

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ESTABILIDAD DE COLORANTES NATURALES PRESENTES EN LOS FRUTOS DE *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Saúco) COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE CONSUMO DE LOS COLORANTES ARTIFICIALES ROJO No.40, ROJO No.3 Y ROJO No.2, EN BEBIDAS EN EL RANGO DE pH: 3, 4 y 5.

WALTER VINICIO FUENTES MIRANDA

Químico

Guatemala, Agosto del 2005

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y ESTABILIDAD DE COLORANTES NATURALES PRESENTES EN LOS FRUTOS DE *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Saúco) COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE CONSUMO DE LOS COLORANTES ARTIFICIALES ROJO No.40, ROJO No.3 Y ROJO No.2, EN BEBIDAS EN EL RANGO DE pH: 3, 4 y 5.

Informe de Tesis

Presentado por

WALTER VINICIO FUENTES MIRANDA

Para optar al título de

Químico

Guatemala, Agosto del 2005

JUNTA DIRECTIVA

M. Sc. Gerardo Leonel Arroyo Catalán	Decano
Licda. Jannette Sandoval Madrid de Cardona	Secretaria
Licda. Gloria Elizabeth Navas Escobedo	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Juan Francisco Carrascoza Mayen	Vocal IV
Br. Susana Elizabeth Aguilar Castro	Vocal V

Al finalizar éste trabajo de tesis, dejo atrás una etapa de mi vida y comienzo a vivir ésta otra que no sé a dónde me llevará. Hoy me voy, y empiezo a extrañar mi vida de estudiante, pero anhelo con grandes ilusiones la de profesional.

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Antes que todo doy infinitas gracias a Jehová Dios y Jesucristo por permitirme ser, por haberme dado fuerzas y el valor para culminar estos estudios.

*Ha sido el omnipotente,
Quien ha permitido que la sabiduría
Dirija y guíe mis pasos.
Ha sido el todopoderoso,
Quien ha iluminado mi sendero
Cuando más oscuro ha estado,
Ha sido el creador de todas las cosas,
El que me ha dado fortaleza para continuar
Cuando apunto de caer he estado;
Por ello, con toda la humildad
Que de mi corazón puede emanar,
Dedico mi trabajo a Jehová Dios.*

A los autores de mi vida, mis padres: Daniel Fuentes Godínez y Arminda Elia Miranda de Fuentes.

Mi madre, simplemente por ser todo lo que representa: amor, fuerza, fé y porque siempre estuvo presente y guió mis pasos en la mejores horas de mi niñez.

Lo más dulce y tierno que he tenido.

A mis hermanos Estuardo, Armando, Ronald y Danely el saber que puedo contar con ustedes sigue siendo uno de mis más sólidos soportes.

A mis amigos y compañeros, tanto de estudios como de trabajo: Robin, Luis (Escobar, Aguilar y Reyes), Walter Bran, Mirza, Mario Manuel, Patricia Navas, Abraham, Sofía, Edgar (Gómez y Pérez), Gabriela, Bagda, Claudia (Arriaga y De León), Cariño, Maribel, Francisco Barrios, Yoly Bernard, Miriam Martínez, María del Carmen Castillo, Daniel, Olguita, José Hugo, Johanna y Lorena.

A mis catedráticos: Lic. Igor Slowing, Licda. Diana Pinagel, Licda. Noemí Orozco, Licda. Flor de María Lara, Licda. Nora Guzmán, Ph. D. Alfredo Gálvez, M. Se. Adolfo León Gross, Lic. Carlos Kleé y M. Se. Luis Hugo Santa Cruz, por su paciencia, labor y porque sembraron la semilla y fertilizaron mi inquietud de conocer.

A mi asesor de tesis Ph. D. Oscar Manuel Cobar Pinto, por sus valiosas aportaciones.

A mi revisora de tesis M. A. Idolly Carranza Forkel, quien acertadamente supervisó y dio forma a mi trabajo de tesis con sus oportunas correcciones.

A la Licda. Julieta Ortiz por brindarme el interesante tema de tesis.

Al "Laboratorio de Investigación de Productos Naturales", especialmente a la Licda. Sulli Cruz y al Lic. Armando Cáceres, por el apoyo en la realización del presente trabajo.

A las personas en quienes descubrí a un ser humano integral, noble, paciente y a quienes por la calidad de su trabajo, mentalidad intelectual, la riqueza que como ser humano encierran y quienes me enseñaron que sobresalir significa ir más allá de lo que avanzan los demás, es trabajar mientras los otros descansan, gracias por su confianza y motivación: Lic. Igor Slowing, M.A. Idolly Carranza Forkel, Lic. Jorge García González, Licda. Diana Pinagel y Lic. Walter de La Roca.

A las instituciones: Laboratorio Nacional de Salud (LNS), APAESA, RGH y WESTRADE GUATEMALA, S.A. por brindarme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A la Licda. Edina Recinos, Osma Godínez y Elizabeth Donis, por brindarme más que su amistad, cariño y apoyo en los momentos difíciles.

Al Departamento de Química Orgánica de la Facultad De Ciencias Químicas y Farmacia de La Universidad de San Carlos de Guatemala.

A mi patria infinitas gracias, de un hijo que te lleva por siempre en el corazón.

Y por último, gracias a todos aquellos que han influenciado para que ésta meta sea una realidad y que por desgracia, no están de forma constante en mi memoria.

INDICE

1. RESUMEN	01
2. INTRODUCCION.....	02
3. ANTECEDENTES.....	04
3.1 COLORANTES.....	04
3.1.1 DEFINICIÓN.....	04
3.1.2 CLASIFICACIÓN	04
3.1.3 COLORANTESANTOCIANICOS(ANTOCIANINAS).....	05
3.1.3.1 ESTRUCTURA.....	06
3.1.3.2 METODOS DE EXTRACCION, SEPARADORES, IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION.....	09
3.1.3.2.1 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN.....	09
3.1.3.2.2 IDENTIFICACION.....	12
3.1.3.2.3 CUANTIFICACIÓN.....	13
3.1.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL COLOR Y LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS.....	14
3.1.5 DESCRIPCION BOTANICADE LAS PLANTAS A TRABAJAR.....	16
3.1.5.1 <i>Prunus capuli</i> Cav.(Cereza)	16
3.1.5.2 <i>Rubus Urticaefolius</i> Poir (Mora)	18
3.1.5.3 <i>Sambucus canadensis</i> L. (Saúco).....	18
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. OBJETIVOS	21
6. HIPÓTESIS	22
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
8. RESULTADOS	33
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	43
10. CONCLUSIONES.....	55
11. RECOMENDACIONES	56
12. REFERENCIAS	57
13. ANEXOS	60

1. RESUMEN

En la presente investigación se realizó la extracción de los pigmentos antociánicos que se encuentran en los frutos de *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Saúco) utilizando la técnica de maceración en frío (extracción sólido-líquido), se cuantificaron dichos pigmentos y se evaluó la estabilidad a diferentes valores de temperatura (30°C y 50T) y pH (4 y 5) utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible. Esto se realizó para determinar si poseían las características para ser utilizados como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales Rojo No.40, Rojo No.3 y Rojo No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 3, 4 y 5.

Se determinó que únicamente los pigmentos presentes en los frutos de Cereza pH 4 y 5, Mora pH 5 y Saúco pH 5, presentan las características para ser utilizados como alternativas naturales del colorante artificial Rojo No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 4 y 5.

Se recomienda realizar otros estudios para determinar si los citados colorantes naturales satisfacen todas las exigencias que se demandan para hacer dicha sustitución.

2. INTRODUCCIÓN

La proporción de pigmentos naturales usados en la industria de alimentos, medicamentos y cosméticos es creciente, debido principalmente a la toxicidad de algunos colorantes sintéticos. Por ejemplo el Rojo No.40 está permitido en Canadá pero no en el Reino Unido y otros países de la Comunidad Europea, el Rojo No.3 ha demostrado en estudios completados en la década de 1980 que dosis altas del colorante causan tumores en la tiroides de ciertos animales experimentales, estudios sobre el Rojo No.2 indican que es carcinogénico y embriotóxico, aunque no se han confirmado dichos resultados (1:486).

Los colorantes artificiales han perdido popularidad en la industria de alimentos porque se requiere de productos de mayor calidad nutricional, ya que la mayor parte de los consumidores buscan bebidas saludables, por ejemplo enriquecidas con vitaminas, no obstante muchos colorantes artificiales tienen problemas técnicos citando se tratan de mezclar con estas sustancias, por ejemplo solubilidad. Actualmente hay un considerable interés mundial en el desarrollo de colorantes naturales, esto se debe, por un lado, a la necesidad de expansión de la variedad de colorantes y por otros a la implicación de que son naturales y por consiguiente seguros (1:491).

El mercado global de colorantes sintéticos asciende a \$400 millones anuales, cifra menor comparada con los \$939 millones que reportan los colorantes naturales. A pesar de las limitaciones de procesamiento y altos costos, el mercado de colorantes naturales está creciendo (4% anual) (2:72,76).

Las antocianinas son colorantes naturales permitidos por la Comunidad Económica Europea y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos (FDA). Estos **compuestos proporcionan un** amplio espectro de beneficios a la salud, debido a su capacidad antioxidante, presentan la propiedad de prevenir y combatir enfermedades de] corazón y varias formas de cáncer, por ser colorantes naturales no requieren certificación. En la presente investigación se realizó la extracción de los pigmentos antociánicos que se encuentran en los frutos de: *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Saúco) utilizando la técnica de maceración en frío (extracción sólido-líquido), se cuantificaron dichos pigmentos y se evaluó la estabilidad a diferentes valores de temperatura (30°C y 50T) y pH (4 y 5) utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible.

Los anteriores frutos fueron seleccionados debido a su importancia económica, se cultivan ampliamente en el país (en al menos siete departamentos), se utilizan abundantemente como alimento de consumo humano, y al color rojo intenso que presentan. En el caso de la Cereza, la corteza y hojas se usan como medicina casera teniendo propiedades tónicas, calman la irritación, disminuyen la alteración nerviosa y provee madera de buena calidad para el uso en carpintería. Según datos del año 2,004 Guatemala exporta 1,577 toneladas de mora anualmente.

3. ANTECEDENTES

3.1 COLORANTES

3. 1.1 DEFINICIÓN

De acuerdo con la FDA, colorante es cualquier pigmento o cualquier otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraída, aislada y derivada, con o sin intermediarios de] cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos, cosméticos, al cuerpo humano o a cualquier otra parte, por sí misma es capaz de impartir color (1:480).

3.1.2 CLASIFICACION

Existen varios criterios de clasificación los colorantes, estos se basan en su procedencia o fuente de origen, en su certificación, o por su grupo cromóforo.

De acuerdo con su procedencia, los colorantes son obtenidos de fuentes naturales (microorganismos, vegetales y/o animales) ó producidos por síntesis química (sintéticos). En el anexo No. 1 se presenta la clasificación de los colorantes según su procedencia.

En el anexo No.2 se presentan algunos colorantes certificados para alimentos, su clasificación y aplicaciones o usos (1:482).

3.1.3 COLMANTES ANTOCIÁNICOS (ANTOCIANINAS)

Las antocianinas son un grupo de pigmentos rojizos, solubles en agua, ampliamente difundidos en el reino vegetal. Numerosas frutas, vegetales, flores y raíces deben sus atractivos colores a este tipo de compuestos, presentes en la savia de las células. Su acusado color rojo hizo surgir interés por su estructura química. Actualmente se conocen bastante bien las estructuras del grupo de las antocianinas, pero no tanto la fisicoquímica de los pigmentos complejos y de sus reacciones de degradación (3:468).

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria pero, a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en la pérdida del color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Por tal motivo su uso se prefiere a pH ácido como en una gran cantidad de las bebidas comerciales.

Son también sensibles a las variaciones de pH. A pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul. Estudios recientes reportan que el color de las antocianinas se hace resistente a las variaciones de pH cuando se encuentran como productos de condensación con catequinas en presencia de aldehídos, siendo estos últimos casos de mayor valor como agentes de coloración de alimentos.

Las antocianinas juegan un rol importante en la producción de vinos, siendo la fuente comercial más antigua de antocianina la "enocianina", extracto coloreado frecuentemente extraído de las uvas, originalmente fue utilizada para intensificar el color de los vinos, pero en los últimos años ha encontrado aplicaciones como colorante de alimentos. Asimismo se está haciendo importante la extracción de antocianinas de otras fuentes naturales como el maíz morado, la col, el camote morado y los rábanos.

El contenido total de antocianinas en las plantas varía dependiendo de factores como: especie, variedad, estado fisiológico de la planta, posición del fruto en la planta y aplicación de productos químicos, por mencionar algunos (4:72).

Se consideran que tienen como función en la planta el ser atractores de insectos para los procesos de polinización y disseminación de las semillas.

Aunque la literatura reporta más de 250 antocianinas, se hace necesaria una mayor investigación para darles un mejor uso y sean más competitivas como alternativas viables a los colorantes sintéticos hoy en uso (5:95-97).

3.1.3.1 ESTRUCTURA

El término antocianina se aplica para el glicósido y el de antocianidina para la aglicona. Las antocianinas están basadas químicamente en una única estructura aromática, aquella de la cianidina, y todas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por metilación o por glicosidación. Las antocianinas son derivados del catión flavilio básico. Un pigmento antociánico generalmente compuesto por un aglicón (una antocianidina) esterificado por uno o más azucres, rara vez se encuentran aglicones libres en los alimentos, excepto como componentes en trazas, de las reacciones de degradación (3:468-469).

Tabla 3.1

**SUSTITUCIÓN EN LA ESTRUCTURA DEL CATION FLAVILIO PARA
ORIGINAR LOS PRINCIPALES ANTOCIANOS**

	Sustituyentes en el carbono número ^a		
	3'	4'	5'
Pelargonidina (2).	-H	-OH	-H
Cianidina (3).	-OH	-OH	-H
Delfinidina (4).	-OH	-OH	-OH
Peonidina (5).	-OCH ₃	-OH	-H
Petunidina (6).	-OCH ₃	-OH	-OH
Malvidina (7)	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃

^aLos compuestos (2)-(7) tienen grupos -OH en los carbonos 3, 5 y 7 e hidrógenos en todos los otros átomos de carbono.

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C6-C3-C6 y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro por su alto grado de conjugación.

Hay seis antocianidinas (agliconas de antocianinas) comunes, siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo-naranja se deben a la pelargonidina (con un grupo hidroxilo menos que la cianidina), mientras que los colores violeta y azul a la delfinidina (con un grupo hidroxilo más). También son comunes tres metil-ésteres: peonidina, derivada de la cianidina, petunidina y malvidina, basada en la delfinidina. Cada una de las seis antocianidinas ocurre con unidades de azúcar, la variación está en el tipo de azúcar, del número y de la posición en los que están unidos. Entre los monosacáridos comunes podemos mencionar a la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, y como disacáridos a la rutinosa, sambubiosa, soforosa, gentibiosa y la tirosa

Basadas en su glicosidación, pueden clasificarse como 3-monoglicósidos, 3-biósidios, 3,5-diglicósidos y 3,7-diglicósidos, siendo estos últimos menos comunes. Si hubiera tres unidades de azúcar, las tres pueden estar en posición 3, o dos en posición 3 y una en 5. Únicamente un pigmento ha sido reportado con más de tres unidades de azúcar.

