El termopar debe quedar en el centro de la lata para indicar el punto más frío de la lata (ver figura 12a). Se asegura el instrumento con torniquete de goma que permita un cierre hermético que evite fugas del líquido de cobertura. Se comprueba la hermeticidad de la lata llenándola con agua fría y caliente.
- Escaldado de muestra: se realiza un escaldado líquido a 90°C por 3 minutos.
- Llenado de latas: El llenado se realiza incorporando los cubos de zanahoria junto con el líquido de cobertura (Figura 12b), que en este caso es una solución salina al 1% (NaCl). Este llenado se realiza a una temperatura de 80 °C.
- Sellado de latas: las latas se sellan herméticamente para evitar fugas y que protejan el alimento durante todo el proceso (Figura 12c).

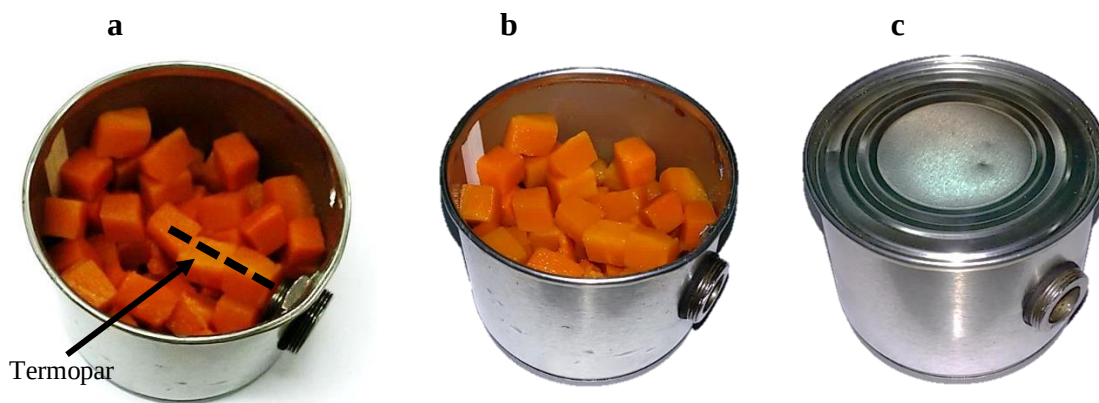


Figura 12. Enlatado de muestras: a) Ubicación de termopar, b) Etapa de llenado con líquido de cobertura, c) Lata sellada

3.4.5.1. Sellado de latas

Esta etapa se realiza en una selladora de latas (Figura 13). Una vez preparado el contenido de las latas, se les coloca la tapa superior y se ubican en el soporte inferior del equipo. Se ajusta la altura y los rodillos laterales del equipo según la geometría de la lata. Las latas utilizadas tienen un diámetro de 7,3 cm y una altura de 5,8 cm. Son de acero inoxidable.

Una vez que se prende el equipo, el soporte comienza a girar. Una vez en marcha se gira la perilla de arranque y el sellado ocurre automáticamente.



Figura 13. Selladora de latas (GmbH & Co. KG)

3.4.5.2. *Sensor de temperatura*

La medición de temperatura del producto se realiza a través de un termopar tipo T: cobre-constantán, cuyo rango de medición es de $-199,9\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $+400,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5.3. *Registrador de datos*

La temperatura medida en el termopar es registrada cada 10 segundos por el registrador Omega OMB-DAQ-2416. Éste es un módulo de control y medición multifunción de gran precisión para USB. Es un dispositivo de entrada analógica de 24 bits para voltaje o temperatura, con ocho líneas de E/S digital y dos contadores.

El OMB-DAQ-2416 es conectado a un computador por puerto USB, y registra los datos en línea a través de un complemento del software Excel.

3.4.5.4. *Autoclave*

El equipo autoclave es de Loveless Manufacturing Corporation (Figura 14). La condición máxima de operación es 40 lb (o 2,7579 bar) a 286 °F (o 141,11°C). Se opera de manera discontinua (por carga) y no posee agitación. Cuenta con:

- Distribuidor de vapor: Cruceta con 23 orificios en total, cada uno con un diámetro de 2,5 mm.
- Purgas: Posee dos, uno en la tapa del autoclave (2 mm), y otra con los medidores de temperatura (2 mm).
- Válvula de venteo: posee una válvula de 34 mm.
- Tuberías: Vapor. Diámetro externo de la cañería de vapor 35.5 mm. Aire. Posee dos entradas de aire una abajo junto a la entrada de vapor (con un diámetro externo de 33 mm y otra arriba (con un diámetro externo de 14 mm). Agua. Posee dos entradas de agua en el mismo nivel (arriba con diámetro externo de 14 mm y otra abajo (con diámetro externo de 43 mm). Condensado. Diámetro externo de la cañería de condensado es 29 mm.

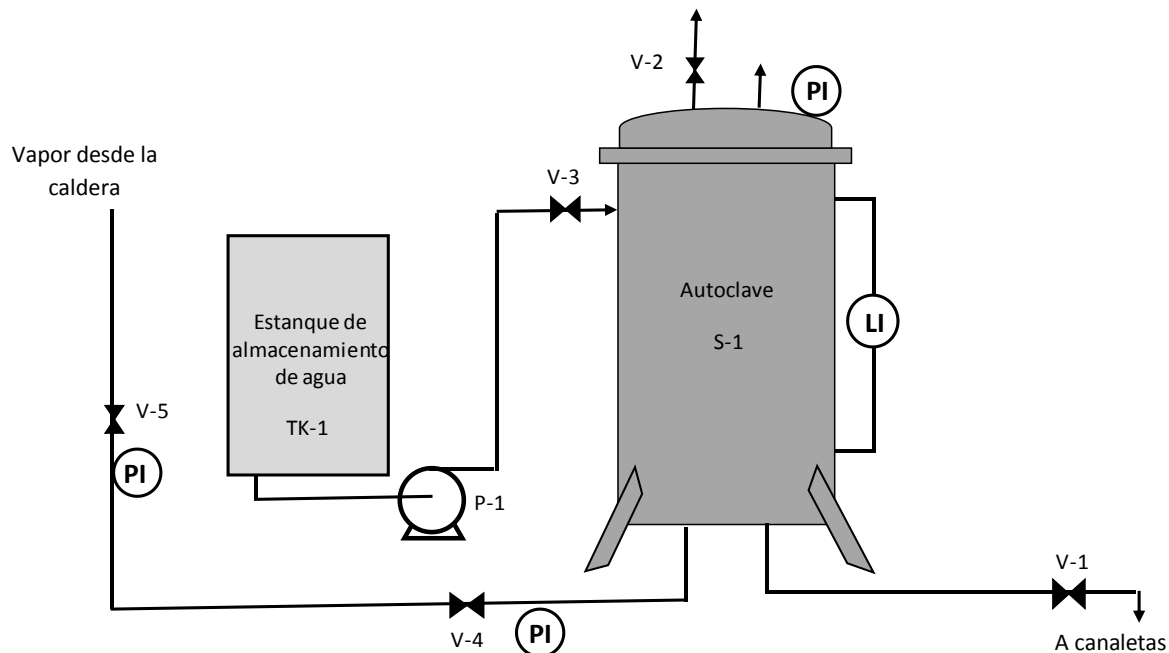


Figura 14. Autoclave planta piloto UTFSM

Puesta en marcha, operación y detención

1. Carga: se ponen todas las latas en el autoclave. Se cierra la tapa y se asegura con los torniquetes.
2. Purga: Se debe comenzar la purga con la salida de agua (V-1) y el venteo de vapor (V-2) abiertas, y la entrada de agua (V-3) cerrada. Se abre la matriz de vapor (V-5). Teniendo esto se comienza la apertura de la válvula de vapor (V-4) hacia el autoclave. Con esto se purga el equipo de condensado en la línea y aire contenido. Se finaliza esta etapa cuando se deja de observar líquido saliendo de la salida de agua y se observa puro vapor. En este momento se cierra el venteo de vapor (V-2) y la salida de agua (V-1).
3. Operación: Una vez entrado en operación, se observa en el manómetro que aumenta la presión del interior del autoclave. Una vez alcanzada la presión de operación, se regula con la válvula de la entrada de vapor. Se debe supervisar que la presión del equipo se mantenga constante durante su funcionamiento.

4. Enfriamiento: Una vez concluido el tiempo de operación, se detiene el ingreso de vapor cerrando la válvula de entrada de vapor (V-4). Se abre el venteo de vapor y la presión del autoclave comenzará a descender. Una vez que el equipo se despresuriza, se inicia el llenado de agua fría al interior del autoclave mediante la bomba (P-1).
5. Una vez enfriadas las latas, se abre el autoclave y se retiran. Se vacía el autoclave abriendo la válvula de salida de agua (V-1).



Se realizan 2 tipos de procesamiento térmico. Se observa en la tabla 3 los parámetros de procesamiento de cada experimento:

Tabla 3. Variables de proceso

Experimento	Valor F_0 [min]	Tiempo de proceso aproximado [min]	Temperatura [°C]
Proceso 1	6	66	110
Proceso 2	6	9	120

Posterior al procesamiento, las latas son enfriadas con agua a temperatura ambiente, y refrigeradas a 2-4 [°C] hasta su análisis.

3.4.6. Medición de color y textura

3.4.6.1. Color

La medición del color se realiza con el Chroma-Meter CR 400 Konika Minolta (ver figura 15). Este equipo mide color en diversas superficies, entregando valores del espectro de color CIELAB (parámetros L^* , a^* y b^*). El eje L^* es el de luminosidad y va de 0 (negro) a 100 (blanco). Los otros dos ejes de coordenadas son a^* y b^* , y representan variación entre rojizo (números positivos) y verdoso (números negativos), y amarillento (números positivos) y azulado (números negativos), respectivamente.



Figura 15. Medidor de color Chroma-Meter cr 400 Konika Minolta

La muestra de zanahoria se posiciona en el sensor del equipo, y luego se presiona el botón de medición. El equipo registra los 3 valores y los muestra en pantalla.

Los valores L^* , a^* y b^* se ubican en el diagrama cromático representado en la figura 16.

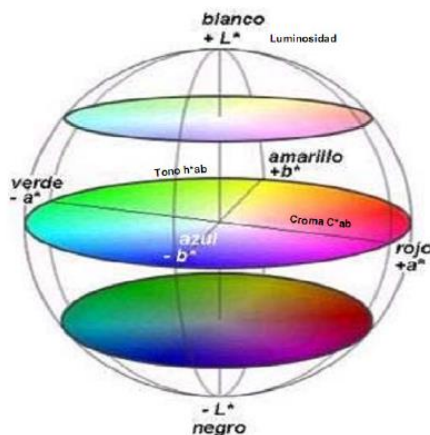


Figura 16. Diagrama cromático $L^* a^* y b^*$

Estos 3 valores en conjunto definen el color de un objeto.

La diferencia de color entre 2 objetos se percibe calculando el valor ΔE (ecuación 13). Este corresponde a la “diferencia de sensación” que se perciben a la exposición de dos colores.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (13)$$

Donde Δi es la diferencia del parámetro i entre ambas muestras a comparar. Si ΔE^* debe tener un valor superior a 3 para tener una diferencia de color apreciable.

3.4.6.2. Dureza

El parámetro de textura es entregado por el equipo Texture Analyzer Brookfield CT3 (ver figura 17). Este equipo permite realizar ensayos de compresión para el cual se entregan valores solicitados por el usuario. Para la muestra de zanahoria se entrega el valor de dureza.



Figura 17. Texturómetro Texture Analyzer Brookfield CT3

La muestra testada es un cubo de zanahoria de 1 cm^3 , para la cual el ensayo de compresión se realiza con los parámetros indicados en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros de test de compresión

Velocidad de test	0,2 mm/s
Deformación	25 %

3.4.7. Masticador

La masticación se simula mediante un equipo simulador de masticación ubicado en el laboratorio de alimentos del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María, Casa Central (Figura 18).

El equipo está basado en el modelo propuesto por (Salles, y otros, 2007), consta de dos mandíbulas circulares y posee un total de 44 piezas dentales, que simulan molares y premolares. En el eje central del equipo se tiene un cono en la mandíbula inferior, que simula la función de la lengua al mantener las piezas de alimento entre las muelas. En la mandíbula superior se tiene una cavidad de acople al cono central.



Figura 18. Masticador UTFSM (Elaboración propia)

Las variables del equipo son: fuerza de masticación, ciclos de masticación, periodo de pulsos, y ángulo de cizalla. El rango de operación de fuerza del equipo es de 0,5 a 33 kg_f, siendo esta última la fuerza máxima capaz de accionar. Se puede modificar en intervalos de 0,1 o 1 kg_f. El rango de los ciclos de masticación va de 1 a 50 ciclos, y pueden variar en intervalos de 1 o 5 ciclos. El ángulo de cizalla puede tomar los valores 1, 5, 10 y 15°. También se permite variar la dirección. Los experimentos fueron ensayados a 25 kg_f y 5° de cizalle.

Para verificar la utilización de este equipo como un simulador de la masticación humana real, se realiza una comparación entre muestras masticadas por el equipo y muestras masticadas por un voluntario.

Se le da al voluntario 2 cubos de zanahoria y que mastique según los ciclos a comparar. Las muestras masticadas por el equipo y el voluntario son recolectadas (y enjuagadas en el caso del voluntario), y depositada en papel arroz sobre placas Petri.

Las muestras en la placa son secadas a 80 °C por aproximadamente 2 horas, o hasta que la muestra esté seca (ver figura 19). El papel permite el desprendimiento de la muestra una vez seca, y evita la ruptura de las partículas.



Figura 19. Muestras de zanahoria masticadas y secadas

Una vez que se desprenden las partículas, estas son escaneadas. Una vez escaneada la imagen, se ingresa al programa *Image Pro Plus* y se procede a análisis de la muestra.

3.4.8. Análisis de tamaño de partículas post masticación

Las muestras masticadas y secadas son analizadas para determinar la distribución de tamaño de partícula que tienen para cada ciclo de masticación. Se comparan los valores obtenidos en la simulación (*in vitro*) y los obtenidos por el voluntario (*in vivo*).

Las muestras son dispersadas y escaneadas (Brother DCP-J140W). La imagen obtenida es analizada con el software *Image-Pro Plus*, en el cual se trabaja la imagen utilizando la herramienta *Contrast enhancement*, que permite modificar contraste de blancos o colores rojo/azul/verde, y brillo y saturación de la imagen (Ver figura 20). Posteriormente se utiliza la herramienta *Count and measure objects*. Esta herramienta contabiliza las partículas detectadas por el software y entrega datos solicitados por el usuario. En este caso se solicita el diámetro promedio (*diameter mean*) de las partículas, que corresponde a la distancia promedio de diámetro calculada en intervalos de 2 grados pasando por el centroide de la imagen.



Figura 20. Etapas de modificación de la imagen

Una vez contabilizadas las partículas de la imagen y su diámetro promedio, se extraen los datos en formato Excel. En este software se ajustan los datos al modelo de distribución de Rosin Rammler mediante la herramienta *Solver*. Los datos experimentales se ajustan minimizando la suma de los errores cuadrados respecto al modelo (objetivo) y modificando los parámetros b y el valor X_{50} (variables).

Ver en Anexos 1, 2 y 3 para ver los ajustes al modelo para cada proceso y cada ciclo de masticación.

3.4.9. Digestión in vitro

Para la digestión in vitro, el procedimiento utilizado se basa en lo descrito por (Lemmens, Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2011), y modificaciones referidas de (Ramírez, y otros, 2014) (agitación), y los jugos digestivos son simulados en base a (Pharmacopeia.cn, 2016).