Las antocianinas aciladas están siendo descritas con mayor frecuencia en los últimos años, con sustituyentes alifáticos, aromáticos y azúcares: siendo los principales grupos acilantes los ácidos fenólicos como p-cournarico, caféico, ferúlico o sinápico y algunas veces los ácidos acéticos, malónico y p-hidroxibenzoico; entre ellos se encuentran preferentemente en el azúcar del C-3 (5:97).

3.1.3.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

3.1.3.2.1 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN

El método usual de extracción para el uso en alimentos, es por maceración de la muestra con una solución de ácido clorhídrico al 1% o 0.1 N en etanol (extracción sólido-líquido), debido a la naturaleza oxonio de estos compuestos se utiliza un medio ácido para su extracción, venciendo así las dificultades de su extracción en solventes neutros, dejando el recipiente cubierto toda la noche en la refrigeradora. La solución de antocianinas así obtenida se concentra al vacío a una temperatura menor de 30°C y luego se cromatografía sobre papel Whatman No.3. Puede utilizarse una serie de sistemas como fase móvil: BAW (n-butanol, ácido acético glacial, agua, 4:1:5); Bu:HCl (n-butanol, ácido clorhídrico 2 N, H); Fórmica (ácido fórmico, ácido clorhídrico concentrado, agua, 5:5:3), Forestal (ácido acético glacial, ácido clorhídrico concentrado, agua, 303:10), entre otros. Si la muestra contiene apreciable cantidad de azúcares puede emplearse ácido clorhídrico al 1% en agua, lo que produce mejores resultados con BAW.

En general, los sistemas de disolventes, pueden clasificarse en dos grupos principales, los acuosos y los oleosos, requiriendo menor tiempo de desarrollo los primeros. Es conveniente alternar ambos sistemas, acuosos y oleosos, para lograr una mejor separación; se puede aplicar cualquiera de las siguientes secuencias:

- a) 13AW ---- ácido clorhídrico al 1 % en agua ---- BAW.
- b) ácido clorhídrico al 1 % en agua --BAW --- ácido clorhídrico al 1 % en agua.

Las bandas de antocianinas luego de secarlas se excluyen del papel con (MAW): (metano, ácido acético, agua). Generalmente son suficientes tres separaciones cromatográficas para obtener una antocianina lo suficientemente pura para el análisis de la aglicona y del azúcar.

También son útiles las separaciones por cromatografía en columna utilizando resinas de intercambio catiónico, como Amberlita CG-50, así como Poliamida o polivinilpirrolidona (PVP).

Muy buenos resultados ha dado la separación utilizando HPLC en fase reversa, utilizando columnas de μ -Bondapak (C18), y disolventes como ácido fosfórico al 0.1% en ácido acético, agua (10:90) y (agua, ácido acético, metanol, 65:15:20 ó 71:10:19).

Además de la metodología usual de extracción, es conveniente considerar lo siguiente:

La extracción puede realizarse también en frío con disolventes no acidificados, como metanol al 60%, n-butanol, etilenglicol, propilenglicol, acetona, mezcla de acetona-metanol-agua, o simplemente con agua a ebullición; en todos los casos se espera que las antocianinas sea extraídas en el estado más natural posible, ya que un medio ácido, como en ácido clorhídrico, podría alterar su estado original, además que puede producirse pérdida de grupos ácidos lábiles y de azúcares.

Como medio ácido puede utilizarse además de ácido clorhídrico, ácidos orgánicos débiles como el ácido fórmico y ácido tartárico.

El uso de etanol conteniendo de 200 a 2000 ppm. de dióxido de azufre incrementa el rendimiento de extracción, resultando un extracto que posee hasta dos veces el poder tintóreo en comparación al uso del etanol solamente.

En los últimos años la extracción de las antocianinas aciladas se ha realizado con ácido clorhídrico al 1%, metanol, o MAW a temperatura ambiente, por 5 horas. El extracto se concentra y el concentrado se purifica por cromatografía de columna de permeación en gel Diaión, HP-20, y del gel Sephadex LH-20 y posteriormente por cromatografía en papel, capa delgada y FIPLC (5: 103-105).

A nivel comercial las antocianinas se obtienen mediante el proceso de los desechos industriales de la uva (lo que abarata los costos de la producción del producto) en el anexo No.4 se muestra el proceso de extracción, en la actualidad se presenta la tendencia de utilizar los extractos antociánicos crudos sin necesidad de realizar la separación, debido las propiedades antioxidantes que presentan los demás componentes que acompañan a los colorantes (3:493,494).

El disolvente extractor a utilizar en la presente investigación será etanol ya que este presenta varias ventajas al ser utilizado como disolvente de extracción, por ejemplo: no es tóxico, es económico y su capacidad de extracción es tan buena como la del solvente generalmente utilizado (metanol), la inclusión de agua ayuda a la extracción de más antocianinas hidrofílicas y el ácido clorhídrico estabiliza el pigmento y baja el pH a un nivel donde la absorbancia de las antocianinas es máxima.

El método de extracción debe ser en el que se recupere la mayor cantidad de antocianinas y de menor pérdidas de éstas debido a cambios enzimáticos y no enzimáticos. El procedimiento de extracción aquí citado no intenta extraer completamente el total de antocianinas únicamente alcanzar un equilibrio en la concentración del pigmento a lo largo del sobrenadante y el disolvente extractor. La mezcla: etanol-ácido clorhídrico-agua como disolvente extractor se deja en contacto con las frutas durante la primera fase del proceso con el propósito de obtener una alta concentración de antocianinas en la primera corrida. Los frutos macerados se sumergen por toda la noche en el disolvente extractor para permitir la difusión de las antocianinas a través de las membranas celulares, el disolvente extractor adicional se requiere para lavar el residuo de antocianinas (4:73).

3.1.3.2.2 IDENTIFICACIÓN

Están bien definidos los métodos utilizados para identificar cada antocianina. A grandes rasgos, el criterio seguido para demostrar su identidad es el siguiente: primero, valores de Rf en cuatro o más sistemas de disolventes, segundo, picos de absorción en la zona ultravioleta y visible del espectro electromagnético, tercero, identificación cromatografía de los azúcares tras oxidación peroxídica y por último identificación de los pigmentos intermedios en hidrólisis controlada. Con estos datos es posible determinar estructuras de cualquier antocianina conocida. Si no se dispone de antocianinas auténticas o sí se desea aislarla de fuentes conocidas, es mucho más sencillo el procedimiento de identificación, se acepta, como prueba de que un pigmento desconocido, y una antocianina conocida son idénticos, cuando coinciden los valores de Rf en cinco disolventes distintos (3:470).

Las antocianinas simples en solución ácida (ácido clorhídrico al 0.1% en metanol), tienen dos máximos de absorción principales, uno en la región visible entre 465 y 550 nm, y otro más pequeño en el UV alrededor de 275 nm. Es también útil determinar la relación de absorbancia $440 = a$ a la absorción al (entre 500-540 nm), ésta es usualmente alrededor de 24 para derivados de cianidina sustituida en posición 3 y de 13 si está en posición 5; para la delfidina, las relaciones correspondientes son de 18 y 11.

Las antocianinas aciladas exhiben una absorción débil adicional entre 310 y 335 nm, rango en el que puede determinarse el tipo de acilación aromática involucrada.

La adición de solución alcohólica al 5% de tricloruro de aluminio produce un desplazamiento batocrómico del máximo en el visible de 15 a 35 nm cuando hay presencia de grupos o-dihidroxilo libre.

La glucosidación de la antocianidina en la posición C-3 generalmente resulta en un desplazamiento batocrómico del λ_{\max} , mientras que la sustitución en C-5 produce un hombro en la curva de absorción a 440 nm.

Para determinar la antocianidina y el azúcar de una antocianina es necesario hidrolizarla; se corre una cromatografía en papel Whatman No.1, comparando con estándares de agliconas de referencia: pelargonidina, cianidina, peonidina, malvidina, petunidina y delphinidina y usando sistemas de desarrollo como Fórmica (ácido fórmico, ácido clorhídrico concentrado, agua, 5:5:3) y Forestal (ácido acético glacial, ácido clorhídrico con concentrado, agua, **30:110**). La solución acuosa remanente contiene los azúcares. A la solución de azúcar seca, se le agrega agua para disolver nuevamente el azúcar y se cromatografía en papel Wathman No.1 utilizando patrones de glucosa, galactosa, arabinosa, xilosa y ramnosa en n-butanol: benceno: piridina: agua 5:1:3:3 y fenol. El revelador puede hacerse con flalato ácido de anilina, después de esprayar se debe secar y calentar a 105°C por 2-3 minutos: Los azúcares muestran manchas rojizas o marrones bajo la luz visible o ultravioleta, usualmente se debe ver de 1 a 3 azúcares en relación de 1, 1: 1, 1:2 ó 1: 1: 1.

La utilización de las técnicas IR y RMN no es muy usual, salvo la necesidad de determinar nuevas estructuras: como es el caso de las antocianinas aciladas recientemente reportadas. Debemos mencionar que con los modernos métodos de análisis como por ejemplo FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy), puede determinarse el número, identidad, y punto de unión de los grupos acilo, conservando prácticamente la molécula intacta (5:105,106).

3.1.3.2.3 CUANTIFICACIÓN

Se han descrito numerosos métodos para la determinación de antocianinas cuantitativamente en los alimentos, el análisis total de antocianinas en el producto fresco es relativamente sencillo. Sólo requiere la maceración de la muestra en metanol o etanol ácido, una alícuota de la solución y la absorción máxima en la región visible del espectro electromagnético. La concentración del pigmento se determina a partir de los valores de E (Coeficiente de extinción) reportados como se puede ver en el anexo No.5

El total de antocianinas puede determinarse en extractos crudos que contienen compuestos fenólicos, esto se logra midiendo la absorbancia a una longitud de onda. Esto es posible porque las antocianinas tienen un máximo de absorción en la región de 510-550 nm y el grupo de compuestos con máximos de absorción más cercano a este rango son los flavonoides con máximos de absorción en la región de 350-380 nm (4:72).

La cuantificación también se puede realizar por comparación del valor de absorbancia del extracto acuoso del fruto, con soluciones de concentración conocida de un colorante artificial, el resultado se reporta como miligramos de colorante artificial equivalente a un gramo de fruto, para este efecto se pueden utilizar como referencia los colorantes artificiales: Rojo No.40, Rojo No.3 o Rojo No.2 por mencionar algunos.

3.1.4 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL COLOR Y LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

Como se ha mencionado, las antocianinas sufren de una "estabilidad inherente", por lo que debe tenerse muchas precauciones durante su manipulación o su procesamiento. Un conocimiento de los factores involucrados en su "estabilidad" así como de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y purificación de las antocianinas y su uso como colorantes de alimentos. Los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas son pH, temperatura, disolvente, presencia de oxígeno, así como la interacción con otros componentes en los alimentos como ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y co-pigmentos.

La literatura nos indica que: (5: 99, 102, 103)

- Las antocianidinas son menos estables que las antocianinas, y menos solubles en agua, por lo que se asume que la glicosidación confiere estabilidad y solubilidad al pigmento.
- A mayor grado de hidroxilación, decrece generalmente la estabilidad de la antocianina, mientras que un incremento en el grado de metoxilación o del grado de glicosidación tiene el efecto opuesto, por ejemplo, los diglicósidos son más estables que los monoglicósidos a la decoloración durante el almacenamiento, al tratamiento al calor y la exposición a la luz.
- La naturaleza del azúcar influye en la estabilidad, por ejemplo, la antocianina conteniendo galactosa es más estable que aquella con arabinosa.
- La presencia de por lo menos dos grupos acilo estabiliza a la antocianina probablemente por la presencia de sistema aromático en el grupo acilo, encontrándose que hay diferencia también por el tipo de grupo presente, siendo más estable si la acilación es con ácido caféico que con ácido p-cournárico.
- Las antocianinas son inestables en presencia de oxígeno, son termolábiles y los cambios en el pH provocan su transformación estructural. En presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina-3glicosidadas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para las antocianidinas-3,5diglicosidadas lo es a pH 4.0 - 5.0. A un pH entre 2 y 4 la principal vía de degradación es la hidrólisis de la molécula de azúcar.
- Las antocianinas son generalmente inestables cuando se exponen a la luz ultravioleta o a la luz visible, siendo algunas más afectadas que otras, por ejemplo, las antocianinas que tienen el grupo hidroxilo en C-5 sustituido son más susceptibles a la descomposición que aquellas no sustituidas en esa posición.
- La presencia de ácido ascórbico produce decoloración de la antocianina, probablemente por la indirecta oxidación por el peróxido de hidrógeno que se forma durante la oxidación aeróbica del ácido ascórbico.

- Las concentraciones altas de azúcar (mayor al 20%) o de jarabe para preservar frutas, tiende a ejercer un efecto protector sobre la antocianina.
- La co-pigmentación intermolecular de las antocianinas, esto es, la formación de complejos con proteínas, taninos, y otros flavonoides como quercítina y rutina, aumentan la estabilidad y el color de las antocianinas.
- Las enzimas que tienen carácter de beta-glucosidasa hidrolizan el enlace glucosídico en el C-3, produciendo el correspondiente aglicón el cual es incoloro.
- La presencia de iones monovalentes como el sodio y el potasio ó bien divalentes como el calcio y el magnesio, hacen que las antocianinas cambien de color.

3.1.5 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS PLANTAS A TRABAJAR

2.1.5.1 *Prunus capuli* Cav. (6:462-469)

Conocido como: El Cerezo (Quetzaltenango), Los Cerezos (San Marcos), Capulín, Tup (Quiché). A menudo es plantado en fincas, común en lugares montañosos o en bosques mixtos, se encuentra en muchos lugares con la apariencia de un árbol nativo, principalmente entre 1,500-3,000 metros sobre el nivel del mar, raramente a menores elevaciones. Se puede encontrar en: Alta Verapaz (Plantado cerca de Cobán), Guatemala, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Quiché, Totonicapán, Quetzaltenango y San Marcos.

Árbol pequeño o mediano, raramente mayor de 15 metros de alto con un tronco generalmente de 1 metro de diámetro; la corteza presenta coloración café-rojiza o grisácea, casi plana, la corona normalmente es ancha; las hojas son bastante delgadas de coloración verde, pecíolos delgados, 2 glándulas reproductivas normalmente cerca del ápice, hojas lanceoladas a ovaladas de 6-18 cm. de largo; los racimos normalmente se alargan, llevando una o más hojas cerca de la base, presenta flores delgadas con pétalos blancos, la fruta presenta una coloración que va de rojo a casi negro de 1 cm. de diámetro o más, sabor dulce.

El árbol es de importancia económica considerable en Guatemala debido a su fruta, grandes cantidades se venden en los mercados durante su limitada estación, empezando a finales de abril. En general la fruta tiene la apariencia de la cereza agria común de los Estados Unidos, aunque presenta una coloración más oscura. Las frutas son tan grandes como las variedades más pobres de cerezas comunes de Estados Unidos, pero su sabor es diferente. Los frutos son dulces y agradables. Esta especie ha desconcertado a algunos botánicos de escritorio con poco conocimiento del árbol guatemalteco. Los frutos son muy apreciados en cualquier lugar donde crece el árbol, y se consumen grandes cantidades de ellos en Guatemala.

Se desconoce si el árbol es nativo de Guatemala, pero es probable que sea nativo del occidente. Las semillas, son esparcidas por pájaros. Los árboles son más abundantes en Quetzaltenango que en cualquier otra parte de Guatemala, botan la mayoría de sus hojas en la estación seca tardía, el follaje se pone rojo o amarillo antes de que se caiga. Las nuevas hojas aparecen a finales de febrero, cuando su color verde fresco las hace eminentes. El follaje joven se tiñe a menudo rosa o rojo.

La madera es de buena calidad, y se usa en carpintería general. La corteza y las hojas, se usan como medicina casera. La corteza esta cercanamente relacionada con *P. serótina* de los Estados Unidos, registrada en la Farmacopea oficial Americana, teniendo propiedades tónicas, el poder de calmar la irritación y disminuir la alteración nerviosa.

3.1.5.2 **Rubus urticaefolius Poir.** (6:472-473).

Conocido como: Mora, Tocán, Cakitocán (Cobán). Se encuentra regularmente en bosques húmedos, a veces en los campos principalmente entre 600-1,500 metros sobre el nivel de mar, se puede encontrar en: Alta Verapaz, Chiquimula, Santa Rosa, Guatemala, Suchitepéquez, Quetzaltenango y San Marcos.

Arbusto de aproximadamente 13-2.5 metros de altura, con tallos arqueados, pecíolos densamente pubescentes, hojas en forma de lanza-oblonga, principalmente de 7-15 cm. de largo, presentan coloración verde oscuras, densamente pubescentes en la parte superior, y grisáceo o blanquecino en la parte inferior de la hoja; florece mucho, las ramas son densamente rojizas, extendiéndose conforme crecen; las flores presentan pétalos principalmente blancos, escasamente más largos que los sépalos; los frutos son bastante pequeños, negros u oscuros cuando maduran.

Ésta es una de las más comunes zarzas guatemaltecas, fácil de reconocer debido a que es muy abundante.

3.1.5.3 **Sambucus canadensis L.** (6:278-282).

Se puede encontrar en bosques húmedos o en lugares abiertos a una altitud entre 1,300-3,700 metros sobre el nivel del mar, se utiliza abundantemente como cercos a lo largo de los caminos, se puede encontrar en: Alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Huehuetanango, Jalapa, El Progreso, Quetzaltenango. El Quiché, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá y Totonicapán.

Arbustos de aproximadamente 4-12 metros de alto, tronco espeso, corteza café clara, madera amarilla, la médula presenta coloración blanca, de 5-11 hojas (normalmente 7-9) oblongas-lanceoladas, a veces elípticas, principalmente de 6-19 cm. de largo, redondeadas en la base y a menudo desiguales, normalmente con 30-90 dientes en el lado

de alcance (ocasionalmente sólo 25), corola blanca o crema, 5-7 mm. de ancho, lóbulos redondeados; el fruto maduro presenta coloración púrpura-negro, 5-8 mm. de diámetro.

La forma y tamaño de las hojas es altamente variable, aparentemente esta especie está estrechamente relacionado con *Sambucus nigra* Europea. En las regiones templadas del norte, algunas frutas presentan coloración: roja naranja o raramente verdoso.

Las ramas son a menudo grandes y pesadas, y se extienden horizontalmente o incluso descansan en la tierra.

4. JUSTIFICACIÓN

Actualmente hay un considerable interés mundial en el desarrollo de colorantes naturales, esto se debe, a la» necesidad de expansión de la variedad de los colorantes, a la implicación de que son naturales y por consiguiente seguros, además en la industria de alimentos se requiere de productos de mayor calidad nutricional y que no presenten riesgos a la salud como demuestran ciertos estudios realizados a algunos colorantes artificiales utilizados en la industria de alimentos. El mercado de colorantes naturales va en aumento, esto se debe principalmente a la percepción del consumidor que “lo natural es mejor” (2:72,76).

Las antocianinas son colorantes permitidos por la Comunidad Económica Europea y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos, estos compuestos proporcionan un amplio espectro de beneficios a la salud, debido a su capacidad antioxidante presentan la propiedad de prevenir y combatir enfermedades del corazón y varias formas de cáncer, por ser colorantes naturales no requieren certificación y en este trabajo se trató de encontrar fuentes alternativas naturales de colorantes (le tonalidad roja para proporcionar opciones para satisfacer las necesidades de consumo de los pigmentos: Rojo No.40, Rojo No.3 y Rojo No.2. En términos generales se puede mencionar que el mercado global de colorantes naturales es aproximadamente 234% mayor que el de los sintéticos y reporta un crecimiento anual del 4% (2:73) (7:352).

Siendo Guatemala un país que basa en buena parte su economía en la agricultura, el proyecto tendrá incidencia positiva en lo social y económico, al buscar fortalecer un renglón productivo de importancia estratégica para la producción agrícola guatemalteca, presentando otras aplicaciones y potenciales mercados para productos que se cultivan en el país aportándoles un mayor valor agregado.

5. OBJETIVOS

5.1 GENERALES:

5.1.1 Evaluar los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Sauco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales: Rojo No.40, Rojo No.3 y Rojo No.2 en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5.

5.2 ESPECIFICOS:

5.2.1 Extraer los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de las plantas mencionadas, utilizando técnicas de extracción con solventes de distinta polaridad (extracción sólido-líquido).

5.2.2 Cuantificar el pigmento antociánico mayoritario presentes en los frutos de las plantas mencionadas, utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible.

5.2.3 Evaluar entre los extractos acuosos de los frutos de las plantas mencionadas, la estabilidad de los pigmentos antociánicos, a diferente temperatura (30°C y 50°C) y pH (3, 4 y 5), utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible.

6. HIPÓTESIS

Los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Sauco) poseen las características para ser utilizados como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales Rojo No.40, Rojo No.3 y Rojo No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 3, 4 y 5.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 UNIVERSO Y MUESTRA

UNIVERSO	MUESTRA
<i>Prunus sp.</i> (Cereza).	1 Kg del fruto de <i>Prunus capuli</i> Cav. Colectado en el Departamento de San Marcos.
<i>Rubus sp.</i> (Mora).	1 Kg del fruto de <i>Rubus urticaefolius</i> Poir. Colectado en el Departamento de San Marcos.
<i>Sambucus sp.</i> (Saúco).	1 Kg del fruto de <i>Sambucus canadensis</i> L. Colectado en el Departamento de Chimaltenango.

7.2 MATERIAL Y LÍQUIPO

CANTIDAD	DESCRIPCION
1	Balanza analítica.
1	Balanza semi-analítica.
1	Refrigerador.
1	Estufa eléctrica.
2	Hornos.
1	Mortero de porcelana.
1	Pistilo de porcelana.
1	Pliego de película plástica (Parafilm)
1	Pliego papel filtro Whatman No. 1
1	Embudo Büchner.
1	Cronómetro.

7.3 INSTRUMENTOS

DESCRIPCIÓN:
Espectrofotómetro UV-Visible Varian Cary 50 Bio.

7.4 REACTIVOS

DESCRIPCIÓN
Etanol 95%.
Ácido clorhídrico concentrado.
Ftalato ácido de potasio.
Hidróxido de potasio.
Colorante artificial Rojo No. 40 WARNER-JENKINSON Company FD & C.
Colorante artificial Rojo No. 3 WARNER-JENKINSON Company FD & C.
Colorante artificial Rojo No. 2 WARNER-JENKINSON Company FD & C.

7.5 CRISTALERIA

CANTIDAD.	DESCRIPCIÓN.	DIMENSIONES.
3	Beaker.	1 Litro
3	Beaker.	500 ml,
1	Probeta.	50 ml,
1	Probeta.	25 mL
1	Probeta.	10 ml,
1	Matraz Kitazato.	500 ml,
3	Balones aforados.	500 ml,
15	Balones aforados.	100 ml,
3	Pipetas Volumétricas TD.	1 ml,
4	Pipetas Volumétricas TD.	2 ml,
3	Pipetas Volumétricas TD.	5 ml,
3	Pipetas Volumétricas TD.	10 ml,
108	Tubos de Ensayo.	30 ml,

7.6 METODOS

7.6.1 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS A TRABAJAR

Para efectuar la recolección de las diferentes muestras de las plantas con las que se trabajó, se viajó a uno de los departamentos donde se reporta que se cultivan, con el propósito de observar las características de las plantas y se colectaron: frutos (aproximadamente 1 Kg), flores, hojas y ramas de cada una de las especies de plantas utilizadas en la presente investigación. Posteriormente el Ingeniero Agrónomo Mario Véliz (encargado del Herbario de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala) realizó la determinación taxonómica. Los frutos colectados fueron congelados para preservarlos hasta el inicio de la parte experimental de la investigación.

7.6.2 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE COLORANTES

Se descongelaron aproximadamente 200 g. de cereza de la sección 7.6.1 de éstos se pesaron 100 g. el fruto se macero utilizando 100 mL de disolvente extractor (etanol 95%, ácido clorhídrico 0.1 N en proporción 85:15). Se transfirió cuantitativamente el contenido a un beaker de 500 mL, y usando volúmenes de aproximadamente 50 mL, de disolvente extractor, se lavó el macerador. El volumen fue de aproximadamente 215 mL, se cubrió el beaker con una película de plástico y se guardó durante toda la noche a 4°C en un refrigerador, posteriormente la muestra se filtra en papel Whatman No. 1 usando un embudo Büchner.

Tanto el beaker como el residuo en el filtro se lavaron repetidamente con el disolvente extractor hasta aproximadamente tener un volumen de 450 mL, de extracto reunido, se transfirió a un balón aforado de 500 mL, se enrazó con el disolvente extractor y rotuló como solución 1 A.

Este procedimiento se repitió con la mora y el saúco y se rotularon como soluciones 2A y 3A respectivamente (4:74).

7.6.3 PROCEDIMIENTO PARA REALIZAR LA CUANTIFICACIÓN DE COLORANTES NATURALES

7.6.3.1 DETERMINACIÓN DEL TOTAL DE ANTOCIANINAS

Para preparar el extracto para la determinación espectrofotométrica, una alícuota de aproximadamente 25 mL, de la solución IA obtenida en la sección 7.6.2 se filtró utilizando papel Whatman No.1 en un embudo Büchner, tomaron 2 mL de la alícuota filtrada y se enrazó en un balón de 100 mL, utilizando el disolvente para la lectura de absorbancia (etanol 95%, ácido clorhídrico 0.1 N en proporción 85:15, se rotuló como solución IB), a la solución resultante se le determinó la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético y la absorbancia en esa longitud de onda. El extracto se almacenó dos horas a oscuras y se midió nuevamente la longitud de máxima absorbancia y la absorbancia en esa longitud de onda, después de transcurrido este tiempo. El contenido total de antocianinas es calculado con la ayuda del peso del fruto, volumen de disolvente, el factor de dilución y valores de F (Coeficiente de extinción).

Este procedimiento se repitió con las otras dos soluciones 2A y 3A y se rotularán como solución 213 y 3B respectivamente (4:74).

7.6.3.2 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS COMPARANDO CON SOLUCIONES DE CONCENTRACIÓN CONOCIDA DE ROJO No.2

Se preparó 1 L de 3 soluciones buffer a pH: 3, 4 y 5 de la siguiente manera: (8: D-134).

pH 3: Se disolvió en 500 mL de agua destilada 14.1327 g de ftalato ácido de potasio con 7 mL, de ácido clorhídrico 4.40 Molar y se aforó a 1 L.

pH 4: Se disolvió en 500 mL de agua destilada 20.3822 g de ftalato ácido de potasio con 2 mL de ácido clorhídrico 0.10 Molar y se aforó a 1 L.

pH 5: Se disolvió en 500 mL de agua destilada 14.0714 g de ftalato ácido de potasio con 10 mL de hidróxido de sodio 3.11 Molar y aforar a 1 L.

A tres balones aforados de 100 mL se añadieron 2 mL de la solución filtrada IA, cada uno se enrazó utilizando diferentes soluciones buffer (pH 3, 4 y 5) se rotularon como IA3, IA4 Y IA5 respectivamente, se determinó la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético a los distintos valores de pH.

Este procedimiento se repitió con las otras dos soluciones filtradas 2A y 3A.

Rotulándolas como 2A3, 2A4, 2A5, 3A3, 3A4 y 3A5 respectivamente.

Se prepararon soluciones de concentración 0.1 g/L aproximadamente, de cada uno de los estándares (Rojo No.2, Rojo No. 3 y Rojo No.40) a pH 3, 4 y 5.

ETÁNDARES.		
Rojo No.40	Rojo No.3	Rojo No.2
$pH_1=3$	$pH_1=3$	$pH_1=3$
$pH_2=4$	$pH_2=4$	$pH_2=4$
$pH_3=5$	$pH_3=5$	$pH_3=5$

Se determinó la longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético para cada una de las soluciones de colorantes artificiales a diferente pH.

Se comparó la longitud de máxima absorbancia de las diferentes muestras con la longitud de máxima absorbancia de los diferentes estándares a distintos valores de pH. Se consideró para el resto del trabajo sólo aquellas muestras en las que la longitud de máxima absorbancia en la región visible el espectro electromagnético

(a un pH determinado) coincidió con la de algún colorante artificial al mismo valor de pH.

Se elaboró una curva de calibración entre 1 ppm. y 10 ppm. para el colorante artificial Rojo No.2, utilizando el buffer en el cual la longitud de máxima absorbancia fue igual tanto para la muestra como para el estándar, y se realizó la lectura de absorbancia de las diferentes muestras, a ese valor de longitud de onda, para obtener un equivalente de concentración de los colorantes naturales en función del colorante artificiales (un gramo de fruta equivale a X mg de Rojo No.2) (4:75).

7.6.4 ROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA ESTABILIDAD DE COLORANTES NATURALES

La estabilidad de los colorantes presentes en cada una de las diferentes muestras (Cereza, Mora y Saúco), se evaluaron a 2 valores de pH: 4 y 5, éstos fueron los valores de pH en los cuales las muestras presentaron el mismo valor de longitud de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético que alguno de los estándares (Rojo No.2), y a 2 temperaturas 30T y 50'C, para mantener las muestras a ésta temperatura se introdujeron en dos hornos diferentes, calibrados para mantener ésta temperatura, dichos hornos permanecieron conectados durante todo el tiempo que duró la parte experimental. Las muestras fueron monitoreadas por sea necesario para llevar a cabo ésta parte experimental. Las muestras espectro fotometría ultravioleta-visible a 540 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las diferentes muestras y Rojo No.2), las determinaciones se realizaron para cada muestra a un valor específico de pH y temperatura.

Se llevaron tres tubos simultáneos conteniendo la misma muestra (Cereza, Mora y Saúco), el seguimiento se realizó cada día (excepto sábado y domingo) hasta que la absorbancia de una de las muestras bajo alrededor del 80% del valor inicial.

El procedimiento que se indica a continuación se realizó para cada muestra que cumplió con la condición mencionada anteriormente.