Una vez masticada la zanahoria, se obtiene una muestra de 10,000 g a la cual se le agregan 20,0 mL de solución gástrica (NaCl 0,2% (p/v) y HCl 0,7% (v/v) hasta alcanzar pH 1,2, se afora la solución con agua destilada hasta completar 1 L) (Pharmacopeia.cn, 2016). Se ajusta el pH de 1,2 (con NaOH o HCl, según corresponda) y se deja la muestra con agitación a 300 rpm. Se incuba por 30 min en un baño termorregulado a 37 °C (ver figura 21).

Posteriormente se simula la digestión intestinal. Para esto se adicionan 6,00 mL de solución intestinal (0,68% (p/v) KH_2PO_4 , NaOH en agua hasta alcanzar un pH 6,9; se afora la solución hasta completar 1L) (Pharmacopeia.cn, 2016). Luego se ajusta el valor del pH a 6,9 (con NaOH o HCl según corresponda). Se agrega 60.0 mg de pancreatina y se incuba por 2 h a 37 °C con una agitación de 300 rpm.



Figura 21. Baño termostático con agitación

3.4.10. Extracción de β -caroteno bioaccesible

Para la extracción del β -caroteno en la digesta, las muestras son previamente filtradas con un embudo de membrana y un papel filtro (0,45 μm de diámetro) como se indica en la figura 22.



Figura 22. Sistema de filtración



La extracción de β -caroteno después de la digestión se obtiene basándose en el método planteado por (Donhowe, Flores, Kerr, Wicker, & Kong, 2014).

Se extraen alícuotas de 5,00 mL de la muestra ya digerida y filtrada. A estas se le agregan 10,0 mL de una solución de extracción (acetona/etanol/hexano, 25/25/50 mL respectivamente) en tubos de ensayo con tapa.

Se agita el tubo por 30 segundos, y luego se deja reposar para permitir la separación de fases. Se extrae la capa superior. La solución resultante se vuelve a extraer con 2,00 mL de hexano y se vuelve a obtener la capa superior.

Se juntan los extractos superiores y estos extractos son colocados en celdas de cuarzo para su análisis en el espectrofotómetro UV-Vis a 451 nm de longitud de onda. A partir de la curva de calibración de hexano se obtiene un valor de concentración.

3.4.11. Liofilización

Para el análisis estructural de las muestras se han liofilizado muestras de zanahoria de Proceso 1 y Proceso 2. Para esta etapa se ha seleccionado un programa de 18 horas para el secado primario y 12 horas para el secado secundario.

3.4.11.1. Preparación de muestras

Se seleccionan cubos de zanahoria procesada (proceso 1 y proceso 2). Estos son congelados a -40°C en un congelador externo al liofilizador. Luego se almacenan a -18°C hasta el liofilizado. Luego se ingresan al liofilizador *Christ LSC plus* (Ver figura 23).



Figura 23. Liofilizador Christ LSC Plus

3.4.11.2. Puesta en marcha y parada de marcha

1. Pasos previos: Se abre la válvula de apertura de aire de la cámara del liofilizador para igualar la presión interna de la cámara a la externa. Se abre la válvula de salida de agua y se vacía el condensado acumulado.
2. Se prende el equipo y se inicia el programa *LPC plus*.
3. Se inicia la etapa *warm up* (*Process control* → *Warm up* → *RUN*). Una vez terminado el *warm-up*, el equipo queda en etapa *stand by*.
4. Se retira la cámara del liofilizador y se ubican las placas con muestra en las celdas del liofilizador y se insertan los termopares en las muestras (Ver figura 24). Luego se retorna la cámara a su posición.
5. Verificar cierre de válvulas aire y de condensado. Verificar que el equipo se encuentra registrando datos mediante las luces verdes *RxD* y *TxD* (en caso contrario, revisar conexión y prendido de equipo).
6. Ingresar a la opción *Process recording* → *Start recording*.
7. Ingresar a la opción *Documentation* → *user program/recipe* → *Dry*.
8. Ingresar a la opción *Process control* → *Zanahoria* (programa escogido) → *RUN*. Ha comenzado el liofilizado.
9. Una vez concluido el proceso, el equipo retorna a la etapa de *stand by*. Para la detención ingresar a la opción *Process recording* → *stop recording*.
10. Para retirar los datos dirigirse a *Documentation* → *unit1* → *zanahoria* → *print* → *preview* → *guardar como* → *crear Excel file*.

11. Para retirar las muestras se debe realizar en *stand by*. Se abre la válvula de aire lentamente para despresurizar la cámara.
12. Retirar la cámara, retirar las muestras de las celdas y limpiar.
13. Retornar la cámara y apagar equipo.



Figura 24. Muestras en la celda del liofilizador.

Una vez liofilizadas las muestras se almacenan en desecadores hasta su posterior análisis.

3.4.12. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las muestras liofilizadas de zanahoria de ambos procesos (Proceso 1 y Proceso 2) son analizadas mediante microscopio electrónico de barrido o SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy).



Figura 25. Microscopio electrónico de barrido o SEM

Esta técnica de microscopía permite obtener imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra. La muestra debe ser conductora, en el caso de las zanahoria liofilizadas se requiere una etapa previa de metalizado, que cubre la muestra con una capa delgada de oro para darle carácter conductor (Ver muestras en Figura 27). Esto se realiza en el equipo Sputtering Coater (Ver figura 26)



Figura 26. SPI Sputtering Coater

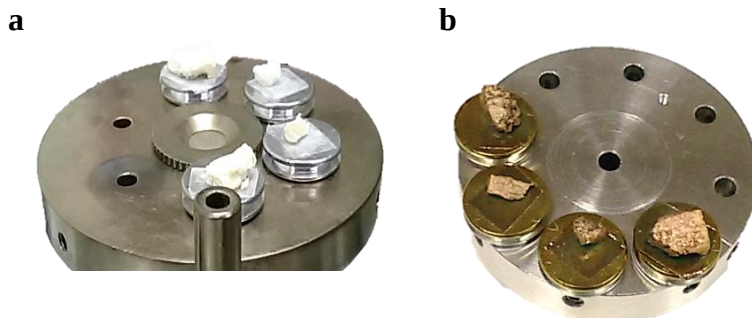


Figura 27. (a) Muestras previas al metalizado, (b) Muestras posterior al metalizado

Capítulo 4: Análisis y resultados

4.1. Tratamiento térmico

En la Tabla 5, se indican los detalles y condiciones de proceso para el proceso 1 y proceso 2.

Tabla 5. Detalles y condiciones de procesamiento térmico

	Proceso 1	Proceso 2
Temperatura de proceso [°C]	110	120
Tiempo de calentamiento crítico (Come-up Time o CUT) [min]	12	9
Tiempo de proceso [min]	66	9
Tiempo enfriado [min]	10	6
Tiempo total [min]	88	24
Letalidad o valor F mínimo [min]	6	6

En la curva de penetración de calor de cada proceso térmico *Lata i* ($i=1,2$) corresponde a la lata de zanahoria, *Amb i* ($i=1,2$) corresponde a la temperatura al interior del autoclave y *Fi* ($i=1,2$) corresponde al valor calculado para la lata *i*. Para cada lata se ha calculado el valor F con el método de Bigelow.

4.1.1. Proceso 1

Se observa a continuación el gráfico de temperaturas y valor F del proceso 1. Este proceso es llevado a cabo a 110°C por aproximadamente 66 min. La curva de penetración de calor se encuentra representada en la figura 28, a continuación:

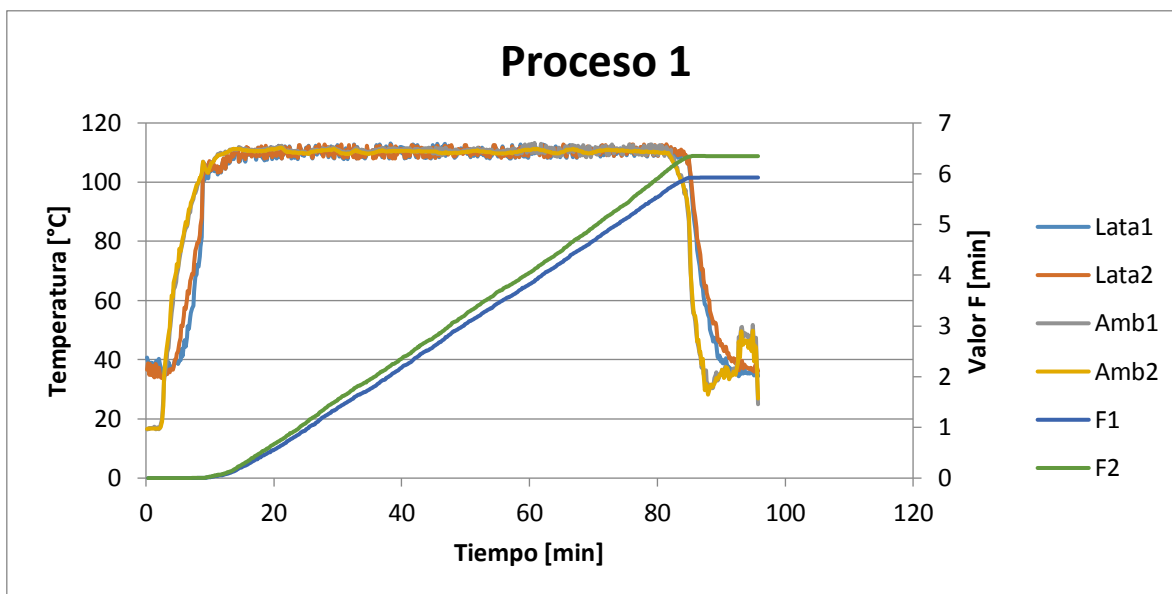


Figura 28. Curva de penetración de calor de proceso térmico a 110°C

4.1.2. Proceso 2

A continuación el gráfico de temperaturas y valor F del proceso 2. Este proceso es llevado a cabo a 120°C por aproximadamente 9 min. La curva de penetración de calor se encuentra representada en la figura 29 a continuación:

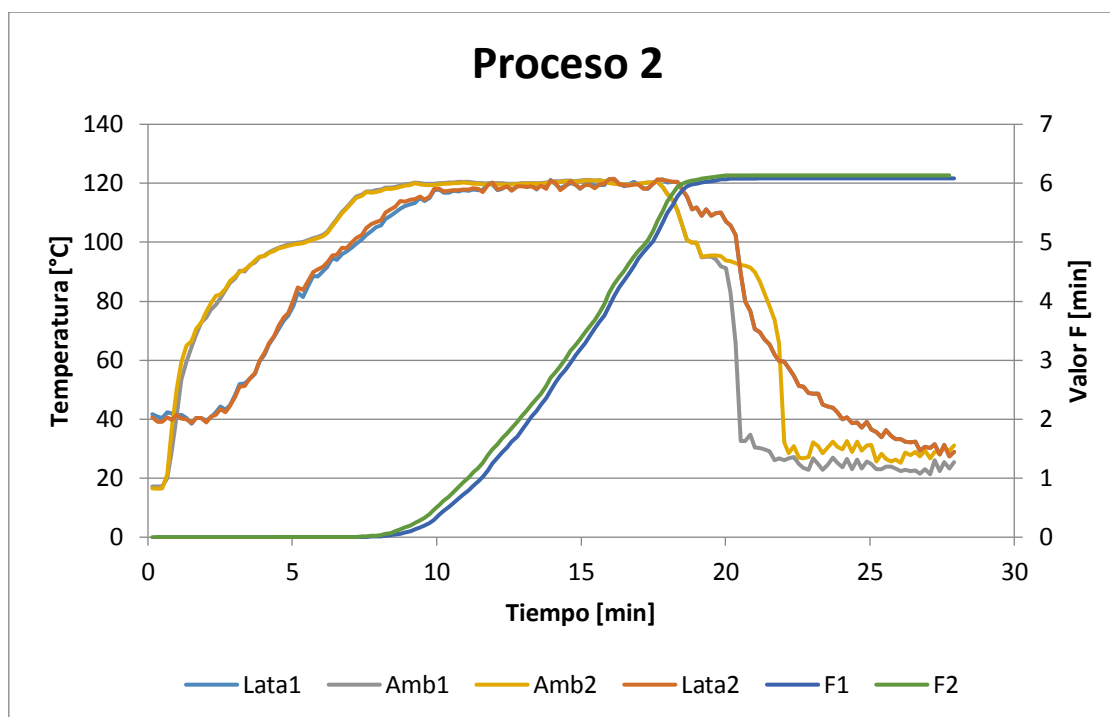


Figura 29. Curva de penetración de calor de proceso térmico a 120 °C

4.2. β -caroteno total

La cantidad total de β -caroteno obtenida a partir de muestras de zanahoria cruda es de $142,18 \pm 19,52 \mu\text{g/g}$ en base húmeda, que corresponde a $1246,10 \pm 171,12 \mu\text{g/g}$ en base seca. Todos los datos obtenidos están en Anexo 5.

Este valor es similar al reportador por (Nauman Ahamad, Saleemullah, Ullah Shah, Khalil, & Saljoqi, 2007), cuyo valor de extracción de β -caroteno obtenido para un tipo de zanahoria local fue de $112,1 \mu\text{g/g}$ en base húmeda.

La cantidad total de β -caroteno presente por cada gramo de zanahoria se utiliza como referente para el cálculo de la bioaccesibilidad (%).

4.3. Parámetros de muestras

Los valores de humedad y de dureza obtenidos para las muestras se detallan en la Tabla 6. Todos los valores de humedad y de dureza obtenidos se encuentran en los Anexos 7 y 8 respectivamente.

Tabla 6. Parámetros de muestras: Humedad y dureza

	Control	Proceso 1	Proceso 2
Humedad [%]	88,59 ± 1,45 ^{*a}	91,01 ± 0,42 ^{*b}	91,12 ± 0,17 ^{*b}
Dureza [N]	128,98 ± 22,58 ^{*a}	2,23 ± 0,23 ^{*b}	3,27 ± 0,62 ^{*b}

* letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras

Los valores anteriormente presentados han sido evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software *Statgraphic Centurion*, con un 95% de confianza y dado un nivel de probabilidad menor a 0.05 ($p < 0.05$). Además se analizan las diferencias entre las medias de los grupos mediante un test de rangos múltiples (Duncan) con un nivel de confianza del 95%.

4.3.1. Humedad

Para la muestra de cada proceso se ha determinado un valor de humedad. Esta se utiliza para poder calcular los resultados de concentración en base seca y poder compararlos entre sí.

El análisis de varianza (ANOVA) de la humedad estipula que hay diferencias significativas entre los 3 grupos de datos. El test de Duncan indica que la humedad el Proceso 1 y del Proceso 2 no presentan diferencias significativas. La zanahoria cruda en cambio, presenta diferencias significativas entre los otros 2 grupos. Esto quiere decir que la humedad del alimento aumenta levemente al ser tratado térmicamente, sin embargo no hay diferencias significativas entre procesos los térmicos con distintas temperaturas (Proceso 1 o Proceso 2). Esto demuestra que la zanahoria absorbe parte del líquido de cobertura de la lata durante el tratamiento. Si bien hay diferencias entre la zanahoria cruda y la procesada, es probablemente que esta sea imperceptible por los consumidores debido a que los valores son similares.

4.3.2. Dureza

Para evaluar la textura de la muestra se ha empleado un test de compresión para cubos de cada proceso. Se utiliza el parámetro de dureza (medida en Newton), dato que es otorgado por el texturómetro una vez concluido el ensayo de compresibilidad.