Se añadieron 20 mL de solución buffer pH 3 a 6 tubos de 30 mL y se identificaron 3 como (T₁, pH₁) y 3 tres como (T₂, pH₁).

Se añadieron 20 mL de solución buffer pH 4 a 6 tubos de 30 mL y se identificaron 3 como (T₁, pH₂) y 3 tres como (T₂, pH₂)

Se añadieron 20 mL de solución buffer pH 5 a 6 tubos de 30 mL, y se identificaron 3 como (T₁, pH₃) y 3 tres como (T₂, pH₃).

Se añadió una cantidad de extracto de cada muestra para que brindara un valor de absorbancia entre 0.4 y 0.6 unidades en la región visible del espectro electromagnético. Se realizaron las determinaciones para cada tubo cada día como se indicó al inicio.

A continuación se presenta una tabla para las diferentes muestras.

MUESTRAS PROVENIENTES DEL FRUTO DE								
Cereza			Mora			Saúco		
	<i>T₁(30°C)</i>	<i>T₂(50°C)</i>		<i>T₁(30°C)</i>	<i>T₂(50°C)</i>		<i>T₁(30°C)</i>	<i>T₂(50°C)</i>
<i>pH₁=3</i>	T ₁ ,pH ₁	T ₂ ,pH ₁	<i>pH₁=3</i>	T ₁ ,pH ₁	T ₂ ,pH ₁	<i>pH₁=3</i>	T ₁ ,pH ₁	T ₂ ,pH ₁
<i>pH₂=4</i>	T ₁ ,pH ₂	T ₂ ,pH ₂	<i>pH₂=4</i>	T ₁ ,pH ₂	T ₂ ,pH ₂	<i>pH₂=4</i>	T ₁ ,pH ₂	T ₂ ,pH ₂
<i>pH₃=5</i>	T ₁ ,pH ₃	T ₂ ,pH ₃	<i>pH₃=5</i>	T ₁ ,pH ₃	T ₂ ,pH ₃	<i>pH₃=5</i>	T ₁ ,pH ₃	T ₂ ,pH ₃

(9:768-770) (10:1219-1221)

7.6.5 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Se realizó la: extracción, cuantificación y se evaluó la estabilidad de los colorantes antociánicos presentes en los frutos de Cereza, Mora y Saúco.

7.6.5.1 Extracción de colorante utilizando disolventes de distinta polaridad.

7.6.5.2 Cuantificación de colorantes utilizando espectrofotometría ultravioleta-visible.

7.6.5.2.1 Determinación de la cantidad total de colorantes presentes en 100 g de Cereza, Mora y Saúco.

7.6.5.2.2 Comparación de la cantidad de colorantes presentes en una solución acuosa de Cereza a pH 4 y 5, con soluciones de concentración conocida de *Rojo* No.2

7.6.5.2.3 Comparación de la cantidad de colorantes presentes en una solución acuosa de Mora a pH 5, con soluciones de concentración conocida de *Rojo* No.2

7.6.5.2.4 Comparación de la cantidad de colorantes presentes en una solución acuosa de Saúco a pH 4, con soluciones de concentración conocida de *Rojo* No.2

7.6.5.3 Evaluación de la estabilidad de los colorantes:

El diseño experimental para realizar la evaluación de la estabilidad de los colorantes naturales fue: Serie cronológicas con repetición del estímulo, se comparó la estabilidad de los colorantes antociánicos presentes en los frutos de las diferentes muestras, que brindaron una longitud de máxima absorbancia igual a los estándares en la región visible del espectro electromagnético, en los valores de pH donde ocurrió este fenómeno se determinó la estabilidad a dos valores de temperatura: 300°C y 50°C.

<i>Fruta</i>	Variables		
	Independientes		Dependiente
	<i>Temperatura</i>	<i>pH.</i>	<i>Color(λ)</i>
G ₁ =Cereza.	X ₁ = 30°C	Y ₁ =4	Absorbancia
G ₂ = Mora.	X ₂ = 50°C	Y ₂ =5	
G ₃ = Saúco.			

SIMBOLOGIA:

G = grupo (Fruta).

X = Condición experimental (Temperatura).

Y = Condición experimental (pH).

0 = Una medición de absorbancia, las mediciones se realizarán cada día excepto (Sábado y Domingo), hasta que la absorbancia de una de las muestras disminuya al 80% de su valor inicial.

Serie cronológicas con repetición del estímulo.

G ₁	0 ₁	X ₁ Y ₁	0 ₂	X ₁ Y ₁	0 ₃	X ₁ Y ₁	0 ₄	X ₁ Y ₁	0 _n
G ₁	0 _{n+1}	X ₁ Y ₂	0 _{n+2}	X ₁ Y ₂	0 _{n+3}	X ₁ Y ₂	0 _{n+4}	X ₁ Y ₂	0 _n
G ₂	0 _{n+1}	X ₁ Y ₂	0 _{n+2}	X ₁ Y ₂	0 _{n+3}	X ₁ Y ₂	0 _{n+4}	X ₁ Y ₂	0 _o
G ₃	0 _{o+1}	X ₁ Y ₁	0 _{o+2}	X ₁ Y ₁	0 _{o+3}	X ₁ Y ₁	0 _{o+4}	X ₁ Y ₁	0 _p
G ₁	0 _{p+1}	X ₂ Y ₁	0 _{p+2}	X ₂ Y ₁	0 _{p+3}	X ₂ Y ₁	0 _{p+4}	X ₂ Y ₁	0 _q
G ₁	0 _{q+1}	X ₂ Y ₂	0 _{q+2}	X ₂ Y ₂	0 _{q+3}	X ₂ Y ₂	0 _{q+4}	X ₂ Y ₂	0 _r
G ₂	0 _{r+1}	X ₂ Y ₂	0 _{r+2}	X ₂ Y ₂	0 _{r+3}	X ₂ Y ₂	0 _{r+4}	X ₂ Y ₂	0 _s
G ₃	0 _{s+1}	X ₂ Y ₁	0 _{s+2}	X ₂ Y ₂	0 _{s+3}	X ₂ Y ₂	0 _{s+4}	X ₂ Y ₂	0 _t

Los resultados de los primeros dos incisos de ésta sección: extracción y cuantificación de colorantes, se analizaron e interpretaron por métodos y procedimientos que están establecidos para cada una de las diferentes técnicas. Para la estabilidad de los colorantes, las muestras se examinaron por triplicado y los resultados se analizaron estadísticamente en base al valor de desviación estándar (11: 155-156,353-363).

8. RESULTADOS

8.1 RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS MUESTRAS A TRABAJAR

UNIVERSO	MUESTRA	PROCEDENCIA	REGISTRO
<i>Prunus sp.</i> (Cereza)	1 Kg del fruto de <i>Prunus capuli</i> .	Aldea Piedra Grande, San Pedro Sacatepéquez, San Marcos, Guatemala. Elevación promedio: 2,398 msnm Latitud: 14°57'55" Longitud: 91° 46'36" Colectó: Walter Fuentes 15/09/03 Determinó: Ing. Agrónomo. Mario Véliz 02/10/03	20,593 HERBARIO BIGUA, Escuela de Biología. Facultad de C.C.Q.Q. Y Farmacia
<i>Rubus sp.</i> (Mora)	1 Kg del fruto de <i>Rubus urticefolius</i>	Aldea San Isidro Chamac, San Pedro Sacatepéquez, San Marcos, Guatemala. Elevación promedio: 2,398 msnm Latitud: 14° 57 '55" Longitud: 91° 46'36" Colectó: Walter Fuentes 15/09/03 Determinó: Ing. Agrónomo. Mario Véliz 02/10/03	20,594 HERBARIO BIGUA, Escuela de Biología. Facultad de C.C.Q.Q. Y Farmacia
<i>Sambucus sp.</i> (Saúco)	1 Kg del fruto de <i>Sambucus canadensis</i> .	Km. 89 Carretera Interamericana, Tecpán, Chimaltenango, Guatemala. Elevación promedio: 2,386 msnm Latitud: 14° 45'37" Longitud: 90° 59'30" Colectó: Walter Fuentes 15/09/03 Determinó: Ing. Agrónomo. Mario Véliz 02/10/03	20,595 HERBARIO BIGUA, Escuela de Biología. Facultad de C.C.Q.Q. Y Farmacia

8.2 DETERMINACIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MÁXIMA
 ABSORBANCIA DE LOS ESTÁNDARES Y MUESTRAS EN LA REGIÓN VISIBLE
 DEL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO

COLORANTE	pH	MÁXIMO DE ABSORBANCIA (nm)	COLORANTE NATURAL COMO SUSTITUTO DE
<i>Rojo No.40</i>	3	506.0	Ninguno
	4	509.0	Ninguno
	5	505.0	Ninguno
<i>Rojo No.3</i>	3	531.0	Ninguno
	4	529.0	Ninguno
	5	529.0	Ninguno
<i>Rojo No.2</i>	3	524.9	Ninguno
	4	524.9	Ninguno
	5	524.9	Ninguno
Pericarpio (cáscara) fruto de cereza	3	519.1	Ninguno
	4	524.9	Rojo No.2 pH 4
	5	524.9	Rojo No.2 pH 5
Fruto de mora	3	519.0	Ninguno
	4	521.9	Ninguno
	5	524.9	Rojo No.2 pH 5
Fruto de saúco	3	519.1	Ninguno
	4	524.9	<i>Rojo No.2</i> pH 4
	5	530.1	Ninguno

8.3 TOTAL DE ANTOCIANINAS PRESENTES EN 100 g. DE MUESTRA Y SUS RESPECTIVOS MÁXIMOS DE ABSORCIÓN (EXPERIMENTALES) EN LA REGIÓN 200-700 nm.

Muestra, solución acuosa de	Longitud de onda ^{*1}	Lectura de Absorbancia	rng de antocianina/100 g de muestra ^{*2}	Cantidad relativa de colorantes respecto a los de cereza
<i>Prunus capuli.</i> (pericarpio del fruto de cereza)	537 nm.	0.070	93.03	1
	360 nm.	0.182	0	
	256 nm.	0.363	0	
<i>Rubus urticaefolius</i> poir. (Fruto de mora)	537 nm.	0.188	249.85	2.6
	287 nm.	0.310	0	
<i>Sambucus canadensis.</i> (Fruto de saúco)	537 nm.	0.408	542.23	5.8
	283 nm	0.368	0	

^{*1} Los valores de longitud de onda para cada uno de los frutos se pueden observar en el Anexo No.8

Espectros 1, 2 y 3 respectivamente.

^{*2} Para el cálculo de mg totales de antocianinas ver Anexo No.9

8.4 mg DE ROJO No.2 EQUIVALENTES A UN GRAMO DE MUESTRA ^{*3}

Muestra	pH	Absorbancia $\lambda=524.9$ nm	Concentración de Rojo No.2	mg de Rojo No.2/g muestra
Cereza	4	0.0589	0.00554 g/L	1.3850
Cereza	5	0.0308	0.00295 g/L	0.7375
Mora	5	0.0197	0.00191 g/L	0.4775
Saúco	4	0.1695	0.01581 g/L	3.9525

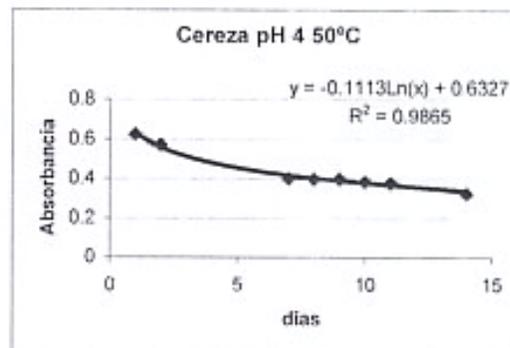
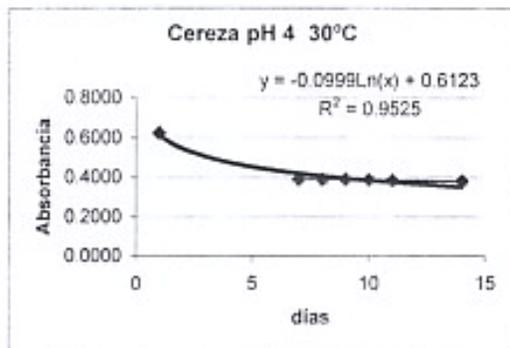
^{*3} Para el cálculo de mg de Rojo No.2/g de muestra, datos y curva de calibración de donde fueron obtenidos los resultados ver Anexos No. 11, 12 y 13 respectivamente.

8.5 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DE COLORANTES

8.5.1 COLORANTES PRESENTES EN LAS DIFERENTES MUESTRAS

8.5. 1.1 Prunus capuli Cav. (Cereza) pH 4

pH	Día	Temperatura 30 °C				Temperatura 50 °C			
		Lectura de absorbancia			Abs. Promedio	Lectura de absorbancia			Abs. Promedio
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
4	1	0.6260	0.6243	0.6205	0.6236	0.6260	0.6243	0.6205	0.6236
	2	0.3957	0.3956	0.3979	0.3964	0.3910	0.3975	0.9200	0.5695
	3	0.3931	0.3915	0.4019	0.3955	0.4058	0.4126	0.4087	0.4090
	4	0.3927	0.3842	0.3975	0.3915	0.4062	0.4052	0.4038	0.4051
	7	0.3665	0.3732	0.3939	0.3779	0.4028	0.3988	0.4000	0.4005
	8	0.3842	0.3782	0.3997	0.3874	0.3985	0.4018	0.3952	0.3985
	9	0.3816	0.3773	0.4039	0.3876	0.3964	0.4003	0.3964	0.3977
	10	0.3777	0.3708	0.3985	0.3823	0.3875	0.3804	0.3831	0.3837
	11	0.3834	0.3729	0.4054	0.3872	0.3765	0.3801	0.3754	0.3773
14	0.3823	0.3672	0.4058	0.3851	0.3381	0.3009	0.3338	0.3243	

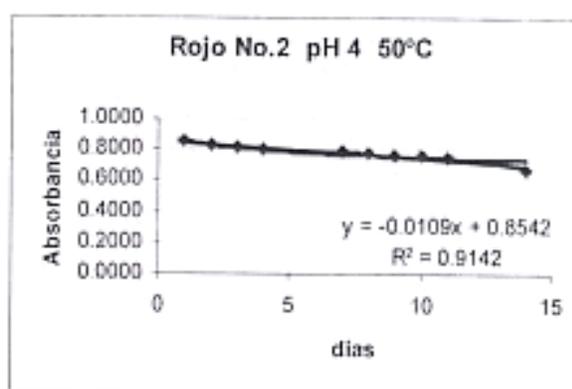
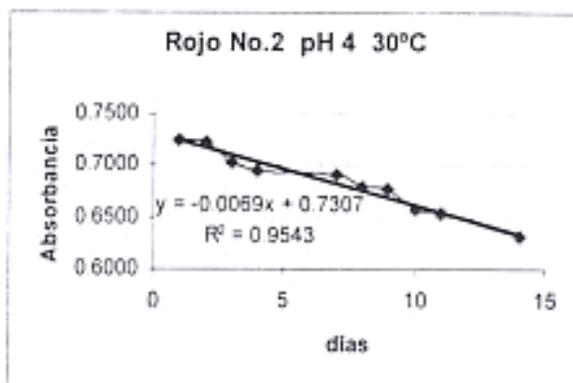