El test ANOVA indica que si existen diferencias significativas entre los valores de dureza entre los tres grupos. El test de Duncan determina el alimento sin procesar es aquel que difiere significativamente con los otros procesos. Esto implica que la dureza de la zanahoria cruda es diferente a las de las muestras procesadas, pero las muestras procesadas entre sí no presentan una diferencia significativa en su dureza. Esto indica que no hay efecto relevante de los parámetros del procesamiento térmico en la dureza obtenida.

Los valores obtenidos en la dureza demuestran que la estructura de la zanahoria cambia drásticamente con el tratamiento térmico. Los cambios de dureza al procesar los alimentos es probablemente uno de los parámetros más perceptible por los consumidores. En el caso de la zanahoria, su consumo es habitual tanto cruda como cocida, por lo que el cambio en su estructura al ser procesada no es percibido como un efecto negativo, sino más bien una característica, a veces deseada, para su consumo.

4.4. Efecto del procesamiento térmico en color del alimento

La medición del color ha sido evaluada mediante un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software *Statgraphic Centurion*. Los análisis se realizan con un 95% de confianza y un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$). Además se analizó las diferencias entre las medias de los grupos mediante un test de rangos múltiples (Duncan).

Para las diferencias de color se ha calculado el valor ΔE para cada interacción (Control-Proceso 1, Proceso 1-Proceso 2 y Control-Proceso 2). Para esto se ha calculado cada dato con respecto al promedio del proceso a comparar. El resumen de los datos obtenidos se tiene en la tabla 7 (para ver todos los datos ir a anexo 9).

Tabla 7. Tabla resumen de valor ΔE entre procesos

	Valor ΔE
Control – Proceso 1	$22,36 \pm 3,11$ * ^a
Proceso 1 – Proceso 2	$5,55 \pm 1,29$ * ^b
Control – Proceso 2	$20,34 \pm 3,35$ * ^a

*n=9; letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras

Mediante un análisis de varianza se tiene que existen diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los 3 grupos de datos con un 95% de confianza. Esto implica que hay diferencias en el valor ΔE entre los tres grupos.



Una vez rechazada la hipótesis nula de que no hay diferencia entre más de dos medias, se realiza el análisis de factores múltiples para determinar cuáles pares de medias son diferentes. Para esto se utiliza el test de rangos múltiples de Duncan.

Con un nivel de confianza del 95%, el test de Duncan determina que la columna 2 (Proceso 1 – Proceso 2) es aquella que difiere significativamente con los otros grupos. Esto implica que la diferencia de color ΔE entre ambas muestras procesadas es diferente a la diferencia de color ΔE que involucra a la zanahoria cruda, ya sea con el Proceso 1 o con el Proceso 2.

Se determina que no hay diferencias significativas entre la interacción Cruda – Proceso 1 y la interacción Cruda – Proceso 2, es decir, la muestra de zanahoria cruda difiere en color de igual manera con ambas muestras procesadas térmicamente.

De acuerdo con los valores anteriores, el consumidor humano puede distinguir diferencias de color entre las muestras crudas y aquellas procesadas. Sin embargo, la diferencia de color entre ambas muestras procesadas es levemente perceptible al ojo humano.

4.5. Masticación

4.5.1. Comparación métodos *in vivo* e *in vitro*

La simulación *in vitro* de la masticación se contrasta con la masticación real de un voluntario, para lo cual se compara el parámetro X_{50} del Modelo de Rosin Rammler. En la figura 30, se muestran el resumen de datos para cada proceso, en el cual se contrastan los ciclos *in vitro* e *in vivo* para cada uno.

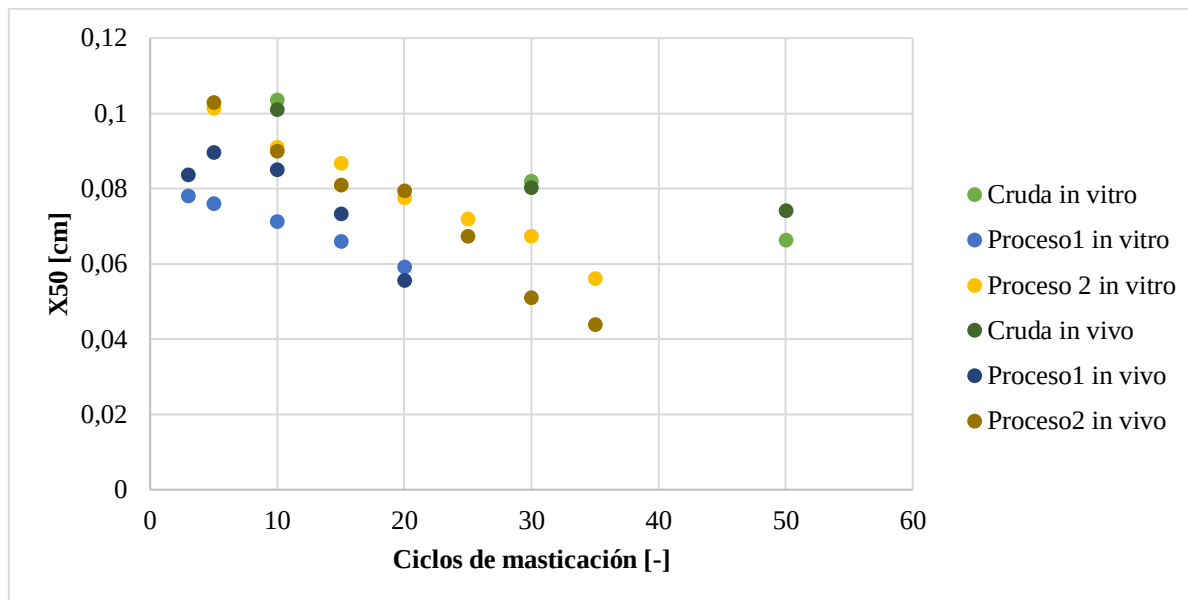


Figura 30. Gráfica de distribución de tamaños según ciclos de masticación

Si bien el proceso de masticación va a variar dependiendo de la persona y sus características, se puede observar que, para los tres procesos y los diferentes ciclos de masticación, los valores del parámetro X_{50} de las muestras *in vivo* se asemejan a los de las muestras *in vitro*. Para corroborar que efectivamente son procesos de fragmentación equivalentes, se evalúa estadísticamente la distribución de tamaño de partículas de las muestras entre métodos *in vivo* e *in vitro*.

Debido a que las muestras masticadas no presentan una distribución normal, los parámetros como el promedio y la desviación estándar no son apropiados para comparación de muestras. En este tipo de muestras se requiere utilizar métodos no paramétricos para determinar si ambas muestras a comparar (*in vivo* e *in vitro*) provienen de una misma población (Ramírez & Aguilera, 2011). En este caso se realizó un análisis estadístico con el test de Kruskal-Wallis.

El test de Kruskal-Wallis comprueba la hipótesis nula de que las medianas de cada par de muestras son iguales. Dado que el valor P es mayor o igual que 0.05, se reconoce que no existen diferencias significativas entre ambas muestras (*in vivo* e *in vitro*) con un 95% de confianza. Es decir, ambas muestras presentan distribución de tamaños equivalentes, por lo que se valida que provienen de una misma población. Para ver el parámetro de distribución de tamaños promedio obtenido en cada proceso y sus ciclos de masticación ver anexos 2,3 y 4.

Dado que este análisis corrobora que ambas muestras son equivalentes, se valida el equipo Masticador UTFSM como un equipo fiable para simular la masticación humana, y así representar de manera fidedigna la fractura de los alimentos.

4.5.2. Efecto de los ciclos de masticación en el tamaño de partícula

Debido a los cambios en el alimento durante el tratamiento térmico, para cada proceso se requieren diferentes ciclos de masticación para lograr la misma distribución de tamaños. Para esto se ha buscado una equivalencia de ciclos según el proceso, que originen una misma distribución. Los niveles de tamaños de partículas se han escogido en base a los datos obtenidos por la zanahoria cruda a 10, 30 y 50 ciclos de masticación, lo que ha originado X_{50} de 1mm, 0,8mm y 0,7 mm respectivamente (ver figura 31).

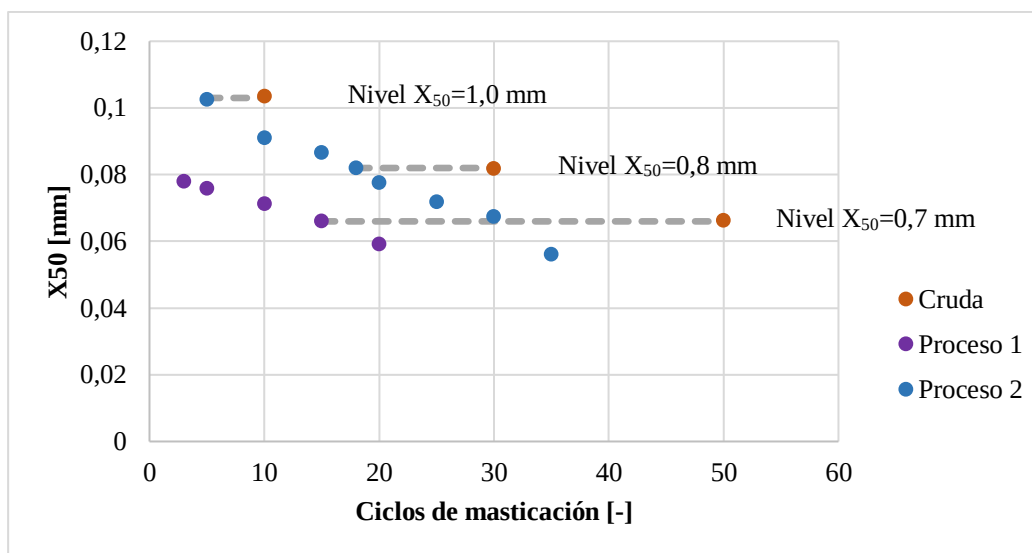


Figura 31. Ciclos de masticación que logran una distribución de tamaño equivalente entre sí

La cantidad total de datos agrupados en las muestras se compara según el test de Kolmogorov-Smirnov mediante el software *Statgraphic Centurion*. La prueba de Kolmogorov-Smirnov es un test no paramétrico que determina la bondad de ajuste de dos distribuciones de probabilidad entre sí. Los análisis se realizan con un 95% de confianza y un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$).

Para originar una muestra cuya distribución de tamaño sea $X_{50}=1,0$ mm se tiene que el proceso 2 requiere 5 ciclos de masticación. Entre ambas muestras Cruda y Proceso 2

(Figura 32) el test de Kolmogorov-Smirnov estipula que no hay diferencias significativas entre ambas muestras.

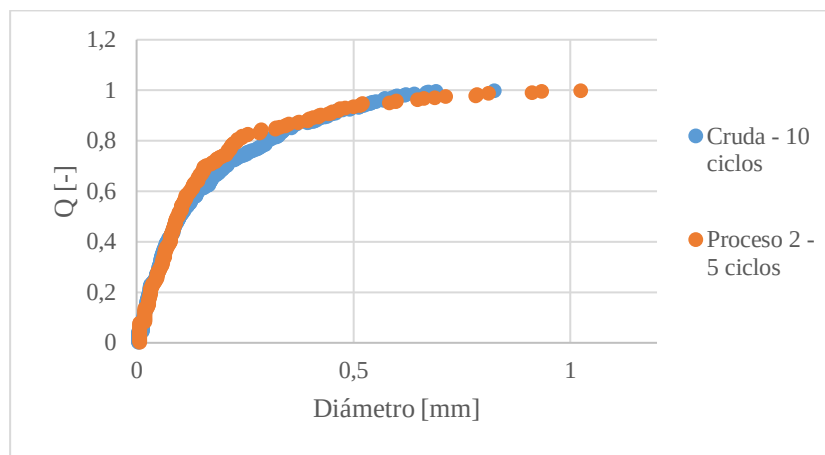


Figura 32. Distribución de tamaño de muestras para el nivel $X_{50}=1,0\text{mm}$

Se tiene que para originar una muestra cuya distribución de tamaño sea $X_{50}=0,8\text{ mm}$ se tiene que el proceso 1 requiere de 3 ciclos y el Proceso 2 requiere de 18 ciclos de masticación. El test de Kolmogorov-Smirnov estipula que no hay diferencias significativas entre las 3 muestras evaluadas (Cruda, Proceso 1 y Proceso 2) (Figura 33).

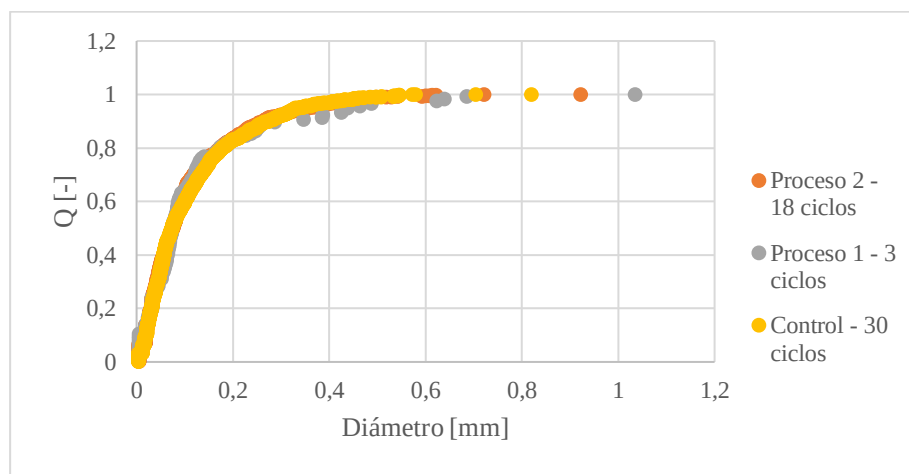


Figura 33. Distribución de tamaño de muestras para el nivel $X_{50}=0,8\text{mm}$

Y por último, para originar una muestra cuya distribución de tamaño sea $X_{50}=0,7\text{ mm}$ se tiene que el proceso 1 requiere de 15 ciclos y el Proceso 2 requiere de 30 ciclos de masticación. El test de Kolmogorov-Smirnov estipula que no hay diferencias significativas entre las 3 muestras evaluadas (Cruda, Proceso 1 y Proceso 2) (Figura 34).

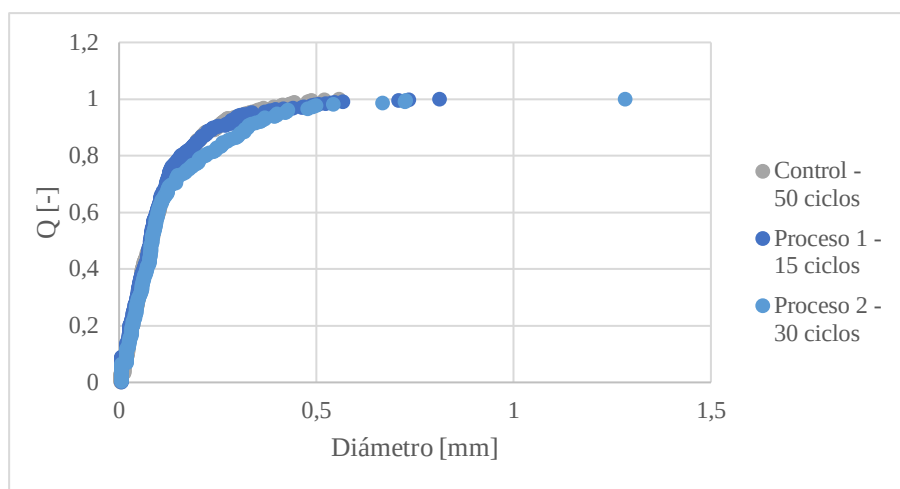


Figura 34. Distribución de tamaño de muestras para el nivel $X_{50}=0,7\text{mm}$

Acorde con los análisis anteriores realizados, para los 3 niveles de X_{50} estudiados (1,0mm; 0,8mm y 0,7mm), se corrobora que las muestras que originan un mismo X_{50} son equivalentes entre sí. Por lo tanto se definen los ciclos de masticación para cada proceso que originan muestras cuya distribución de tamaño es equivalente a otra muestra de otro proceso. Los resultados de los ciclos equivalentes según el proceso se tienen en la tabla 8.