CEREZA pH 4 30 °C		CEREZA pH 4 50 °C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.0748	Desviación estándar	0.0924
Varianza	0.0056	Varianza	0.0086
Máximo	0.6236	Máximo	0.6236
Mínimo	0.3779	Mínimo	0.3243
Rango	0.2457	Rango	0.2993

8.5.2 COLORANTE ARTIFICIAL ROJO No.2.

8.5.2.1 Rojo No.2 pH 4

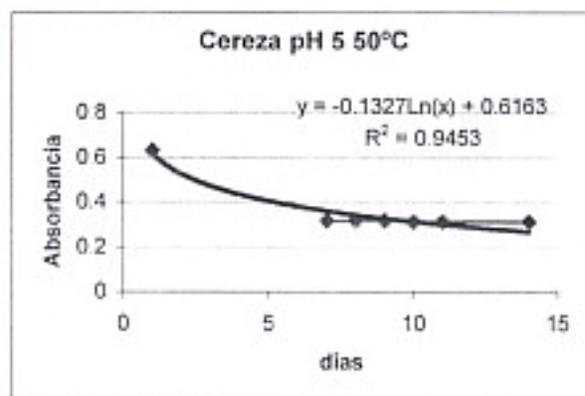
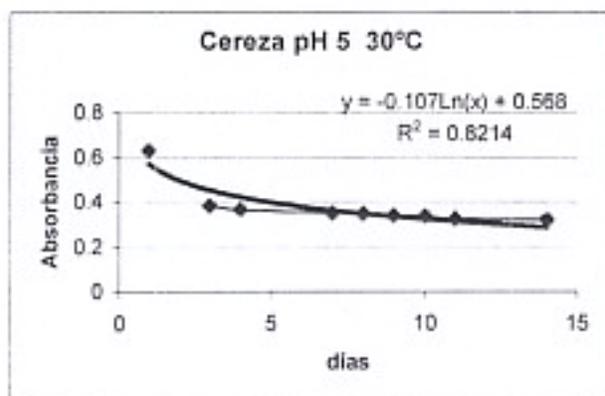
		Temperatura 30 °C				Temperatura 50 °C			
		Lectura de absorbancia			Abs. Promedio.	Lectura de absorbancia			Abs. Promedio
pH	Día	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
4	1	0.7280	0.7195	0.7239	0.7238	0.8593	0.8554	0.8523	0.8490
	2	0.7250	0.7324	0.7095	0.7223	0.8401	0.8072	0.8238	0.8237
	3	0.6919	0.7115	0.7071	0.7035	0.8283	0.7959	0.8121	0.8121
	4	0.6727	0.7093	0.6995	0.6938	0.8124	0.7932	0.7898	0.7985
	7	0.6734	0.7020	0.6994	0.6916	0.7932	0.7816	0.7787	0.7845
	8	0.6652	0.6885	0.6850	0.6796	0.7917	0.7744	0.7724	0.7795
	9	0.6553	0.6852	0.6917	0.6774	0.7716	0.764	0.7617	0.7658
	10	0.6486	0.6622	0.6600	0.6569	0.7673	0.7546	0.7552	0.7590
	11	0.6213	0.6704	0.6681	0.6533	0.7491	0.7516	0.7404	0.7470
	14	0.6285	0.6311	0.6324	0.6307	0.6731	0.6712	0.6734	0.6726



Rojo No.2 pH 4 30 °C		Rojo No.2 pH 4 50 °C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.0301	Desviación estándar	0.0487
Varianza	0.0009	Varianza	0.0024
Máximo	0.7238	Máximo	0.8490
Mínimo	0.6307	Mínimo	0.6726
Rango	0.0931	Rango	0.1764

8.5.1.3 *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) pH 5

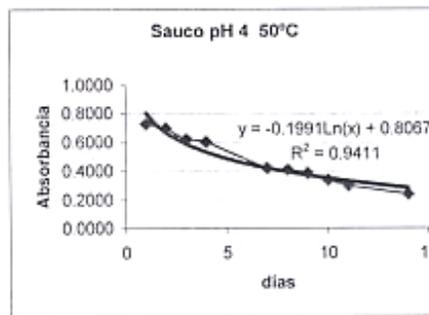
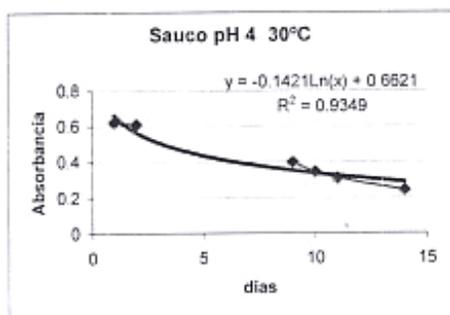
		Temperatura 30 °C				Temperatura 50 °C			
		Lectura de absorbancia			Abs. Promedio	Lectura de absorbancia			Abs. Promedio
pH	Día	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
5	1	0.6330	0.6316	0.6329	0.6325	0.6330	0.6316	0.6329	0.6325
	2	0.3977	0.3585	0.4060	0.3874	0.3368	0.3348	0.3318	0.3345
	3	0.4061	0.3329	0.4067	0.3819	0.3338	0.3297	0.3238	0.3291
	4	0.3910	0.3115	0.3912	0.3646	0.3306	0.3248	0.3174	0.3243
	7	0.3608	0.3220	0.3704	0.3511	0.3257	0.3204	0.3047	0.3169
	8	0.3626	0.3064	0.3670	0.3453	0.3238	0.3182	0.3052	0.3157
	9	0.3594	0.2949	0.3625	0.3389	0.3285	0.3192	0.2991	0.3156
	10	0.3530	0.2940	0.3614	0.3361	0.3231	0.3148	0.2974	0.3118
	11	0.3381	0.3009	0.3338	0.3243	0.3206	0.3136	0.3003	0.3115
	14	0.3384	0.2983	0.3255	0.3207	0.3259	0.3136	0.2907	0.3101



CEREZA pH 5 30 °C		CEREZA pH 5 50 °C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.0921	Desviación estándar	0.0995
Varianza	0.0085	Varianza	0.0099
Máximo	0.6325	Máximo	0.6325
Mínimo	0.3207	Mínimo	0.3101
Rango	0.3118	Rango	0.3224

8.5.1.4 *Sambucus canadensis* L. (Sauco) pH 4

PH	Día	Temperatura 30°C.				Temperatura 50°C.			
		Lectura de absorbancia.			Abs. promedio.	Lectura de absorbancia.			Abs. Promedio.
		Tubo 1.	Tubo 2.	Tubo 3.		Tubo 1.	Tubo 2.	Tubo 3.	
4	1	0.6201	0.6276	0.6168	0.6215	0.7337	0.7341	0.7237	0.7305
	2	0.6071	0.6174	0.6005	0.6083	0.6774	0.7110	0.7043	0.6976
	3	0.6026	0.6029	0.6030	0.6028	0.6181	0.6421	0.6066	0.6223
	4	0.5425	0.5658	0.5460	0.5514	0.6026	0.6029	0.6030	0.6028
	7	0.5080	0.5378	0.5272	0.5243	0.3933	0.4409	0.4239	0.4194
	8	0.4640	0.5091	0.5119	0.4950	0.3812	0.4255	0.4145	0.4071
	9	0.3376	0.4130	0.4432	0.3979	0.3803	0.3843	0.3789	0.3812
	10	0.2800	0.3573	0.3915	0.3429	0.3178	0.3471	0.3406	0.3352
	11	0.2475	0.3156	0.3582	0.3071	0.2754	0.3179	0.3078	0.3004
	14	0.2337	0.2452	0.2464	0.2418	0.2274	0.2478	0.2392	0.2381

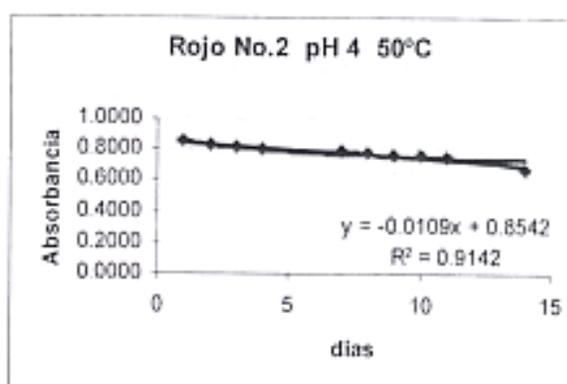
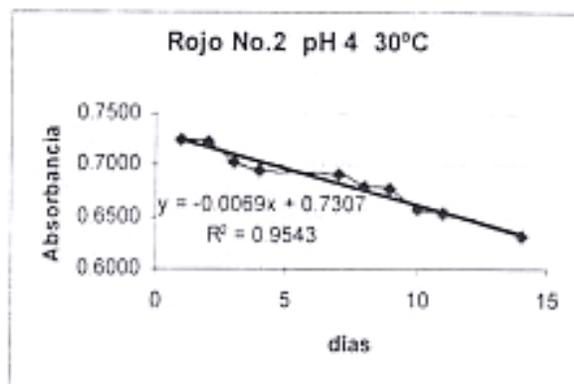


SAUCO pH 4 30°C		SAUCO pH 4 50°C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.1374	Desviación estándar	0.175
Varianza	0.0189	Varianza	0.0306
Máximo	0.6215	Máximo	0.7305
Mínimo	0.2418	Mínimo	0.2381
Rango	0.3797	Rango	0.4924

8.5.2 COLORANTE ARTIFICIAL ROJO No.2.

8.5.2.1 Rojo No.2 pH 4

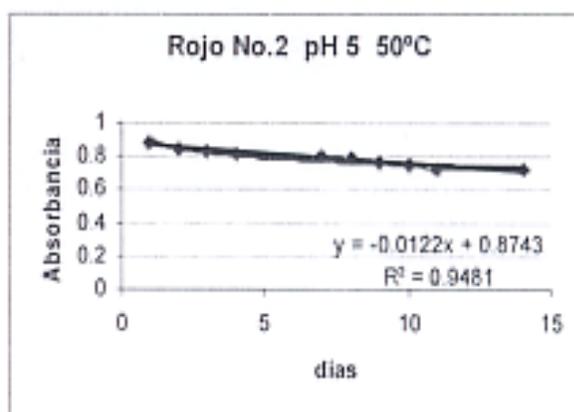
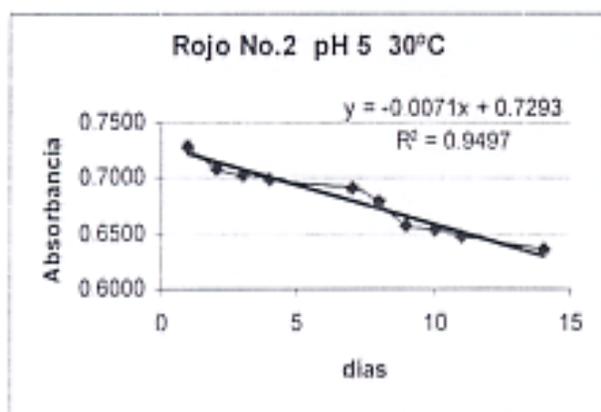
pH	Día	Temperatura 30 °C				Temperatura 50 °C			
		Lectura de absorbancia			Abs. Promedio.	Lectura de absorbancia			Abs. Promedio
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
4	1	0.7280	0.7195	0.7239	0.7238	0.8593	0.8554	0.8523	0.8490
	2	0.7250	0.7324	0.7095	0.7223	0.8401	0.8072	0.8238	0.8237
	3	0.6919	0.7115	0.7071	0.7035	0.8283	0.7959	0.8121	0.8121
	4	0.6727	0.7093	0.6995	0.6938	0.8124	0.7932	0.7898	0.7985
	7	0.6734	0.7020	0.6994	0.6916	0.7932	0.7816	0.7787	0.7845
	8	0.6652	0.6885	0.6850	0.6796	0.7917	0.7744	0.7724	0.7795
	9	0.6553	0.6852	0.6917	0.6774	0.7716	0.764	0.7617	0.7658
	10	0.6486	0.6622	0.6600	0.6569	0.7673	0.7546	0.7552	0.7590
	11	0.6213	0.6704	0.6681	0.6533	0.7491	0.7516	0.7404	0.7470
	14	0.6285	0.6311	0.6324	0.6307	0.6731	0.6712	0.6734	0.6726



Rojo No.2 pH 4 30 °C		Rojo No.2 pH 4 50 °C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.0301	Desviación estándar	0.0487
Varianza	0.0009	Varianza	0.0024
Máximo	0.7238	Máximo	0.8490
Mínimo	0.6307	Mínimo	0.6726
Rango	0.0931	Rango	0.1764

8.5.2.2 Rojo No.2 (Cereza) pH 5

		Temperatura 30 °C				Temperatura 50 °C			
		Lectura de absorbancia.			Abs. Promedio	Lectura de absorbancia.			Abs. Promedio
pH	Día	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	
5	1	0.7018	0.7420	0.7436	0.7291	0.8989	0.8687	0.8662	0.8779
	2	0.6835	0.7220	0.7223	0.7093	0.8627	0.8436	0.8381	0.8481
	3	0.6919	0.7115	0.7071	0.7035	0.8429	0.8208	0.8195	0.8277
	4	0.7132	0.6923	0.6932	0.6996	0.8308	0.8126	0.8068	0.8167
	7	0.6734	0.7020	0.6994	0.6916	0.8183	0.7950	0.7884	0.8006
	8	0.6652	0.6885	0.6850	0.6796	0.7993	0.7815	0.7754	0.7854
	9	0.6486	0.6622	0.6600	0.6569	0.7684	0.7573	0.7523	0.7593
	10	0.6213	0.6704	0.6681	0.6533	0.7496	0.7468	0.7406	0.7457
	11	0.6357	0.6551	0.6510	0.6473	0.7259	0.7218	0.7177	0.7218
	14	0.6361	0.6351	0.6341	0.6351	0.7228	0.7278	0.7108	0.7205



Rojo No.2 pH 5 30 °C		Rojo No.2 pH 5 50 °C	
ABSORBANCIA	VALOR	ABSORBANCIA	VALOR
Desviación estándar	0.0310	Desviación estándar	0.0535
Varianza	0.0010	Varianza	0.0029
Máximo	0.7291	Máximo	0.8779
Mínimo	0.6351	Mínimo	0.7205
Rango	0.0957	Rango	0.1575

8.6 RESUMEN ESTABILIDAD DE COLORANTES

8.6.1 ESTABILIDAD COLORANTES PRESENTES EN LAS DIFERENTES MUESTRAS (FRUTAS)

No.	FRUTA	pH	T (°C)	Función: $Abs=a \ln(t)+b$	dA/dt	$\frac{dA}{dt}$ (Mora pH 5, 50°C) dA/dt (No. 1 a 8 respectivamente)	Desviación estándar
1	Cereza	4	30	$Abs = -0.0999 \ln(t) + 0.6163$	-0.0999/t	2.48	0.0748
2	Cereza	4	50	$Abs = -0.1113 \ln(t) + 0.6327$	-0.1113/t	2.22	0.0925
3	Cereza	5	30	$Abs = -0.1070 \ln(t) + 0.5680$	-0.1070/t	2.31	0.0921
4	Cereza	5	50	$Abs = -0.1327 \ln(t) + 0.6163$	-0.1327/t	1.87	0.0995
5	Mora	5	30	$Abs = -0.1950 \ln(t) + 1.2018$	-0.1950/t	1.27	0.1692
6	Mora	5	50	$Abs = -0.2478 \ln(t) + 1.2664$	-0.2478/t	1.00	0.2230
7	Saúco	4	30	$Abs = -0.1421 \ln(t) + 0.6621$	-0.1421/t	1.74	0.1374
8	Saúco	4	50	$Abs = -0.1991 \ln(t) + 0.8067$	-0.1991/t	1.24	0.1750

8.6.2 ESTABILIDAD COLORANTE ARTIFICIAL ROJO No.2

No.	Colorante	pH	T (°C)	Función: $Abs=a \ln(t)+b$	dA/dt (Pendiente)	$\frac{dA}{dt}$ (Rojo No.2 pH 5, 50°C) dA/dt (No. 1 a 4 respectivamente)	Desviación estándar
1	Rojo No.2	4	30	$Abs = -0.0069(t) + 0.7307$	-0.0069	1.77	0.0301
2	Rojo No.2	4	50	$Abs = -0.0109(t) + 0.8542$	-0.0109	1.12	0.0487
3	Rojo No.2	5	30	$Abs = -0.0071(t) + 0.7293$	-0.0071	1.72	0.0310
4	Rojo No.2	5	50	$Abs = -0.0122(t) + 0.8743$	-0.0122	1.00	0.0535

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se recolectaron las diferentes muestras para realizar su clasificación taxonómica, ésta reveló que las muestras correspondían a: *Prunus capuli* (cereza), *Sambucus canadensis* (saúco) y *Rubus urticaefolius* (mora). Los especímenes utilizados para la determinación de las mismas fueron depositados y registrados en la colección del HERBARIO BIGUA.

No se intentó realizar la extracción de la totalidad de los colorantes antociánicos presentes en los frutos de Cereza, Mora y Saúco. De acuerdo a la revisión de literatura, existen diversos procedimientos para realizar la extracción, utilizando diferentes disolventes y condiciones como temperatura y presión. Sin embargo, se utilizó uno de los métodos más frecuentemente usados que se reportan para realizar la extracción de colorantes antociánicos para uso en alimentos (etanol 95%, ácido clorhídrico 0.1 N). Esto debido a que dentro de los objetivos no se pretende determinar el método o las condiciones más eficientes para realizar la extracción de la mayor cantidad de colorantes, sino únicamente utilizando uno de los métodos reportados, realizar la extracción en las mismas condiciones para todas las muestras y tener un parámetro de comparación para realizar la posterior cuantificación de dichos colorantes. Algo importante de mencionar, es que en el caso de la Mora y el Saúco se trabajó con todo el fruto, no así con la Cereza, para lo cual se utilizó únicamente el pericarpio (cáscaras), debido a que durante la realización de la parte experimental se observó que la mayor cantidad de antocianinas se encontraban en éste (coloración roja) y que en el endocarpio (parte interna del fruto) contenía otro tipo de colorantes (verdes) que no eran de interés en la investigación y pueden interferir en la misma (13:703-71 l).

Se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético tanto para los colorantes artificiales Rojo No.40, Rojo No.3 y Rojo No.2 (estándares) y para los extractos acuosos de las diferentes

muestras a pH 3, 4 y 5. Esto, con el propósito de identificar qué muestras pueden ser utilizadas como sustitutos de los colorantes artificiales.

De los resultados se determinó que el único colorante artificial que puede ser reemplazado es el *Rojo* No.2 (no así los colorantes *Rojo* No.3 y *Rojo* No.40) a pH 4 y pH 5, por los extractos acuosos provenientes de Cereza pH 4, Cereza pH 5, Mora pH 5 y Saúco pH 4. Lo anterior se puede afirmar con base a que fueron los únicos que presentaron el mismo valor de longitud de onda de máxima absorbancia en la región visible del espectro electromagnético (524.9 nm), no se encontró ningún extracto que pueda utilizarse como alternativa natural de consumo del colorante artificial *Rojo* No.2 a pH 3.

Todos los extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos a pH 3, 4 y 5 presentan un máximo de absorción en la región entre 505.0 nm a 530.1 nm, por lo que presentan coloración roja, por lo que pueden utilizarse como colorantes de ésta tonalidad pero no como sustitutos de algún colorante artificial investigado.

Antes de continuar con la cuantificación de los colorantes se discutirán los resultados de la estabilidad de las diferentes muestras, esto debido a que varios fenómenos que se observaron durante la cuantificación se pueden explicar con base a ciertos mecanismos que se relacionan con la estabilidad de los colorantes antociánicos.

El análisis de los resultados de la estabilidad de los colorantes se realizó en dos vías. La primera utilizando como criterio, la desviación estándar de los valores de absorbancia (cuanto mayor es la desviación estándar, más inestable será el colorante).

Se determinó que el orden de estabilidad de los extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos es el siguiente: Cereza (pH 4, 30°C) > Cereza (pH 5, 30 °C) > Cereza (pH 4, 50 °C) > Cereza (pH 5, 50 °C) > Saúco (pH 4, 30 °C) > Mora (pH 5, 30 °C) > Saúco (pH 4, 50 °C) > Mora (pH 5, 50 °C).

Y el orden de estabilidad para el colorante artificial *Rojo* No. 2 es el siguiente: *Rojo* No.2 (pH 4, 30 °C) > *Rojo* No.2 (pH 5, 30 °C) > *Rojo* No.2 (pH 4, 50 °C) > *Rojo* No.2 (pH 5, 50 °C).

La segunda vía para determinar la estabilidad de los colorantes fue a través de monitorear la degradación del color de las muestras, como se muestra en las gráficas Absorbancia vs días de la sección 8.5.

El modelo matemático que mejor encajó para el comportamiento de Absorbancia respecto al tiempo fue: logarítmico (Absorbancia = $a * \ln(\text{tiempo}) + b$, donde a y b son constantes) para los extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos y lineal (Absorbancia = $m * (\text{tiempo}) + b$, donde m es la pendiente y b constante) para el colorante artificial *Rojo* No.2.

Para poder comparar la estabilidad de los diferentes extractos, se procedió a calcular la primera derivada de cada una de las ecuaciones, así se determinó el cambio de la absorbancia (Δ Absorbancia) respecto al tiempo (Δ tiempo), es decir la estabilidad que presenta cada extracto. Y utilizando el valor de la pendiente para el colorante artificial *Rojo* No.2 ($m = \Delta$ Absorbancia/ Δ tiempo).

A manera de ejemplo se puede ver en el anexo No.7, los cálculos y la interpretación de los resultados obtenidos de la degradación de los colorantes utilizando un ejemplo específico.

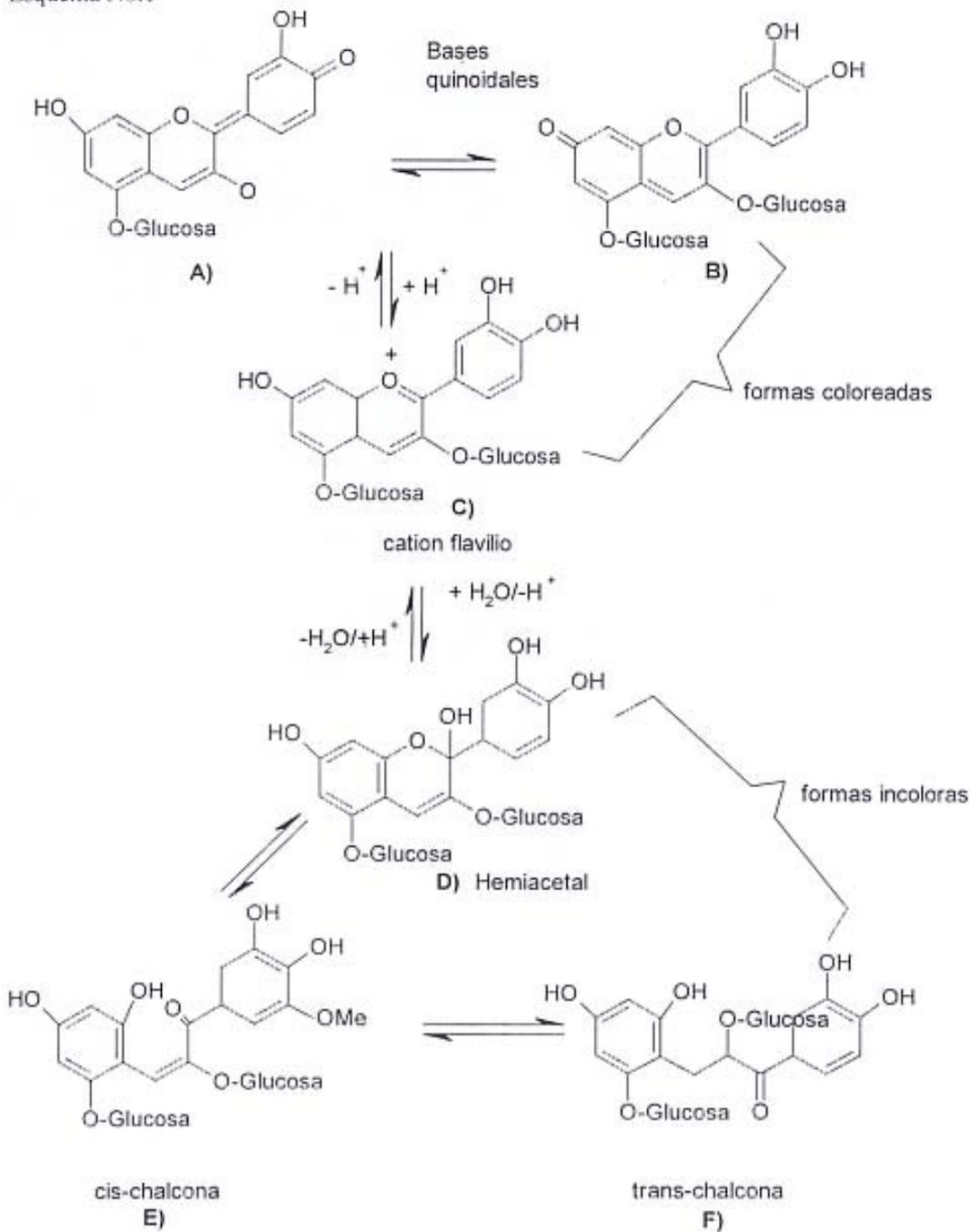
Se determinó que el orden de estabilidad de los extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos es el siguiente: Cereza (pH 4, 30 °C) > Cereza (pH 5, 30 °C) > Cereza (pH 4, 50 °C) > Cereza (pH 5, 50 °C) > Saúco (pH 4, 30 °C) > Mora (pH 5, 30 °C) > Saúco (pH 4, 50 °C) > Mora (pH 5, 50 °C).

Y el orden de estabilidad para el colorante artificial Rojo No. 2 es el siguiente: *Rojo* No.2 (pH 4, 30 °C) > Rojo No.2 (pH 5, 30 °C) > Rojo No.2 (pH 4, 50 °C) > *Rojo* No.2 (pH 5, 50 °C).

Al comparar los resultados de la determinación de la estabilidad de los colorantes, se puede observar que presentan el mismo orden, de acuerdo a las dos vías utilizadas para realizar el análisis, con base a ellos se puede afirmar que los diferentes extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos al pH indicado, pueden utilizarse como opciones de consumo natural del colorante artificial *Rojo* No.2 a pH 4 y 5.

Los diferentes factores que modificaron la estabilidad de los extractos se presentan a continuación, ha sido previamente establecido que la principal vía de degradación de las antocianinas es la hidratación del catión flavilio, debido al ataque nucleofílico del agua sobre el carbono 2 del catión, como se puede observar en el siguiente esquema (15:719)

Esquema No.1



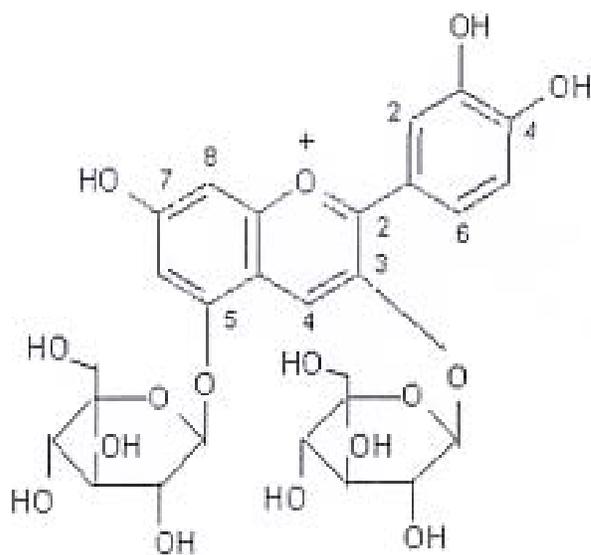
(16:8461)

Una de las formas de reducir la hidratación de las antocianinas se observa cuando ocurre una reacción de co-pigmentación. Esta reacción ocurre debido a la interacción entre moléculas de la antocianina y otros compuestos que actúan como co-pigmentos entre los cuales podemos mencionar a los flavonoides, ésta asociación molecular ocurre a través de diversas fuerzas, especialmente a través de interacciones π - π y puentes de hidrógeno.

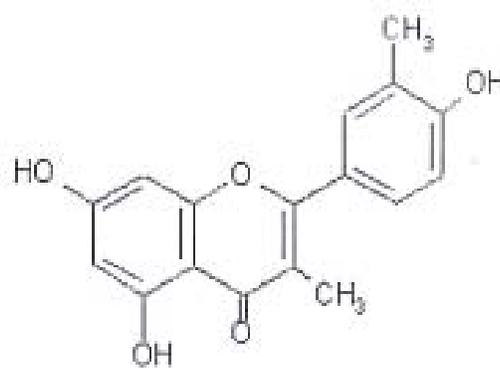
La estructura del complejo entre la molécula de la antocianina y el co-pigmento (en este caso flavonoides) se muestra en la Fig. No. 1 y Fig. No.2 (17:564-565).

Fig.No.1

Componentes del complejo: Cianidin -3,5- diglucósidos (antocianina) y 3,3'-dimetilquercitrina (flavonoide)



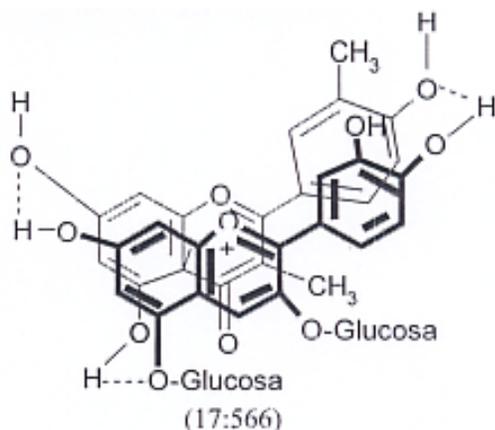
Cianidin-3,5-diglucosido



3,3'-dimetilquercitrina

Figura No.2

Representación del complejo formado entre Cianidin -3,5- diglucósidos (antocianina) y 3,3'-dimetilquercitrina (flavonoide).