Tabla 8. Equivalencia de ciclos para cada proceso

X_{50}	Cruda	Proceso 1	Proceso 2
1,0	10	-	5
0,8	30	3	18
0,7	50	15	30

4.6. Bioaccesibilidad de β -caroteno

En este segmento las concentraciones han sido determinadas por la curva de calibración de hexano.

Los datos de esta sección han sido evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de confianza y un nivel de probabilidad de 0.05 ($p < 0.05$). Se ha utilizado el test de rangos múltiples de Duncan.

4.6.1. Comparación según ciclos de masticación

Zanahoria cruda

Para la zanahoria cruda, el promedio de los valores de β -caroteno bioaccesible se encuentran en la tabla 9 (para ver todos ir a Anexo 10).

Tabla 9. β -caroteno bioaccesible de zanahoria cruda.

Zanahoria cruda			
Ciclos de masticación	10	30	50
β-caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	$19,74 \pm 0,22^{*a}$	$23,13 \pm 0,37^{*b}$	$27,42 \pm 1,27^{*c}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Se observa que hay diferencias significativas entre los 3 grupos de datos según los ciclos de masticación evaluados (10, 30 y 50). Se corrobora para la zanahoria cruda que la masticación tiene un efecto relevante e influyente en la liberación de β -caroteno. Se observa una tendencia lineal de la bioaccesibilidad en función de los ciclos de masticación (ver Figura 35).

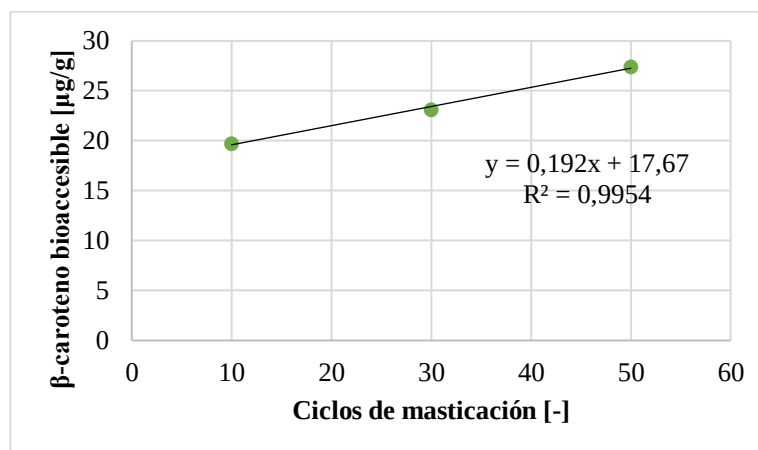


Figura 35. Bioaccesibilidad según ciclos masticación Zanahoria cruda

Zanahoria procesada por Proceso 1 (110°C)

Para el Proceso 1 se tienen los valores de β -caroteno bioaccesible en la tabla 10 (graficados en Figura 36). Para ver todos los valores, ir a Anexo 10.

Tabla 10. β -caroteno bioaccesible de proceso 1

Proceso 1 (110°C y 66min)		
Ciclos de masticación	3	15
β-caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	$29,73 \pm 3,21^{*a}$	$37,46 \pm 0,77^{*a}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Se observa que no hay diferencias significativas de β -caroteno bioaccesible, respecto de los ciclos de masticación. Se indica que para la zanahoria procesada a 110°C que la masticación no posee un efecto relevante en la liberación de β -caroteno, entre 3 y 15 ciclos de masticación.

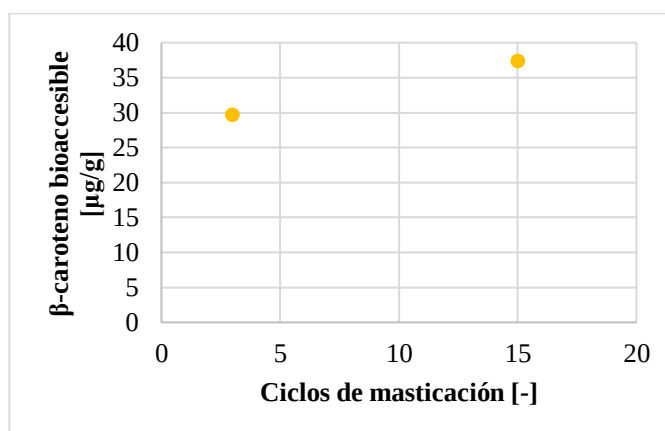


Figura 36. Bioaccesibilidad según ciclos de masticación Proceso1

Zanahoria procesada por Proceso 2 (120°C)

Para el Proceso 2 se tienen los valores de β -caroteno bioaccesible en la tabla 11, para ver todos los valores, ir a anexo 10.

Tabla 11. β -caroteno bioaccesible de proceso 2

Proceso 2 (120°C y 9min)			
Ciclos de masticación	5	18	30
β-caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	$46,86 \pm 1,71^{*a}$	$71,36 \pm 3,33^{*b}$	$79,05 \pm 6,32^{*b}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Se observa que hay diferencias significativas entre el valor a 5 ciclos de masticación con aquellos a 18 y 30 ciclos de masticación. Entre estos dos últimos datos no hay diferencias significativas. Esto permite suponer que para la muestra tratada térmicamente por el Proceso 2, la cantidad de ciclos tiene menos efecto en la liberación de β -caroteno a medida que aumentan. Si hay un efecto de la masticación en la liberación de β -caroteno entre 5 y 30 ciclos de masticación. Se muestra en la Figura 37, una tendencia exponencial entre la bioaccesibilidad de β -caroteno y los ciclos de masticación para el Proceso 2.

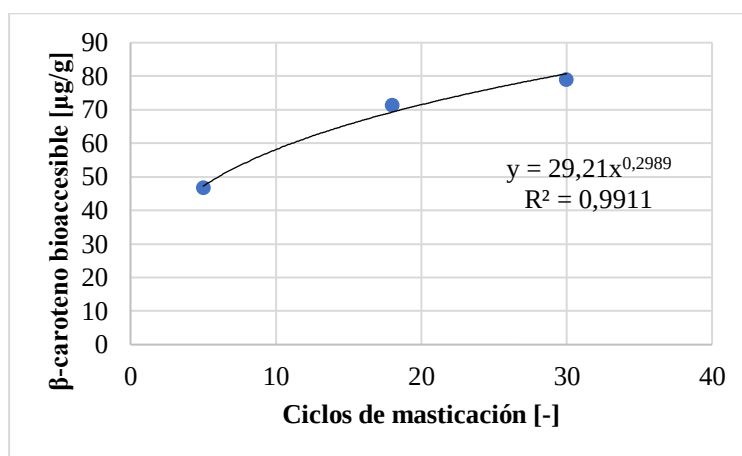


Figura 37. Bioaccesibilidad según ciclos de masticación Proceso2

El contenido bioaccesible de β -caroteno para todos los procesos se puede observar en la figura 38. Este gráfico está en función de los ciclos de masticación utilizados para cada muestra.

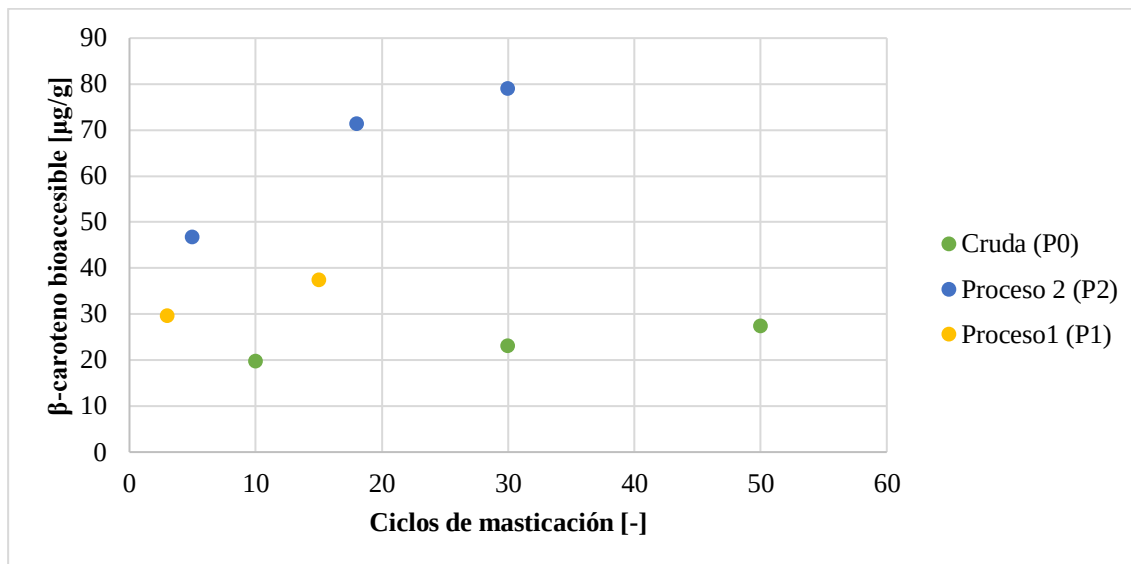


Figura 38. Bioaccesibilidad según los ciclos de masticación aplicados en cada proceso

Se puede observar que para un mismo número de ciclos de masticación (30), la cantidad bioaccesible de β -caroteno en el Proceso 2 es notoriamente mayor a la zanahoria cruda.

Por otro lado, para una cantidad de β -caroteno bioaccesible similar (30 $\mu\text{g/g}$ aprox.) se tiene que para la zanahoria cruda se han requerido 50 ciclos de masticación, mientras que para la zanahoria procesada por el proceso 1 solo se han requerido 3 ciclos.

Es importante destacar la diferencia entre la cantidad liberada para la zanahoria cruda con respecto a la cantidad liberada para las muestras procesadas. Al aumentar los ciclos de masticación en la zanahoria cruda de 10 a 50 hay un aumento de 39% en la liberación de β -caroteno. Al ser procesada a 120°C, para un mismo cambio en la distribución de tamaño de partícula (equivalente de 5 a 30 ciclos) el contenido bioaccesible de la zanahoria aumenta en un 69%.

4.6.2. Comparación según distribución de tamaño (X_{50})

Para poder comparar las muestras entre sí se evalúan los datos según la distribución de tamaños de partículas de la muestra. A continuación en las tablas 12, 13 y 14 se muestran los datos según parámetro de distribución de tamaño de partícula (X_{50}) en los 3 niveles.

Primer nivel: $X_{50} = 1 \text{ mm}$

Tabla 12. β -caroteno bioaccesible según $X_{50}=1,0\text{mm}$

$X_{50} = 1,0 \text{ mm}$	β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]
Control (zanahoria cruda)	$19,74 \pm 0,22^{*a}$
Proceso 2 (120°C y 9min)	$46,86 \pm 1,71^{*b}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Segundo nivel: $X_{50} = 0,8 \text{ mm}$

Tabla 13. β -caroteno bioaccesible según $X_{50}=0,8\text{mm}$

$X_{50} = 0,8 \text{ mm}$	β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]
Control (zanahoria cruda)	$23,13 \pm 0,37^{*a}$
Proceso 1 (110°C y 66min)	$29,73 \pm 3,21^{*a}$
Proceso 2 (120°C y 9min)	$71,36 \pm 3,33^{*b}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Tercer nivel: $X_{50} = 0,7 \text{ mm}$

Tabla 14. β -caroteno bioaccesible según $X_{50}=0,7\text{mm}$

$X_{50} = 0,7 \text{ mm}$	β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]
Control (zanahoria cruda)	$27,42 \pm 1,27^{*a}$
Proceso 1 (110°C y 66min)	$37,46 \pm 0,77^{*a}$
Proceso 2 (120°C y 9min)	$79,05 \pm 6,32^{*b}$

*n=2; letras diferentes indican diferencias significativas entre sí

Los valores anteriores se encuentran representados en el gráfico (ver Figura 39) de concentración de β -caroteno bioaccesible en función de X_{50} .

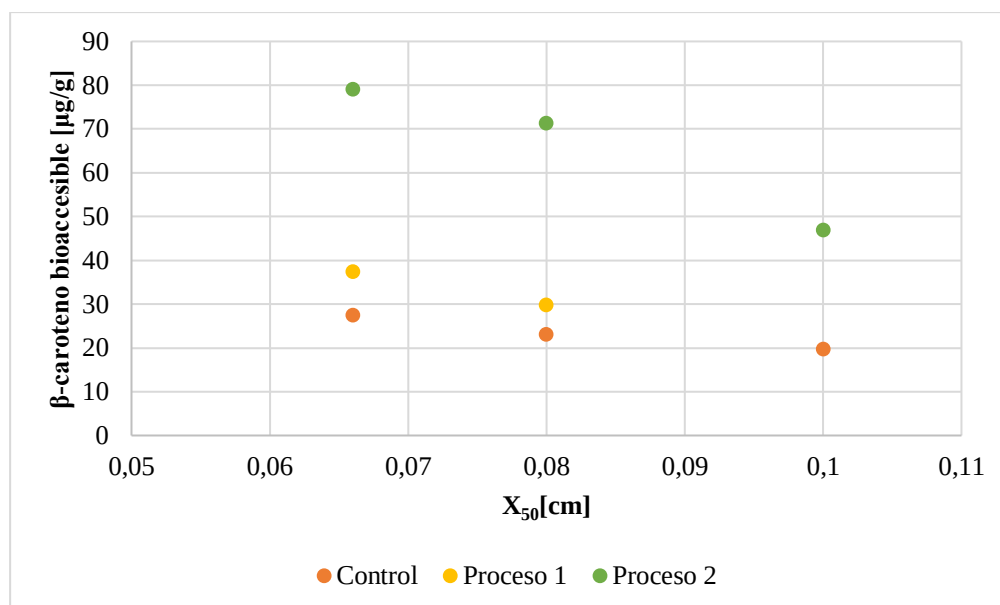


Figura 39. Bioaccesibilidad µg/g según distribución de tamaño de la muestra (X₅₀)

Los resultados indican que para una misma distribución de tamaños (i.e., X₅₀ = 0.7mm), en el caso de muestras crudas se obtiene una liberación de β-caroteno de $27.42 \pm 1.27 \mu\text{g/g}$, la cual es menor al obtenido en el Proceso 1 ($37.46 \pm 0.77 \mu\text{g/g}$) y Proceso 2 ($79.05 \pm 6.32 \mu\text{g/g}$).

Entre ambos procesos térmicos aquel que favorece la liberación de β-caroteno es el Proceso 2, es decir aquel procesado a mayor temperatura (120°C). Para una misma distribución de tamaños (i.e., X₅₀ = 0.8mm), en el caso de Proceso 1 se obtiene $29.73 \pm 3.21 \mu\text{g/g}$ de β-caroteno liberado y en el Proceso 2 se liberan $71.36 \pm 3.33 \mu\text{g/g}$.