Las reacciones de co-pigmentación de las antocianinas ocurren cuando el co-pigmento se adiciona a una antocianina en solución acuosa ligeramente ácida, que se refleja en el cambio en la longitud de máxima absorbancia, hacia longitudes de onda mayores, comparadas con las que presenta la antocianina sin el co-pigmento (efecto batocrómico). Se debe a la reacción de co-pigmentación el desplazamiento de la longitud de máxima absorbancia determinado experimentalmente (537nm) de la antocianina que se encuentra en mayor proporción en las diferentes muestras con el máximo de absorbancia teórico reportado para dicha antocianina (535nm) como se observa en las secciones 8.3 de los resultados y anexo No.10. Se produce también un aumento en la intensidad del color que se refleja en un incremento de absorbancia en el máximo del rango visible (efecto hiperocrómico) como se puede observar en la sección 8.4 específicamente en la absorbancia para la Cereza a pH 4 y 5 donde se puede observar claramente el incremento en la absorbancia en dos soluciones que se prepararon utilizando la misma cantidad del mismo extracto, variando únicamente el pH de la solución. Los dos fenómenos mencionados anteriormente confirman que se llevó a cabo una reacción de co-pigmentación (18:170).

La intensidad de la co-pigmentación se ve afectada por varios factores, incluyendo concentración de la antocianina y co-pigmento, la estructura química de ambos, el pH del medio, el solvente y la temperatura.

Respecto a la estructura, los diferentes co-pigmentos tienen la habilidad de reaccionar de diferente manera con las antocianinas provocando diferente grado de co-pigmentación que afecta tanto la intensidad como la estabilidad del colorante. La muestra de cereza, además de un máximo de absorbancia en la región visible 537 nm, presenta dos señales en la región 360 nm y 256 nm estos valores corresponden a los máximos de absorbancia de los flavonoides específicamente de los flavonoles (que presentan señales entre 250 -289 nm y 330 a 360 nm), éstos valores concuerdan exactamente con los reportados para 3,3'-dimetilquercitina. La Mora y el Saúco presenta además de la absorbancia en la región visible 537 nm, una única señal a 287nm y 283nm respectivamente, indicando la posible presencia de flavonoides del tipo isoflavonas que presentan una banda en la región comprendida entre 275nm a 293 nm. Debido a que son diferentes los co-pigmentos que estabilizan a las antocianinas presentes en las diversas muestras, estos las estabilizan en diferente magnitud observando que los flavonoles estabilizan de mejor manera a las antocianinas que las isoflavonas, esto explica por qué el extracto acuoso de Cereza es más estable que los extractos acuosos de Mora y Saúco.

Respecto al pH, existe actualmente controversia si es el catión flavilio o la base quinoidal (antocianina neutra) quien estabiliza al co-pigmento. Estudios realizados a diferentes valores de pH muestran que a pH bajo la antocianina está predominantemente en forma de catión flavilio, de manera que al disminuir el pH aumenta la concentración del catión flavilio por lo que el co-pigmento interacciona directamente con éste, este efecto brindará mayor estabilidad y capacidad a la antocianina de actuar como colorante, ya que como se indicó a pH 4 habrá mayor proporción de catión flavilio que a pH 5 y en consecuencia se espera que sea más

estable la solución a pH 4 y que aumente el poder de tinción del colorante debido al efecto hipercrómico. Esto se observó claramente en el caso de las soluciones preparadas con el extracto de Cereza que presentó diferente valor de absorbancia a pH 4 y pH 5, en soluciones que se prepararon utilizando la misma cantidad del mismo extracto, variando únicamente el pH de la solución según se observa en la sección 8.4. Esto también incidió en la estabilidad de los colorantes, en donde se observó debido a que al disminuir el pH las soluciones se hacen más estables, según se puede comprobar con los resultados de estabilidad de los colorantes presentes en Cereza pH 4 y pH 5 a la misma temperatura (30 °C o 50 °C) (19:665-666) (10:127) (21:106-107).

Respecto a la temperatura, diversos estudios demuestran una relación entre la temperatura, la estabilidad e intensidad del color que presentan las soluciones preparadas utilizando antocianinas. Investigaciones realizadas muestran que un incremento en la temperatura permiten un rompimiento de la asociación entre el catión flavilio con el co-pigmento, ya que es una reacción endotérmica con un $\Delta H = 23$ kJ/mol. Esto confirma la relación inversa entre la temperatura y el grado de co-pigmentación, este efecto se observó en los resultados, ya que todos los extractos acuosos antociánicos presentaron mayor estabilidad a menores temperaturas, esto se evidencio debido a que hubo menor decoloración de los extractos. Además, determinaciones termodinámicas demuestran que la formación de la especie charcona a partir de la hemiacetalica de la antocianina, también es endotérmica ($\Delta H = 3.7$ Kcal/mol) (Ver Esquema No. 1). Por consiguiente, cualquier aumento en la temperatura favorece el incremento de la forma chalcona (incolora) presente en el equilibrio, lo que se confirmó con cada una de las muestras, ya que a 30 °C más estable que a 50 °C al mismo valor de pH (22:2609) (16:8466).

Por consiguiente se puede afirmar que los extractos acuosos antocianicos presentes en los diferentes frutos investigados presentarán mayor estabilidad y consecuentemente actuarán de mejor manera como opciones de consumo natural del colorante artificial Rojo No.2 a temperaturas bajas, cuanto menor sea ésta más estable será el pigmento.

De los resultados obtenidos sobre la estabilidad de los colorantes, podemos mencionar que la muestra de Cereza pH 4, 30°C (extracto más estable) es 2.48 veces más estable que el extracto de Mora pH 5, 50 °C (extracto más inestable). Si se compara el valor de 2.48 con el de 29, que es el valor reportado en un trabajo similar de estudio sobre la estabilidad de colorantes naturales, se puede concluir que la diferencia de estabilidad de todos los extractos investigados, a diferente pH y temperatura, es no significativa por lo que todos presentan estabilidades similares entre ellos mismos (9:769).

Acerca de la estabilidad del colorante artificial *Rojo* No.2 a los diferentes valores de pH y temperatura investigados, se determinó que el grado de degradación de este pigmento es menor en comparación con los extractos de los diferentes frutos, esto se pudo observar tanto en el modelo matemático que rige la degradación de los colorantes (lineal para el *Rojo* No.2 y logarítmico para los extractos de los frutos) como en los valores de desviación estándar. Algo interesante de mencionar es que a una misma temperatura (30 °C) y diferente pH (4 y 5) el colorante *Rojo* No.2 presentó casi la misma estabilidad (desviación estándar 0.0301 y 0.0310 respectivamente), decreciendo únicamente al aumentar la temperatura.

La cuantificación de los colorantes presentes en los frutos de Cereza, Mora y Saúco se realizó de dos maneras: La primera determinando la cantidad total de antocianinas, para ello lo primero que se realizó fue la determinación de la identidad de la antocianina que se encuentra en mayor proporción, la cual se identificó como

cianidin-3,5-diglucósido por medio de la revisión bibliográfica y de los valores de longitud de onda de máxima absorbancia de los diferentes extractos analizados, estos resultados concuerdan con la información recabada donde se indica que la más frecuente antocianidina presente en las diferentes plantas corresponde a la cianidina y entre los monosacáridos comunes se encuentra la glucosa. La variación del valor de longitud de onda de máxima absorbancia (2 nm) de la antocianina cianidin-3,5-diglucósido determinada en las muestras analizadas respecto al valor teórico reportado, se debe al efecto de la reacción de co-pigmentación (6:97) (12:3095).

Los resultados de la determinación de la cantidad total de antocianinas revelan que el orden decreciente del contenido de antocianinas presentes en las diferentes muestras es Saúco > Mora > Cereza, indicando que la Mora presenta 2.6 veces más colorantes de los que se pueden extraer de la Cereza y el Saúco 5.8. Los resultados interiores no deben tornarse como definitivos debido a que el contenido total de antocianinas en las plantas varía dependiendo de factores como la variedad, el estado fisiológico del fruto, la posición del fruto en la planta y la aplicación de productos químicos por mencionar algunos. Aunque se determinó que la Cereza presenta la menor cantidad de antocianinas, es importante mencionar que para esta investigación fue utilizado únicamente el pericarpio (cáscaras) de dicho fruto. Este hecho puede generar un impacto económico industrial ya que se puede utilizar la parte interna (endocarpio) del fruto para alguna otra aplicación industrial, como por ejemplo para fabricar jugos naturales y el pericarpio al ser un producto de desecho, puede ser utilizado como fuente de colorantes antociánicos, lo que disminuiría los costos de producción del colorante. Este tipo de procedimiento ha demostrado ser factible para la producción de vinos en los cuales se utilizan los desechos de la uva para la extracción de colorantes antociánicos, constituyendo ésta la principal fuente de antocianinas a nivel mundial (4:72) (3:493).

La segunda forma para realizar la cuantificación de los colorantes fue expresando los resultados en términos de mg del colorante artificial *Rojo* No.2 (Ver anexos No. 11, 12 y 13).

Con respecto a la cantidad de colorantes (mg de *Rojo* No.2) que puede proporcionar cada gramo de fruta se encontró el siguiente orden: Saúco pH 4 > Cereza pH 4 > Cereza pH 5 > Mora pH 5. La información obtenida por este método es de mayor utilidad para cuantificar la cantidad de colorantes que se pueden extraer de las diferentes muestras, debido a que los compara cuantitativamente con el estándar que se desea reemplazar (*Rojo* No.2). Otra ventaja que presenta este método es que se pueden hacer determinaciones a diferente pH.

Las discrepancias respecto a la cantidad de colorantes presentes en los frutos se debe a que se utilizaron diferentes métodos para su determinación, ya que en el primero se determinó la cantidad de antocianinas presentes en las diferentes muestras y en el segundo se determinó la cantidad en mg de colorante artificial *Rojo* No.2 que proporciona un gramo de fruta. Estas discrepancias se deben a las diferentes variables que intervienen en cada uno de los métodos. En el segundo método se toma en consideración diferentes factores, como por ejemplo el pH, en donde interviene también otros compuestos diferentes a las antocianinas como son los co-pigmentos, que modifican tanto la absorbancia como su valor máximo.

Con todo lo anterior puede derivarse que la hipótesis planteada es rechazada, pues no todos los pigmentos presentes en los frutos de Cereza, Mora y Saúco poseen las características para ser usados como sustitutos de los colorantes artificiales *Rojo* No.40, *Rojo* No.3 y *Rojo* No.2, solamente los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de Cereza pH 4 y 5, Mora pH 5 y Saúco pH 4, poseen las características para ser utilizados como alternativas naturales de consumo del colorante artificial *Rojo* No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 4 y 5.

10. CONCLUSIONES

- Los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de *Prunus capuli* Cav. (Cereza), *Rubus urticaefolius* Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis* L. (Sauco) no poseen las características para ser utilizados como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales *Rojo* No.40, *Rojo* No.3 y *Rojo* No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 3, 4 y 5.
- Los pigmentos antociánicos presentes en los frutos de *Prunus capuli*. (Cereza) pH 4 y 5, *Rubus urticaefolius*. (Mora) pH 5 y *Sambucus canadensis*. (Sauco) pH 4, poseen las características para ser utilizados como alternativas naturales de consumo del colorante artificial *Rojo* No.2 en bebidas comprendidas en el rango de pH 4 y 5.
- El orden decreciente del contenido total de antocianinas presentes en las diferentes muestras es Sauco > Mora > Cereza, la Mora presenta 2.6 veces más colorantes de los que se pueden extraer de la Cereza y el Sauco 5.8.
- El orden decreciente de la cantidad de colorantes (rng de *Rojo* No.2) que puede proporcionar cada gramo de fruta es: Sauco pH 4 > Cereza pH 4 > Cereza pH 5 > Mora pH 5.
- El orden de estabilidad de los extractos acuosos provenientes de los diferentes frutos es el siguiente: Cereza (pH 4, 30 °C) > Cereza (pH 5, 30 °C) > Cereza (pH 4, 50 °C) > Cereza (pH 5, 50 °C) > Sauco (pH 4, 30 °C) > Mora (pH 5, 30 °C) > Sauco (pH 4, 50 °C) > Mora (pH 5, 50 °C).
- El orden de estabilidad para el colorante artificial *Rojo* No. 2 es el siguiente: *Rojo* No.2 (pH 4, 30 °C) > *Rojo* No.2 (pH 5, 30 °C) > *Rojo* No.2 (pH 4, 50 °C) > *Rojo* No. 2 (pH 5, 50 °C).

11. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios de estabilidad a las demás muestras, aunque no reportaron el mismo valor de máxima absorbancia en la región visible que los estándares, presentan coloración roja y pueden ser utilizados como colorantes de esta tonalidad.
- Debido a que la principal vía de degradación de las antocianinas es la hidratación, sería conveniente realizar estudios sobre el uso de colorantes antociánicos en solventes diferentes al agua.
- Para que un colorante natural pueda ser utilizado en alimentos, este no debe modificar el sabor ni el aroma del producto terminado, por tal razón se recomienda realizar estudios organolépticos, para determinar cómo los diferentes extractos modifican los factores antes mencionados en productos terminados.
- Realizar la extracción de colorantes antociánicos presentes en las diferentes muestras a nivel planta piloto para determinar la rentabilidad de este método y la eficiencia del proceso, antes de iniciar la extracción de colorantes antociánicos a nivel industrial.
- Evaluar los costos de producción de los colorantes provenientes del fruto de Mora y Saúco y del pericarpio (cáscaras) de cereza, y compararlos con los costos de producción de colorantes obtenidos a partir de las cáscaras de uva, que es la fuente principal de colorantes antociánicos a nivel mundial.
- Estudios demuestran que a menor temperatura y con la adición de azúcares, se retiene por mayor cantidad de tiempo el color de las soluciones que contienen antocianinas. Por lo que se recomienda realizar estudios sobre la estabilidad de los colorantes antocianicos en los productos terminados (bebidas azucaradas, mantenidas en refrigeración y pH ácido) para determinar si es factible el uso de estos en el producto terminado (23:3807)

12. REFERENCIAS

1. GARCIA, M. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. 1era. Edición. México.
2. PSZCZOLA, D. 1998. Natural Colors: Pigments of imagination. Food Technology. 52 (6). EE.UU.
3. FENEMA, O. 1982. Introducción a la Ciencia de Los Alimentos. Editorial Reverté. España.
4. FULEKI, T. and FRANCIS, F.J. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins Extraction and Determination of Total Anthocyanins in cranberries. Journal of Food Science. (33). EE.UU.
5. UGAZ, O. 1997. Colorantes Naturales. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1 era. Edición. Perú.
6. NASH, D. And BIERTERLE, J. 1976. Flora of Guatemala. Published by Field Museum of Natural History. Vol 4. EE.UU.
7. SMITH, M. et al. 2000. Bioactive properties of wild blueberry Fruits. Journal Of Food Science. 65 (2). EE.UU.
8. WEAST, R. 1976. Handbook of Chemistry and Physics. Published by CRC. PRESS. 57th. Edition. EE.UU.