4.6.3. Bioaccesibilidad (%)

En la Tabla 15 se encuentran los valores de bioaccesibilidad (%) respecto del total de β-caroteno extraído de una zanahoria cruda (contenido de β-caroteno: $1246.10 \pm 171.11 \mu\text{g/g}$ en base seca).



Tabla 15. Bioaccesibilidad de b-caroteno (%) para las combinaciones de variables evaluadas

X₅₀ mm	1	0,8	0,7
Control	1,58 %	1,86 %	2,20 %
110°C	-	2,39 %	3,01 %
120°C	3,76 %	5,73 %	6,34 %

Aquel proceso que ha tenido una mayor bioaccesibilidad en porcentaje es el Proceso 2, para todas las distribuciones de tamaño, siendo el mayor valor de bioaccesibilidad un 6,34% para $X_{50} = 0,7$ mm.

Para todas las combinaciones de variables estudiadas, se comprueba que la bioaccesibilidad de β -caroteno en muestras de zanahoria no supera el 7%. Este valor es congruente con aquel estudiado por (Tydeman, y otros, 2010), donde evalúa la bioaccesibilidad de β -caroteno en puré de zanahoria cocida, y cuyo valor no superan el 10,8%.

4.4.7. Análisis estructural

La liberación de β -caroteno durante la digestión (bioaccesibilidad de β -caroteno) puede ser vista como un proceso de "barrera múltiple": se necesita superar diferentes "obstáculos" (membranas de organelos, membrana celular, pared celular) para liberar β -caroteno de la célula. El tratamiento térmico elimina barreras adicionales, resultando en una liberación más completa de β -caroteno (Lemmens, Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2011).

Para aquellas muestras procesadas térmicamente, en los tres niveles de distribución de tamaño, hay una mayor liberación de β -caroteno respecto de la zanahoria cruda. Es por esto que resulta relevante evaluar el efecto que tiene el tratamiento térmico en la estructura vegetal de la zanahoria. En la Figura 40 se observa la estructura para la zanahoria cruda, proceso 1 (110°C) y proceso 2 (120°C) con un aumento de 500X, obtenida mediante microscopía electrónica SEM.

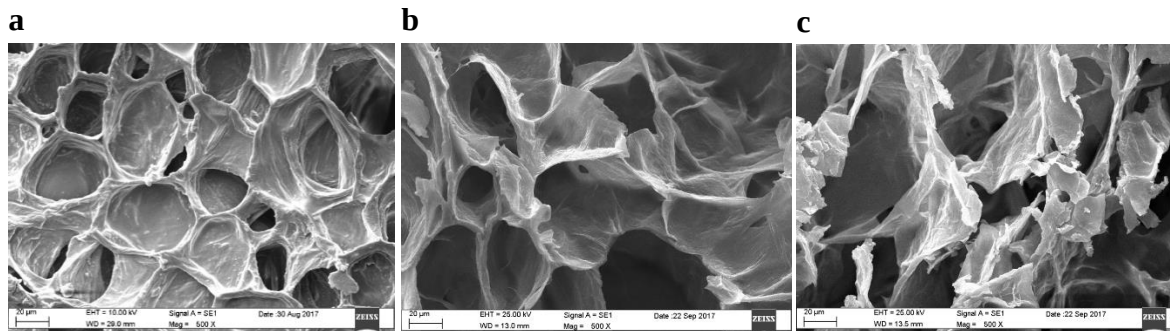


Figura 40. Muestra de zanahoria 500X (a) Cruda, (b) Proceso 1 (110°C), (c) Proceso 2 (120°C).

Se aprecia visualmente que en la zanahoria cruda (a), la estructura vegetal posee una organización mucho más compacta que las muestras procesadas (b, c). El tratamiento térmico causa un daño en la estructura de la zanahoria, lo que respalda la diferencia de durezas obtenidas en el ensayo de compresión de las muestras procesadas respecto de la cruda.

Al comparar entre ambas muestras procesadas térmicamente, se observa que el daño estructural es aparentemente más intenso en el Proceso 2, lo que explicaría el aumento de β -caroteno bioaccesible respecto del Proceso 1.

Si bien el tamaño de partículas entre ambas muestras es equivalente, la superficie de cada partícula posee diferente daño estructural, por lo que al aumentar el área superficial de la muestra mediante la masticación, se ve intensificado el efecto de liberación para la muestra más dañada. Otro factor importante, es la condición de motilidad del tracto digestivo, la cual ocasiona mayor desmenuzamiento de la muestra más dañada por lo que se intensifica nuevamente la liberación de β -caroteno.



Conclusiones

Los resultados de este trabajo indican la validez de hipótesis propuesta, es decir, la combinación tiempo-temperatura de un proceso térmico que logra un valor de F_0 de 6 min afecta la microestructura de la zanahoria, lo que influye en la bioaccesibilidad de β -caroteno. La masticación también demuestra ser un parámetro relevante en la bioaccesibilidad de β -caroteno.

El tratamiento térmico de esterilización tiene un efecto positivo en la bioaccesibilidad de β -caroteno, para todas las distribuciones de tamaño evaluadas. Entre ambos procesos térmicos, aquel que tiene una mayor bioaccesibilidad de β -caroteno es el proceso térmico a 120°C.

El análisis microscópico de la estructura celular, respalda que el daño que ocasiona el tratamiento a 120°C es mayor que aquel ocasionado por el proceso a 110°C. Debido a esto se intensifica la liberación de β -caroteno con respecto a este último. Si bien ambos procesos térmicos evaluados son equivalentes en términos de esterilización (Valor $F_0=6$ min), difieren en la liberación β -caroteno.

Por último, esta investigación se puede extender a otras matrices alimentarias en la producción de alimentos en conserva. El aprovechamiento nutritivo de los alimentos procesados es mayor a aquellos alimentos frescos, pero este aprovechamiento se puede incrementar según los parámetros de la esterilización térmica escogida.



Referencias

- Biswas, A., Sahoo, J., & Chatli, M. (2011). A simple UV-Vis spectrophotometric method for determination of betacarotene content in raw carrot, sweet potato and supplemented chicken meat nuggets. *Food science and technology* 44, 1809-1803.
- Bornhorst, G., & Singh, R. (2012). Bolus formation and sidintegration during digestion of food carbohydrates. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 101-118.
- Carbonell-Capella, J., Buniowska, M., Barba, F., Esteve, M., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: a review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 155-171.
- Cásseres, E. (1966). *Producción de hortalizas*. Lima, Perú: IICA.
- Chen, B., Chen, T., & Chien, J. (1994). Kinetic Model for Studying the Isomerization of a- and b-carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2391-2397.
- Coultate, T. (2002). *Food: The Chemistry of Its Components*. UK: Royal society of chemistry.
- Donhowe, E. G., Flores, F. P., Kerr, W. L., Wicker, L., & Kong, F. (2014). Characterization and in vitro bioavailability of B-Carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. *LWT-Food Science and Technology*, 42-48.
- FAO. (19 de 08 de 2016). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/V5030e/V5030E0q.htm>
- FAO. (2017). *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Obtenido de <http://www.fao.org/docrep/010/ai407e/AI407E22.htm>
- García, M., López-Munguía, A., & Quintero, R. (2004). *Biotechnología alimentaria*. Balderas, México: Limusa.
- Garrett, D., Failla, M., & Sarama, R. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4301-4309.
- Hedré, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal of Clinical Nutrition*, 425-430.



- Howard, L., Braswell, D., & Aselage, L. (1996). Chemical Composition and Color of Strained Carrots as Affected by Processing. *Journal of Food Science* 61.2, 327-330.
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food Chemistry* 125, 1-12.
- Ibarz, A., & Barbosa-Cánovas, G. (2011). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Madrid - México: Mundi Prensa.
- Kong, F., & Singh, R. (2008). Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *Journal of food science*, R67-R80.
- Lemmens, L., Colle, I., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2011). Quantifying the influence of Thermal Process Parameters on in Vitro B-carotene bioaccessibility: A case study on carrots. *J. Agric. Food Chem*, 3162-3167.
- Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Indrawati, O., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2009). Towards a better understanding of the relationship between the b-carotene in vitro bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. *Food Research International* 42, 1323-1330.
- Nauman Ahamad, M., Saleemullah, M., Ullah Shah, H., Khalil, I., & Saljoqi, A. (2007). Determination of betacarotene content in fresh vegetables using high performance liquid cromatography. *Sarhad Journal of Agriculture No3 Vol 23*, 767-770.
- Olthoff, L. W., Van der Bilt, A., Bosman, F., & Kleizen, H. H. (1984). Distribution of particle sizes in food comminuted by human mastication. *Archives of Oral Biology*, Vol 29, N° 11, 899-903.
- Olthoff, L. W., Van der Bilt, A., De Boer, A., & Bosman, F. (1986). Comparision of force-deformation characteristics of artificial and several natural foods for chewing experiments. *Journal of Texture studies* 17.3, 275-289.
- Pamplona, J. (2002). *Salud por los alimentos*. Madrid: Ibergraphi.
- Parada, J., & Aguilera, J. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, R21-R32.
- Pharmacopeia.cn. (29 de 09 de 2016). *Pharmacopeia U.S.* . Obtenido de Test Solutions USP29: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_ris1s126.html
- Ramírez, C., & Aguilera, J. (2011). Determination of a representative area element (RAE) based on a nonparametric statistics in bread. *Journal of Food Engineering* 102, 197-201.



- Ramírez, C., Millón, C., Nuñez, H., Pinto, M., Valencia, P., Acevedo, C., & Simpson, R. (2014). Study of effect of sodium alginate on potato starch digestibility during in vitro digestion. *Food Hydrocolloids*, 44, 328-332.
- Roman, M., Burri, B., & Singh, R. (2012). Release and bioaccessibility of B-carotene from fortified almond butter during in vitro digestion. *J. Agric. Food Chem* 60, 9659-9666.
- Salles, C., Tarrega, A., Miele, P., Maratray, J., Gorria, P., Liaboeuf, J., & Liodenot, J. (2007). Development of a chewing simulator for food breakdown and the analysis of in vitro flavor compounds release in a mouth environment. *Journal of Food Engineering* 82, 189-198.
- Sernka, T., & Jacobson, E. (1982). *Fundamentos de fisiología gastrointestinal*. Reverté S.A.
- Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D., & Morante, S. (2010). *Análisis Instrumental*. La Coruña, España: Netbiblo.
- Simpson, R., & Holdsworth, S. (2016). *Thermal Processing of Packaged Foods*. Springer.
- Stahl, W., van der Berg, H., Arthur, J., Bast, A., Dainty, J., Faulks, R., & Astley, S. (2002). Bioavailability and metabolism. *Mol Aspect Med*, 39-100.
- Steiner, M., Mitsias, M. E., Ludwig, K., & Kern, M. (2009). In vitro evaluation of a mechanical testing chewing simulator. *Dental materials* 25, 494-499.
- Sweeney, J., & Marsh, A. (1971). Effect of processing on provitamin A in vegetables. *Journal of the American Dietetic Association* 59, 238-243.
- Tydemann, E., Parker, M., Wickham, M., Rich, G., Faulks, R., Gidley, M., . . . Waldron, K. (2010). Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 1. in vitro simulations of carrot digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9847-9854.
- UNL Food. (2017). *Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln*. Obtenido de <http://food.unl.edu/clostridium-botulinum>
- van der Bilt, A., Engelen, L., Pereira, L. J., van der Glas, H. W., & Abbink, J. H. (2006). Oral physiology and mastication. *Physiology & Behavior, Elsevier*, 22-27.
- von Doering, W., Sotiriou-Leventis, C., & Roth, W. (1995). Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans-beta-carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans-beta-carotene. *Journal of the American Chemical Society* 117, 2747-2757.



Woda, A., Mishellany-Dutour, A., Batier, L., François, O., Meunier, J.-P., Reynaud, B., . . .
Peyron, M.-A. (2010). Development and validation of a mastication simulator.
Journal of Biomechanics 43, 1667-1673.

Anexos

Anexo 1. Curvas de calibración

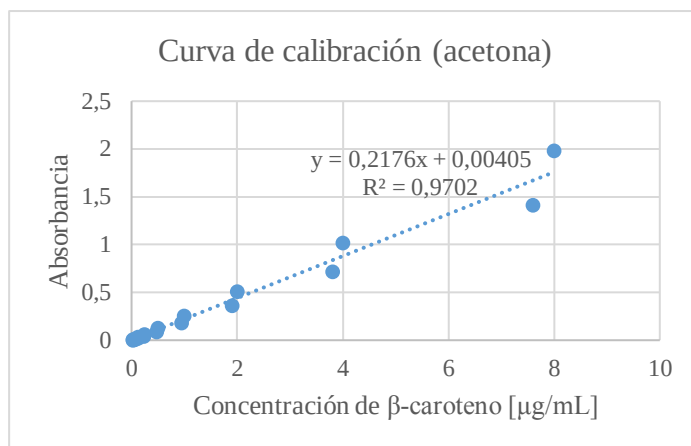


Figura 41. Curva de calibración de acetona

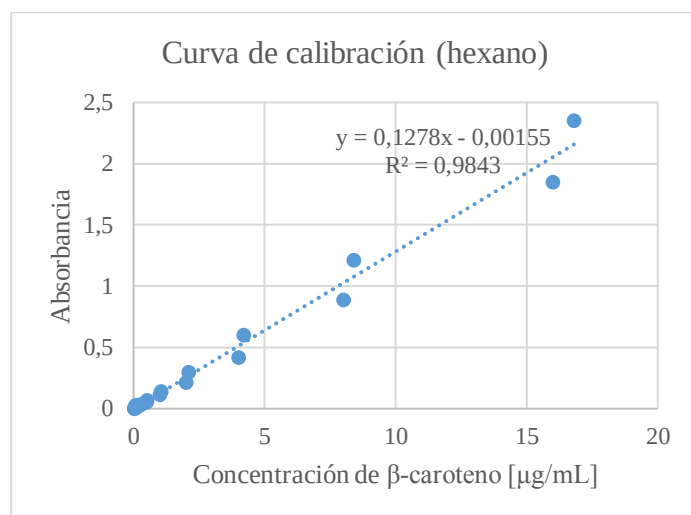


Figura 42. Curva de calibración de hexano

Anexo 2. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Zanahoria cruda

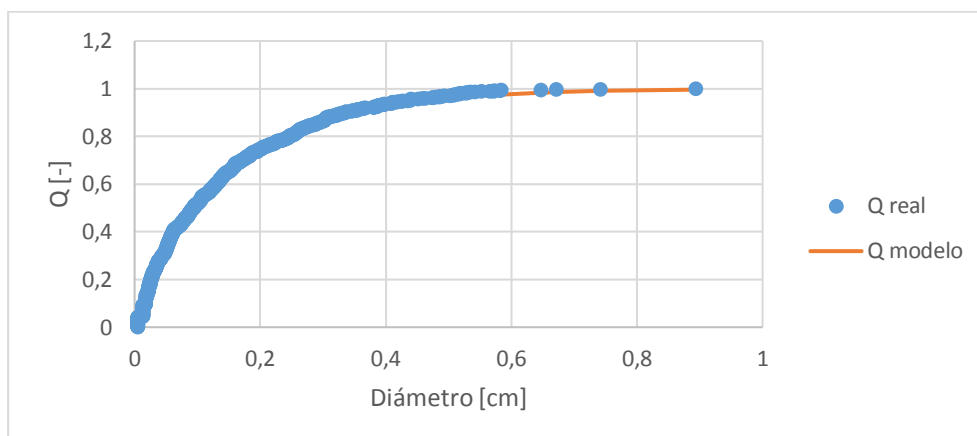


Figura 43. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 10ciclos invivo

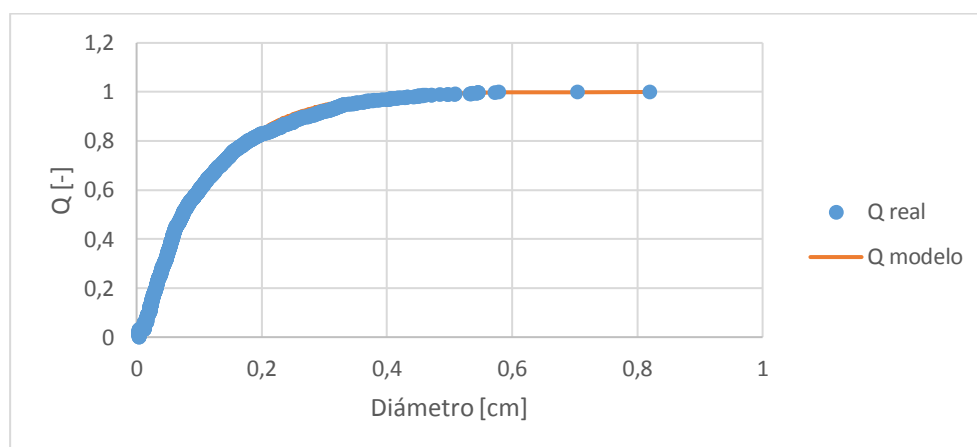


Figura 44. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 30ciclos in vivo

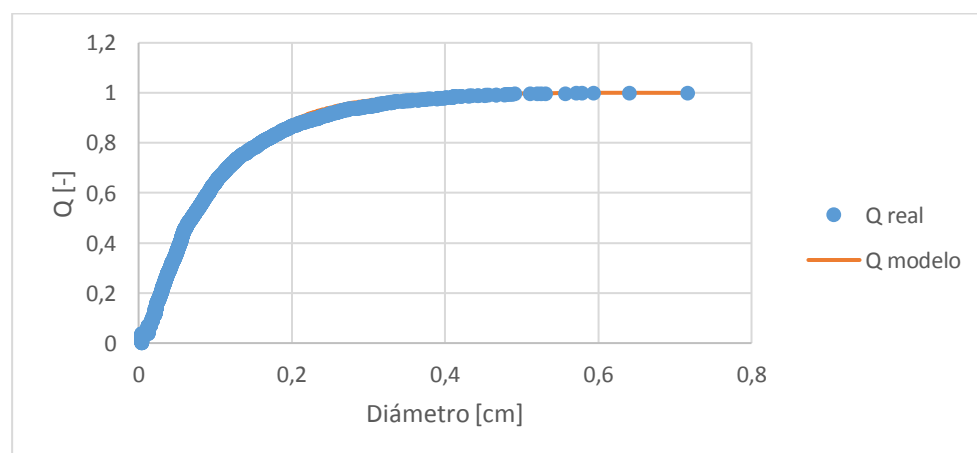


Figura 45. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 50ciclos invivo

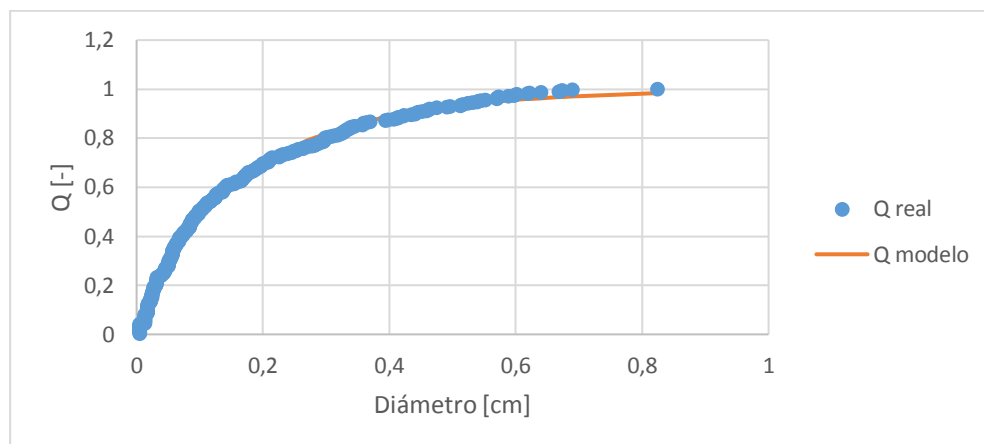


Figura 46. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 10ciclos in vitro

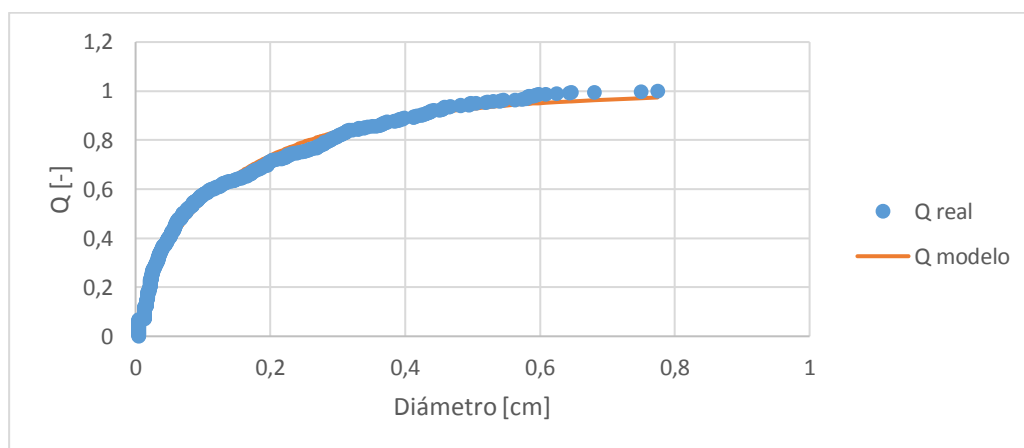


Figura 47. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 30ciclos in vitro

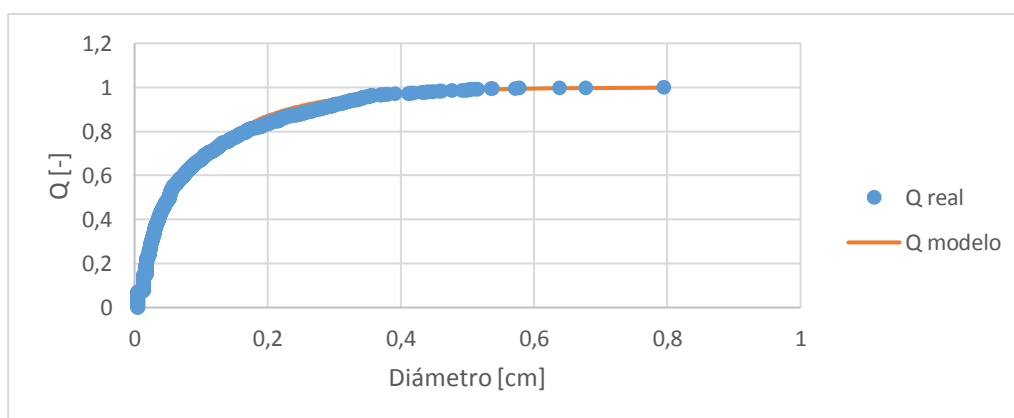


Figura 48. Gráfico resumen distribución de tamaño P0 - 50ciclos in vitro

Anexo 3. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Proceso 1

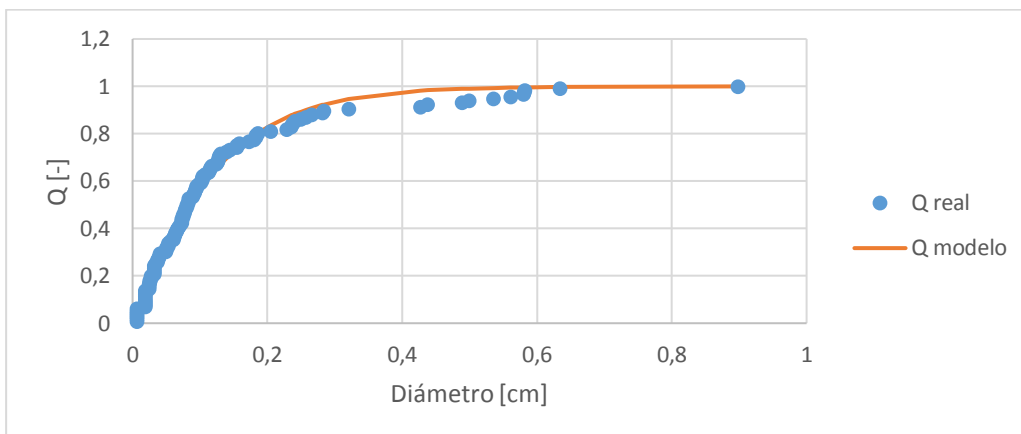


Figura 49. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 3 ciclos invivo

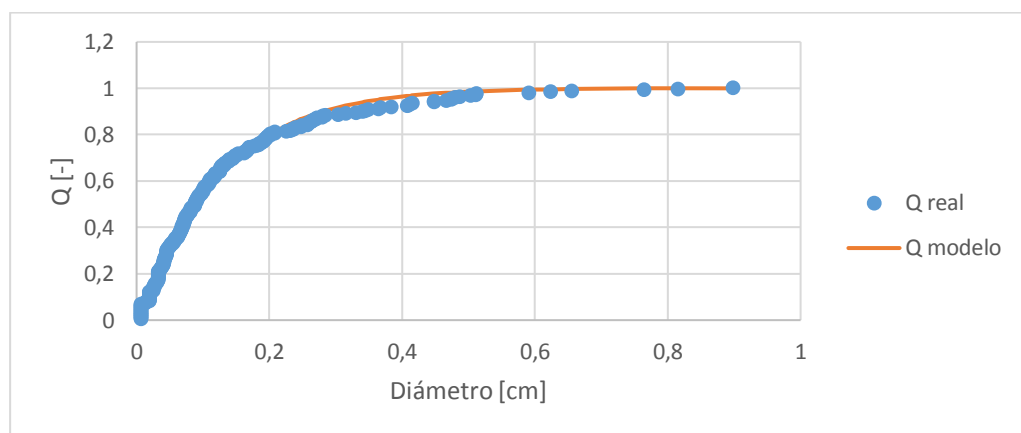


Figura 50. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 5 ciclos invivo

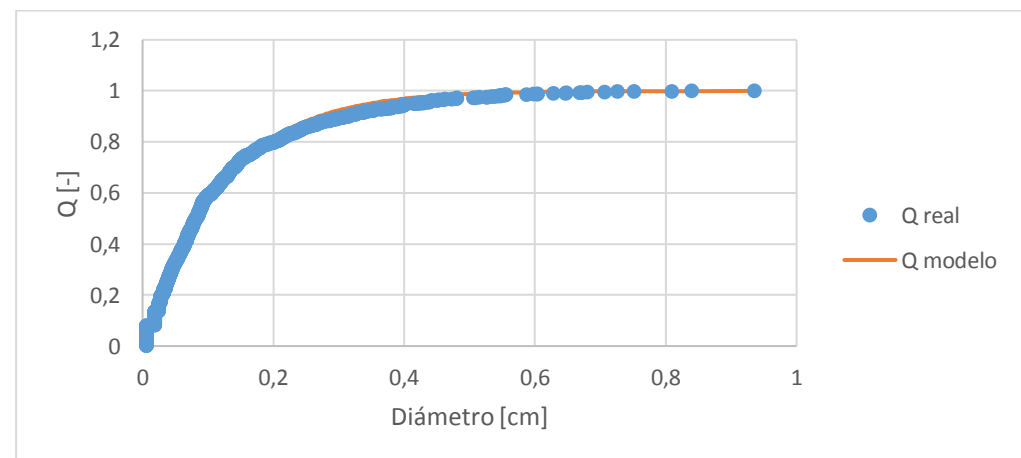


Figura 51. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 10 ciclos invivo

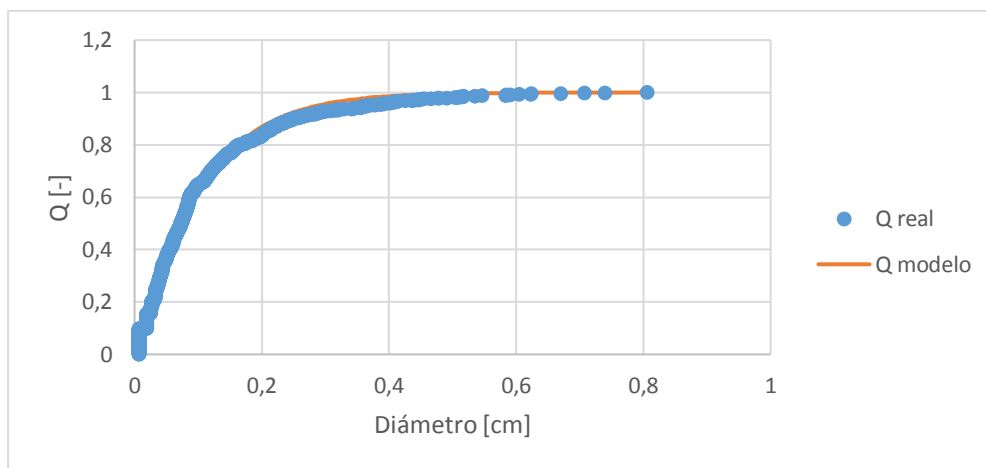


Figura 52. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 15 ciclos invivo

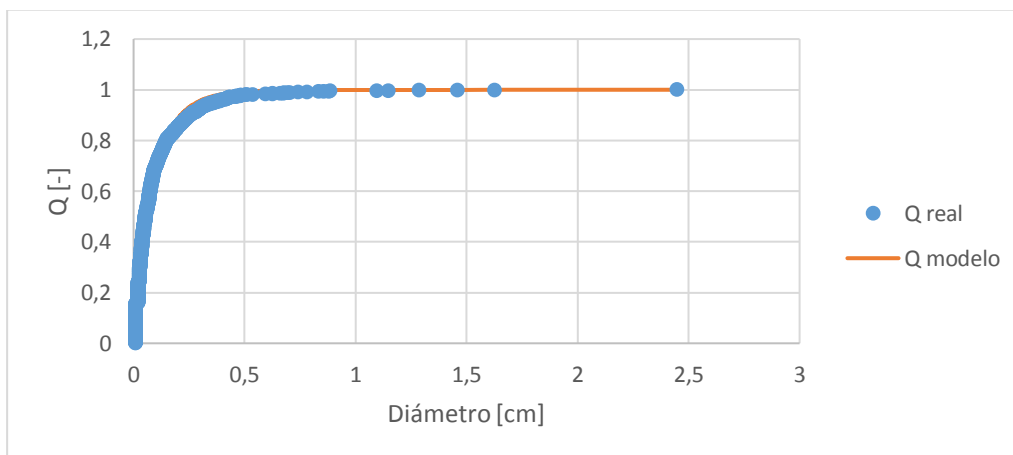


Figura 53. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 20 ciclos invivo

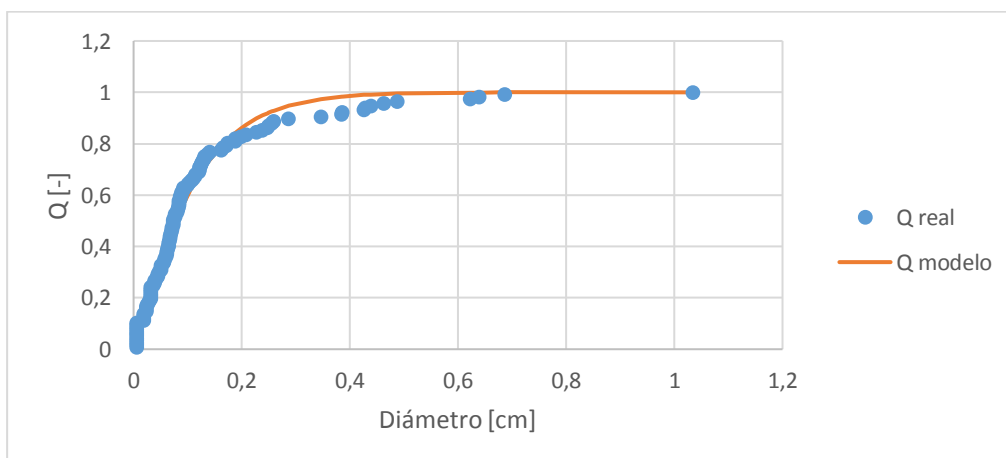


Figura 54. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 3 ciclos in vitro

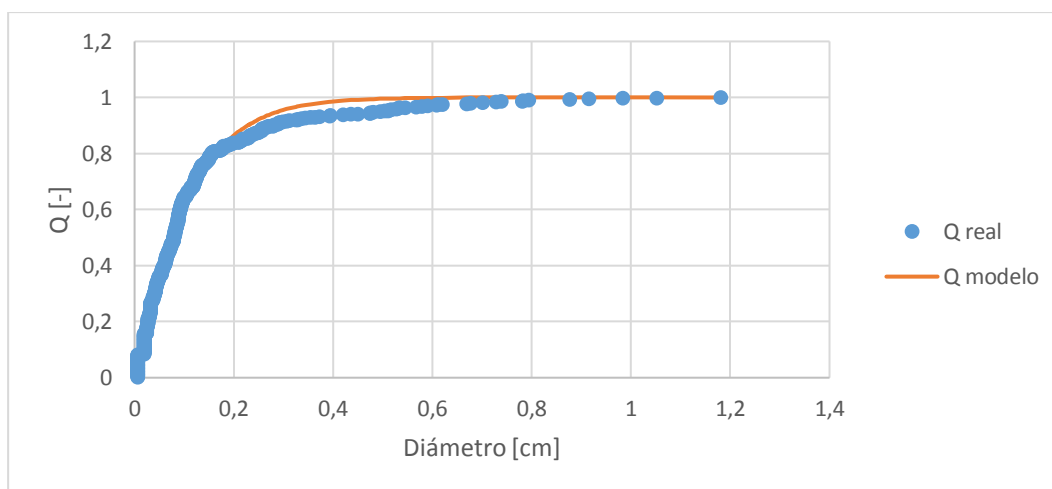


Figura 55. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 – 5 ciclos in vitro

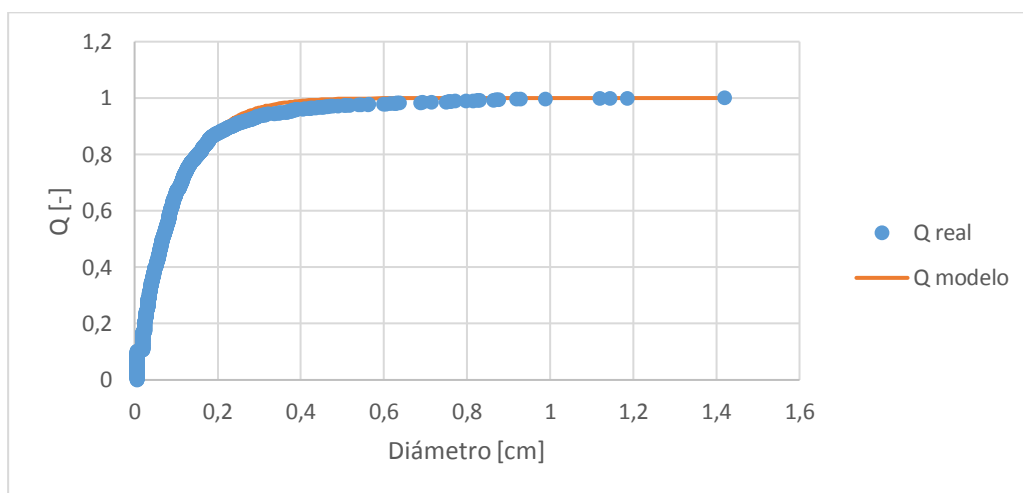


Figura 56. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 – 10 ciclos in vitro

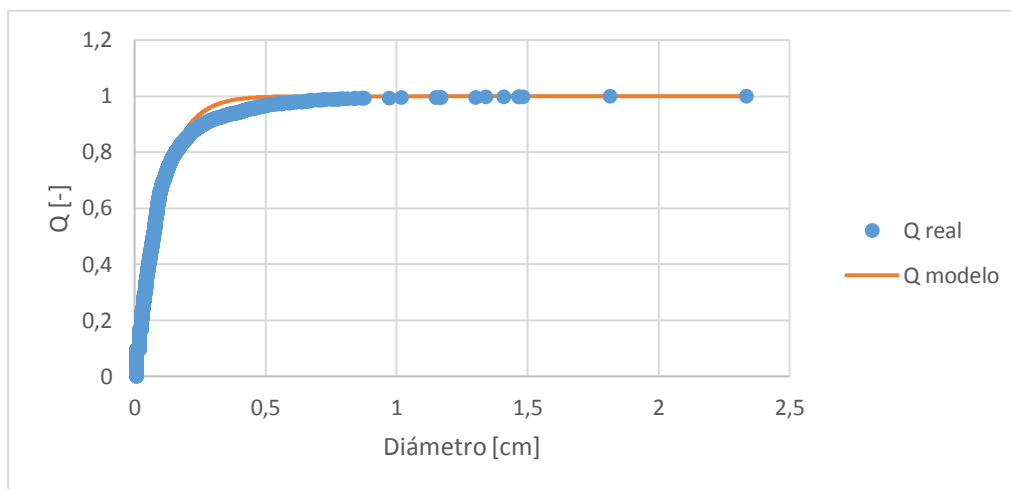


Figura 57. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 – 15 ciclos in vitro

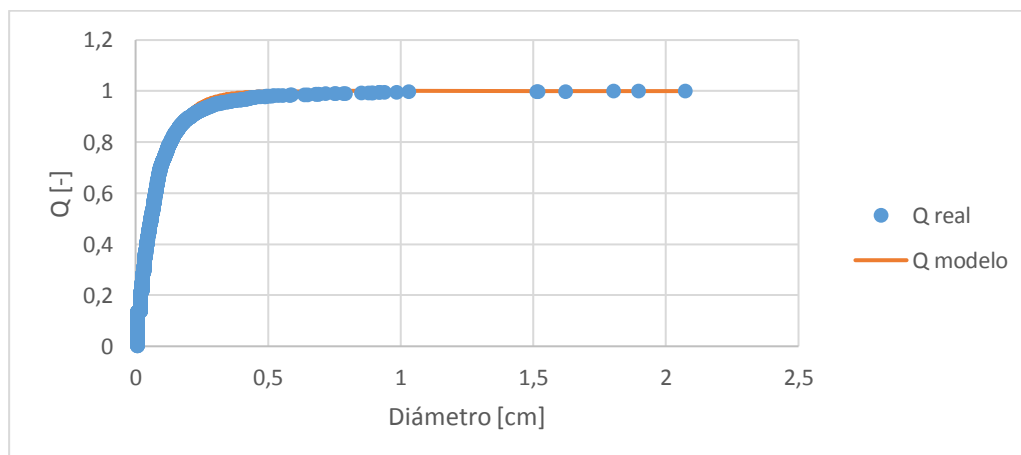


Figura 58. Gráfico resumen distribución de tamaño P1 - 20 ciclos in vitro

Anexo 4. Ajuste al Modelo Rosin-Rammler en Proceso 2

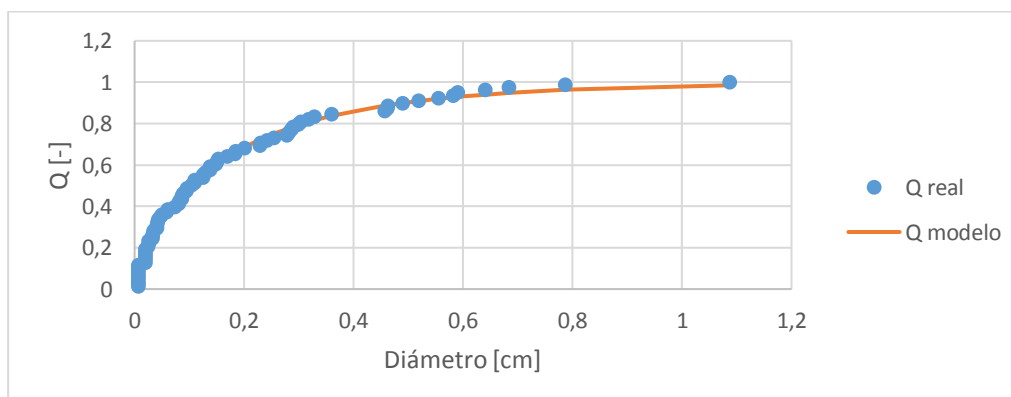


Figura 59. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 5ciclos invivo

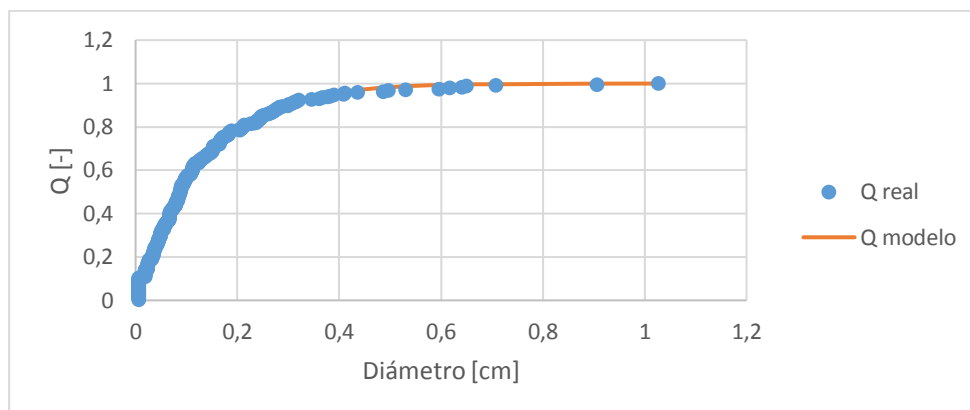


Figura 60. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 10 ciclos invivo

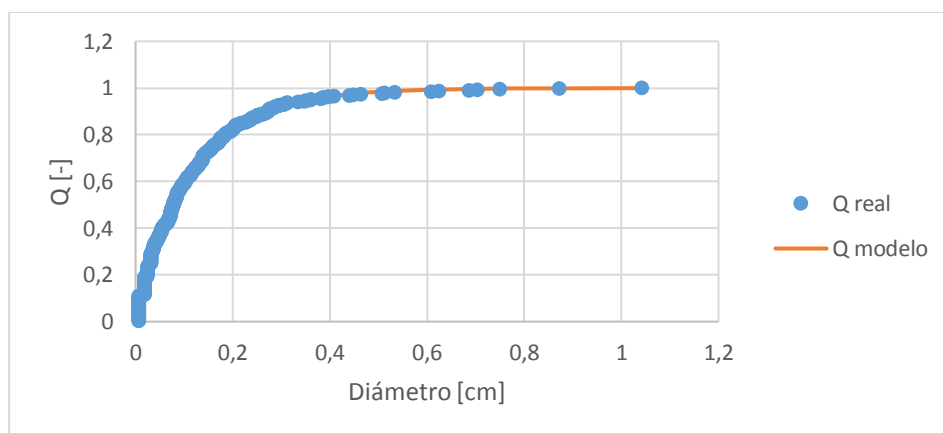


Figura 61. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 15 ciclos invivo

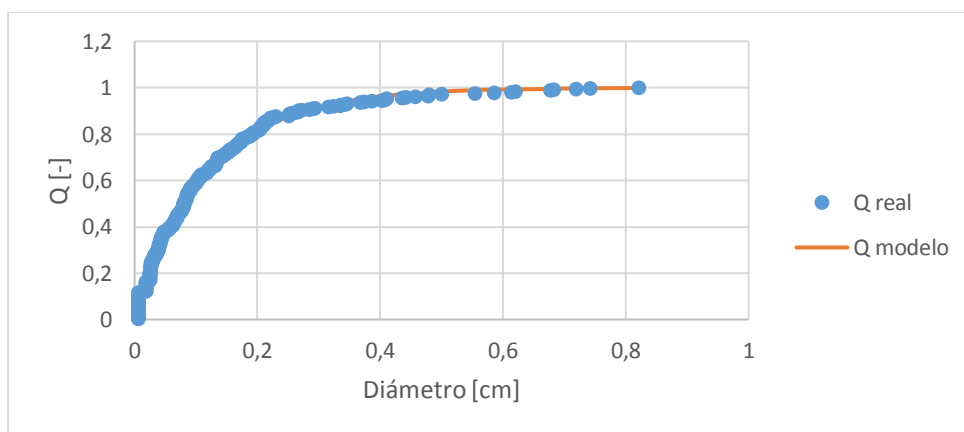


Figura 62. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 20 ciclos invivo

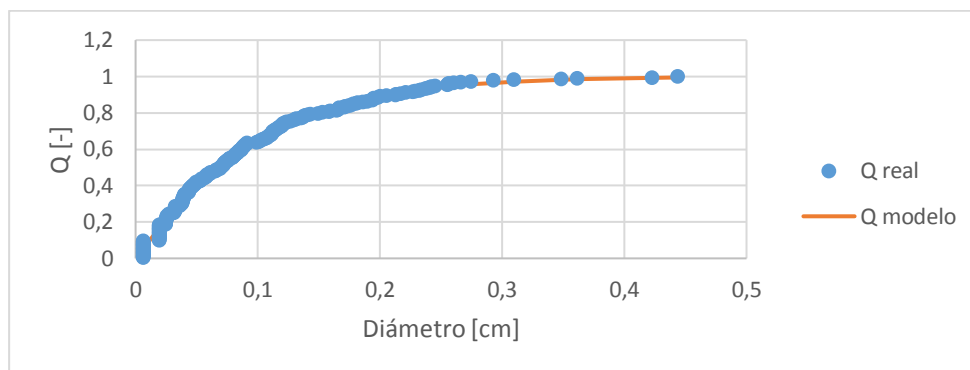


Figura 63. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 25ciclos invivo

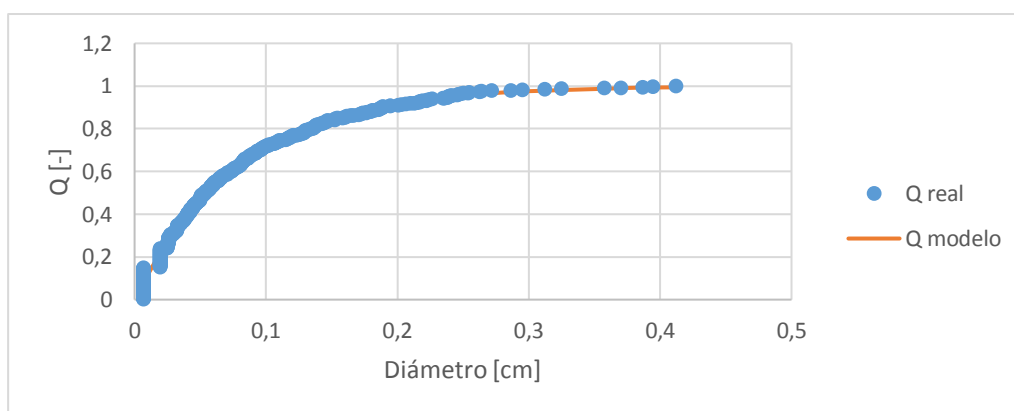


Figura 64. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 30ciclos invivo

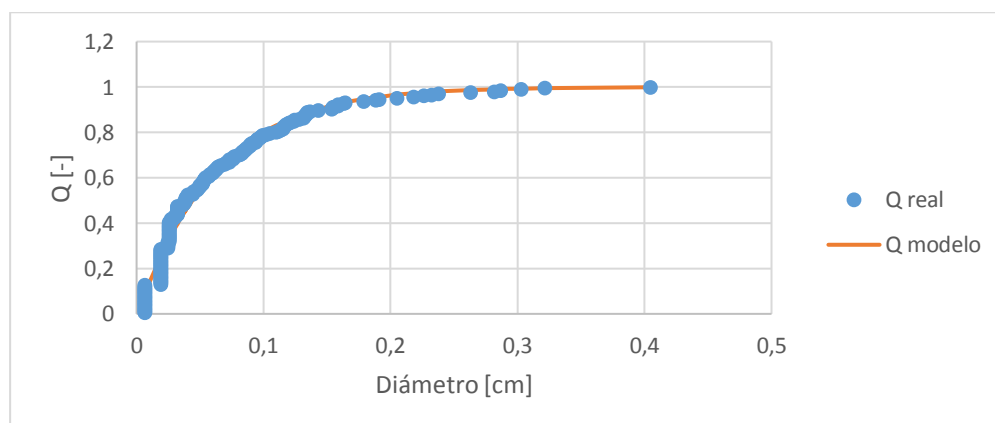


Figura 65. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 35ciclos invivo

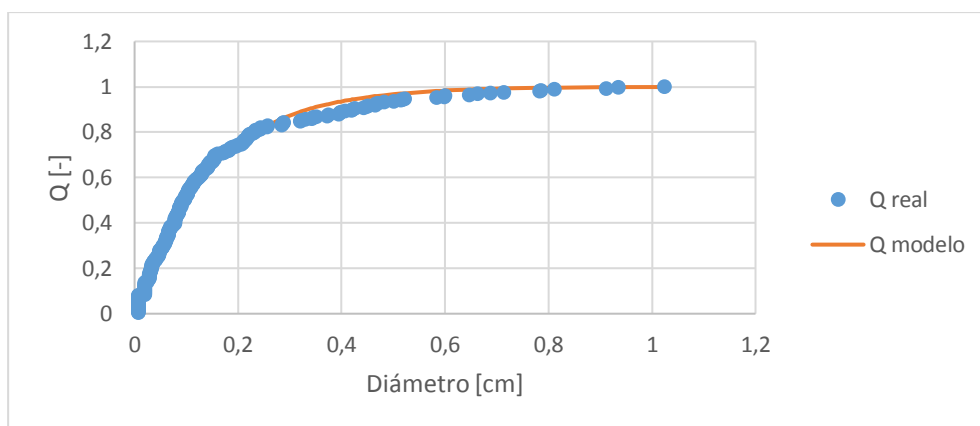


Figura 66. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 5 ciclos in vitro

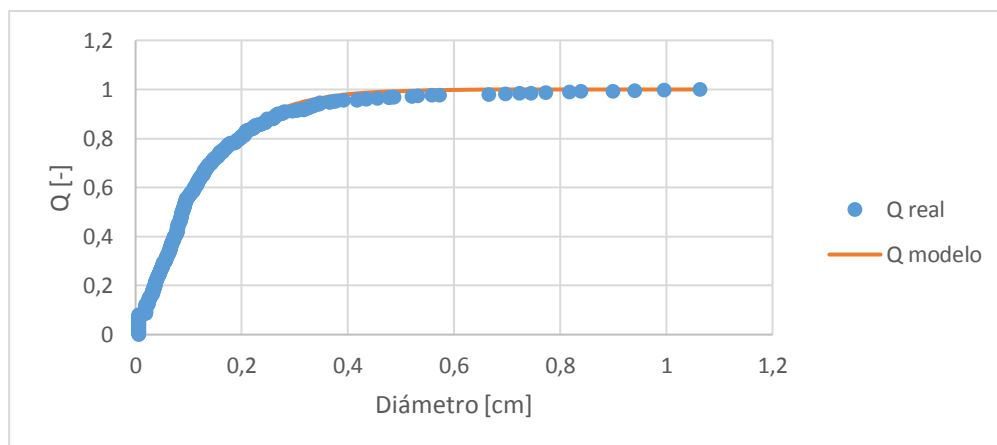


Figura 67. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 10 ciclos in vitro

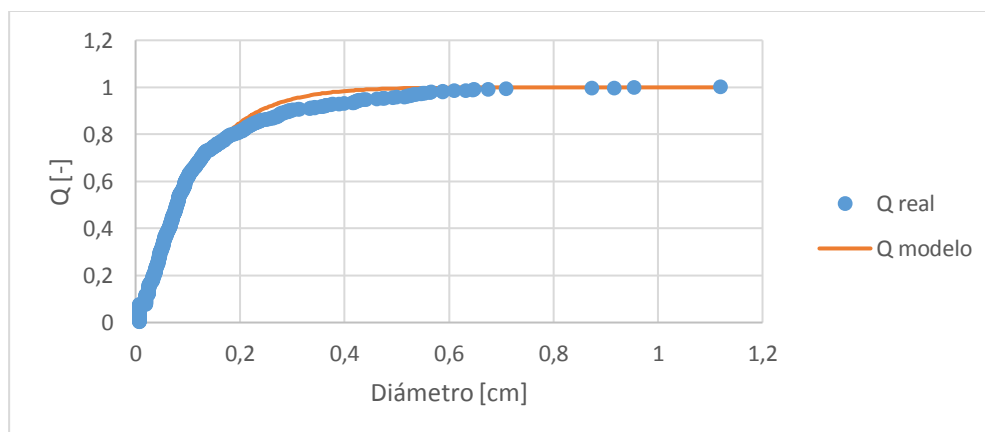


Figura 68. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 15 ciclos in vitro

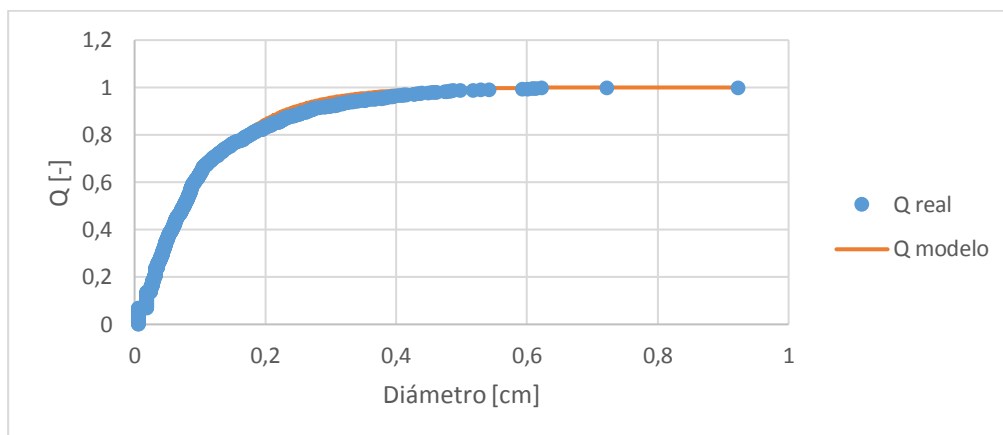


Figura 69. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 20ciclos in vitro

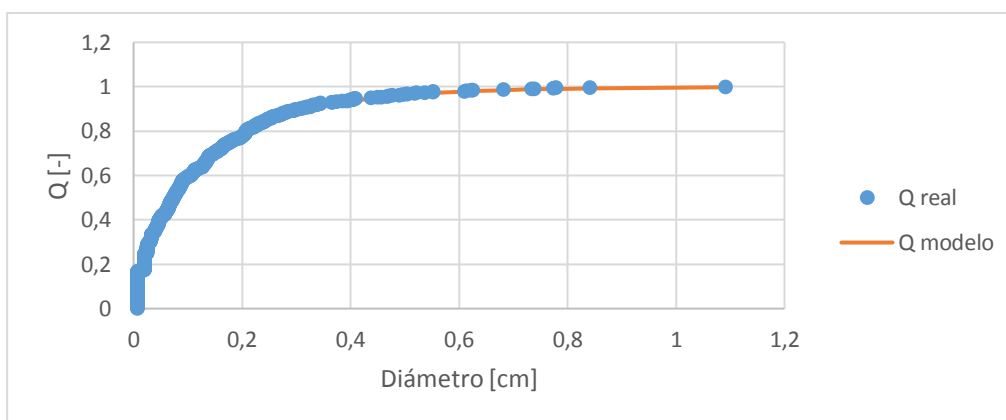


Figura 70. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 25ciclos in vitro

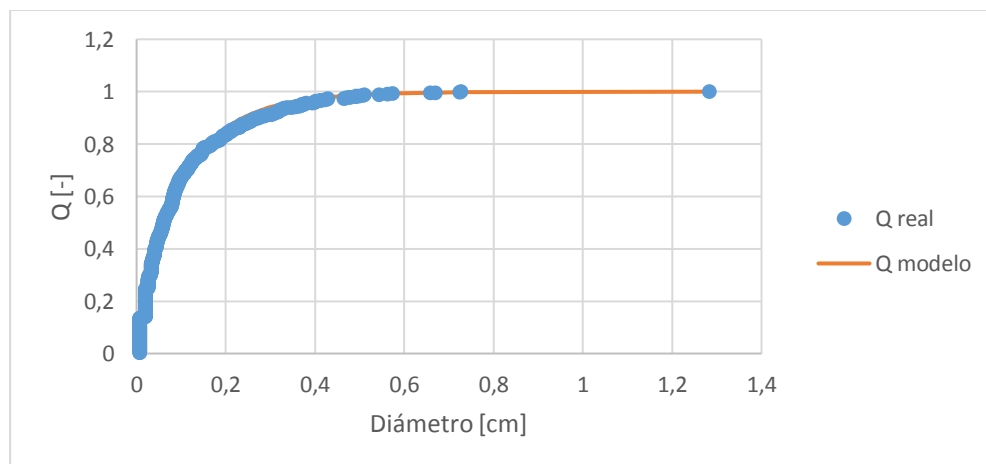


Figura 71. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 30ciclos in vitro

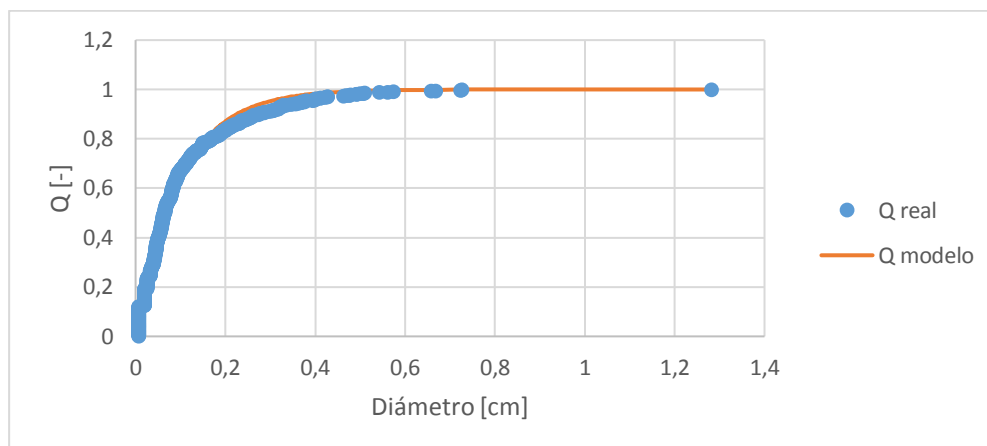


Figura 72. Gráfico resumen distribución de tamaño P2 - 35 ciclos in vitro

Anexo 5. X_{50} debido a ciclos masticación

Tabla 16. Parámetro X_{50} según ciclos de masticación Zanahoria cruda

Control (Zanahoria cruda)	Número de ciclos	Tamaño partículas X_{50} [cm] masticador
	10	0,104
	30	0,082
	50	0,066

Tabla 17. Parámetro X_{50} según ciclos de masticación Proceso 1

Zanahoria Proceso 1 (110 °C y 66min)	Número de ciclos	Tamaño partículas X_{50} [cm] masticador
	-	0,100
	3	0,078
	15	0,066



Tabla 18. Parámetro X_{50} según ciclos de masticación Proceso 2

Zanahoria Proceso 2 (120°C y 9min)	Número de ciclos	Tamaño partículas X_{50} [cm] masticador
	5	0,101
	18	0,080
	30	0,067

Anexo 6. Contenido total de β -caroteno

Tabla 19. Contenido de β -caroteno

Contenido total de β-caroteno en zanahoria cruda [$\mu\text{g/g}$]	
Base húmeda	Base seca
136,56	1196,83
171,15	1499,99
130,84	1146,69
130,18	1140,89

Anexo 7. Humedad

Tabla 20. Datos de humedad

Contenido de humedad de la muestra [%]		
Control	Proceso 1	Proceso 2
88,34	90,93	91,25
87,29	90,63	90,92
90,16	91,47	91,18



Anexo 8. Dureza

Tabla 21. Datos de dureza

Dureza [N] entre procesos		
Control	Proceso 1	Proceso 2
108,41	1,91	3,78
148,37	2,6	2,79
139,16	2,3	3,68
114	2,26	3,29
105,18	2,06	2,3
158,23	2,26	3,82

Anexo 9. Color

Tabla 22. Valores de ΔE

Valor ΔE entre procesos		
Control – Proceso 1	Proceso 1 – Proceso 2	Control – Proceso 2
24,42	4,86	20,23
19,30	3,22	18,75
18,33	3,92	18,81
26,40	6,49	17,96
25,62	5,88	22,59
25,47	5,85	28,13
21,45	6,02	19,10
19,90	6,82	20,62
20,38	6,87	16,87

Anexo 10. Contenido de β -caroteno bioaccesible

Tabla 23. β -caroteno bioaccesible zanahoria cruda

Zanahoria cruda			
Ciclos de masticación	10	30	50
β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	19,90	23,39	26,52
	19,59	22,87	28,32

Tabla 24. β -caroteno bioaccesible Proceso 1

Proceso 1 (110°C y 66m)		
Ciclos de masticación	3	15
β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	31,99	38,01
	27,46	36,92

Tabla 25. β -caroteno bioaccesible Proceso 2

Proceso 2 (120°C y 9m)			
Ciclos de masticación	5	18	30
β -caroteno bioaccesible [$\mu\text{g/g}$]	45,65	73,72	83,52
	48,07	69,01	74,58