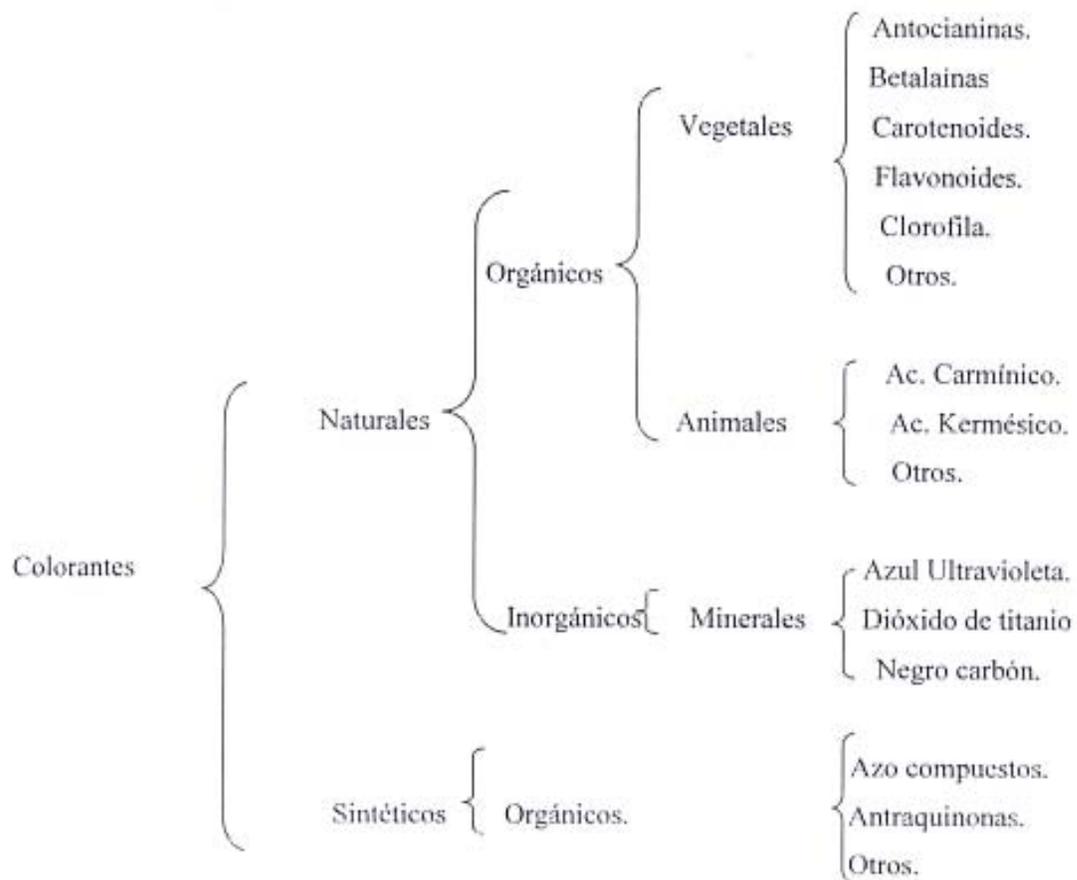
9. ZULIN, S. et. al. 1992. Quantitative Comparison of the Stability of Anthocyanins from Brassica Oleracea and Tradescantia pallida in Non-Sugar Drink Model and Protein Model Systems. Journal of Food Science. 57 (3). EE.UU.
10. BAUBLIS, A. et. al. 1994. Anthocyanin Pigments: Comparison of Extract Stability. Journal Of Food Science. 59(6). EE.UU.
11. HERNÁNDEZ, R. et al. 1991. Metodología de la investigación. Editorial McGraw-Hill. 2da. Edición. México.
12. INAMI, O. et. al. 1996. Stability of Anthocyanins of Sambucus canadensis and Sambucus nigra. J. Agric. Food. Chem. 44 (10). EE.UU.
13. BRONNUM-HANSEN, K. et. al. 1985. Anthocyanin colourants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). Process consideration for production of the liquid extract. Journal of Food Technology. (20). EE.UU.
14. GIUSTI, M. et. al. 1999. Molar Absorptivity and Color Characteristics of Acylated and Non-Acylated Pelargonidin-Based Anthocyanins. Journal Agric. Food Chem. (47). EE.UU.
15. DAVIS, J. and MAZZA, G. 1993. Copigmentation of Simple and Acylated Anthocyanins with Colorless Phenolic Compounds. J. Agric. Food Chem. (41). EE.UU.
16. BROUILLARD, R. And DELAPORTE, B. 1977. Chemistry of Anthocyanin Pigments. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hidration, and Tautomeric Reactions of Malvidin-3-Glucoside. Journal of the American Chemical Society. (2 1). EE.UU.

17. SWEENY, J. et. al. 1981. Effect of flavonoid sulfonates on the photobleaching of Anthocyanins in acid solution. *J. Agric. Food Chem.* (29) EE.UU.
18. MALIEN-AUBERT, C. et. al. 2001. Color Stability of Comercial Anthocyanin-Based Extract in relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra- and Intermolecular Copigmentation. *J. Am. Chem. Soc.* (49). EE.UU.
19. HOSHINO, T. et. al. 1980. The stabilizing effect of the acyl group, on the co-pigmentation of acylated anthocyanins with c-glucosylflavones. *Phytochemistry.* (19). England.
20. UGAZ, O. 1994. *Investigación Fitoquímica.* Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica de] Perú. 2da. Edición. Perú.
21. KUKLINDKI, C. 2000. *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural.* Ediciones Omega S.A. 2da. Edición. España.
22. BROUILLARD, R. et. al. 1989 The Co-pigmentation Reaction of Anthocyanins: A Microprobe for the Structural Study of Aqueous Solutions. *J. Am. Chem. Soc.* (111). EE.UU.
23. TURKEY, N. et. al. 2004. Effect of storage temperature on the stability of anthocyanins of a fermented black carrot (*Daucus carota* var. L.) Beverage: shalgam. (52). EE.UU.

11. ANEXOS.

ANEXO No.1

CLASIFICACION DE LOS COLORANTES.



FUENTE: Tomado de GARCIA, M. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. 1era. Edición. México. pp 482.

ANEXO No.2.

<i><u>COLORANTES CERTIFICADOS PARA ALIMENTOS.</u></i>			
Colorante.	Clasificación.	Coloración.	Usos.
Rojo No.40	Monoazo.	Rojo-amarillento.	A,C,E,F,G,H,J
Amarillo No.5	Pirazolona.	Verde-amarillo.	A,E,F,G,H,J,K,L.
Azul No. 1	Trifenilmetano	Verde-azul.	A,E,F,G,H,J,L.
Azul No.2	Indigoide.	Azul Intenso.	G,H,J,L.
Rojo No.3	Xanteno.	Rosa-azulado.	A,E,H,J,I,
Verde No.3	Trifenilmetano.	Verde azulado.	A,B,F,G,H,L.
Naranja B.	Pirazolona.	Rojo-Amarillo.	D.
A: Gelatinas		G: Bebidas Secas.	
B: Cáscara de naranja.		H: Confitería.	
C: Cerezas confitadas.		I: Dulces.	
D: Salsas.		J: Pan y Cereales.	
E: Helados.		K: Pudines.	
F: Bebidas Carbonatadas.		L Emulsiones (aceite-agua)	

FUENTE: Tomado de GARCIA, M. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. 1era. Edición. México. pp 493.

ANEXO No.3

COLORANTES PERMITIDOS.

1. COLORANTES ORGANICOS NATURALES:

Extracto de tegumento de uva (Antocianinas).
Aceite de zanahoria (Daucus carota)
Achiote, annato (extracto de semillas de Bixa orellana).
Azafrán, (estigmas de Croccus sativus L.)
 β -apo-8 carotenol.
Betabel deshidratado.
O-caroteno.
Caramelo.
Clorofila.
Cochinilla (extracto de Coccus cacti L. o carmín).
Curcuma (polvo o oleorresina de rizoma de Curcuma longa).
Harina de semilla de algodón cocida y tostada (parcialmente desgrasada).
Jugos de frutas.
Jugos de vegetales.
Riboflavina.
Xantofilas, flavoxantina, rubixantina, zeaxantina y los productos naturales aprobados que las contengan.

2. COLORANTES ORGÁNICOS SINTÉTICOS O ARTIFICIALES:

Amarillo No.5. (tartrazina).
Azul No.2 (Indigotina).
Rojo cítrico No.2 (sólo se permite para colorear).
Rojo No.3 (eritrosina).
Rojo No.40
Verde No.3

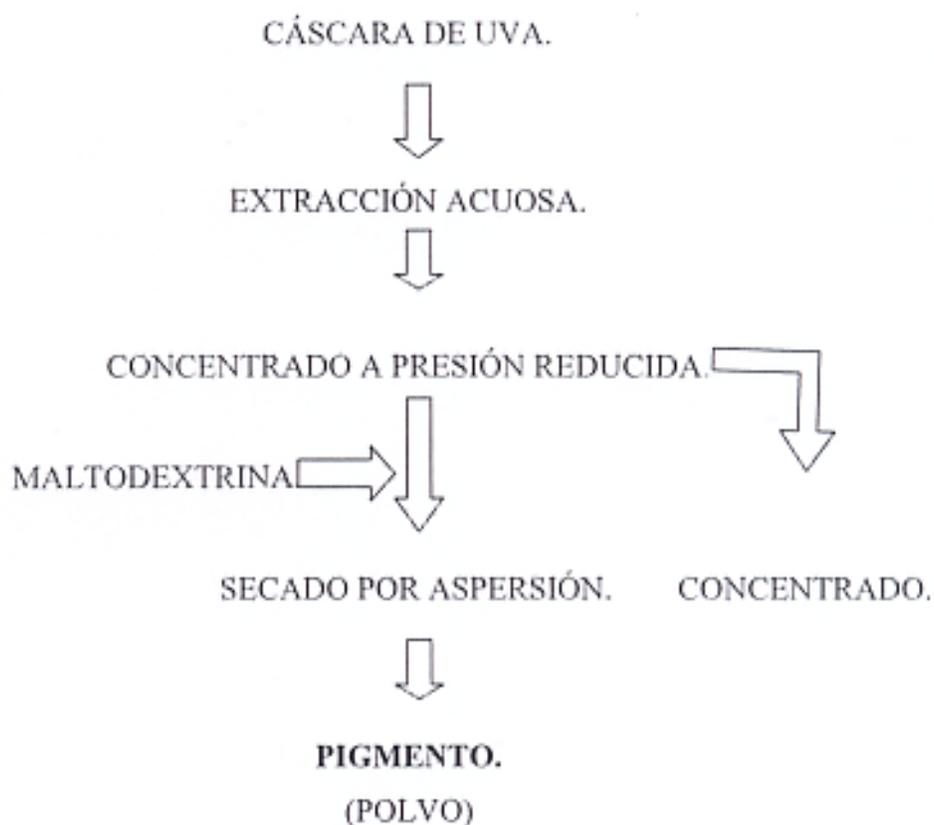
3. COLORANTES MINERALES:

Negro Carbón.
Dióxido de titanio.

FUENTE: Tomado de GARCIA, M. 1993. Biotecnología Alimentaria. Editorial Limusa. 1 era. Edición. México. pp 485.

ANEXO No.4

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A NIVEL INDUSTRIAL.



FUENTE: Tomado de FULEKI, T. y FRANCIS F.J. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in cranberries. Journal Of Food Science. (EE.UU). 33: 77.

ANEXO No.5

COEFICIENTE DE EXTINCIÓN MOLAR DE ALGUNAS ANTOCIANINAS Y ANTOCIANIDINAS.

Pigmento ¹	Peso Molecular ² (g/mol)	Medio	Absorción máxima (nm)	E max. (X10 ⁴)	Referencia
Pelargonidina	324.5	0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	504.5	1.78	Schou (1927)
Pl-3-Gl	486.5	1.0% HCl en H ₂ O	496.0	2.46	Jorgensen (1955)
Cianidina	340.5	0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	510.5	2.46	Schou (1927)
		0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	547.0	3.47	Ribéreau-Gayon (1959)
Cy-3-Ga	502.5	0.1% HCl en CH ₃ OH	530.0	3.43	Siegelman <i>et al</i> (1958)
		0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	535.0	4.49	Sakamura <i>et al</i> (1961)
		0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	535.0	4.62	Zapalis <i>et al</i> (1965)
Cy-3-Ar	472.5	0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	538.0	4.44	Zapalis <i>et al</i> (1965)
Cy-3-RhGl	650.5	1.0% HCl en H ₂ O	512.0	2.82	Jprgensen <i>et al</i> (1955)
Cy-3,5-Gl	664.5	0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	535.0	1.25	Ribéreau-Gayon (1959)
Peonidina	354.5	0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	511.0	3.72	Schou (1927)
		0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	532.0	4.08	Sakamura <i>et al</i> (1961)
Pn-3-Gl	516.5	0.1% HCl en CH ₃ OH	536.0	1.13	Somers (1966)
Pn-3-Ga	516.5	0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	532.0	4.84	Sakamura <i>et al</i> (1961)
		0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	532.0	4.84	Zapalis <i>et al</i> (1965)
Pn-3-Ar	486.5	0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH (85:15)	532.0	4.61	Zapalis <i>et al</i> (1965)
Delfidina	356.5	0.1N HCl en C ₂ H ₅ OH	522.5	3.47	Schou (1927)
		PPhT	547.0	3.24 ³	Spaeth <i>et al</i> (1950)
Dp-3-Gl	518.5	0.1% en CH ₃ OH	543.0	2.90	Asen <i>et al</i> (1959)
Petunidina	370.5	PPhT	549.0	3.46 ³	Sperth <i>et al</i> (1950)
Pt-3-Gl	532.5	0.1% HCl en CH ₃ OH	546.0	1.29	Somers (1966)
Malvidina	400.5	0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	520.0	3.72	Schou (1927)
		0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	557.0	3.62	Ribéreau-Gayon (1959)
		0.1 % HCl en CH ₃ OH	547.0	3.16	Koeppen <i>et al</i> (1966)
		PPhT	551.0	3.71 ³	Spaeth <i>et al</i> (1950)
Mv-3-Gl	562.5	0.1% HCl en CH ₃ OH	546.0	1.39	Somers (1966)
		0.1% HCl en CH ₃ OH	538.0	2.95	Koeppen <i>et al</i> (1966)
Mv-3,5-Gl	724.5	0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	519.0	1.07	Schou (1927)
		0.1% HCl en C ₂ H ₅ OH	545.0	1.03	Ribéreau-Gayon <i>et al</i> (1959)
Mv-3-p-coumaril-Gl	718.5	0.1% HCl en CH ₃ OH	536.0	3.02	Koeppen <i>et al</i> (1966)

¹Pl=Pelargonidina, Cy=Cianidina, Pn=Peonidina, Dp=Delfidina, Pt=Petunidina, Mv=Malvidina, Gl=Glucosido, Ga=Galactosido, Ar=Arabinosido, Rh=Ramosido.

²Las determinaciones fueron llevadas a cabo en medio ácido (HCl), el peso molecular de los cloruros fueron dados y ellos incluyen un molécula de agua de recristalización.

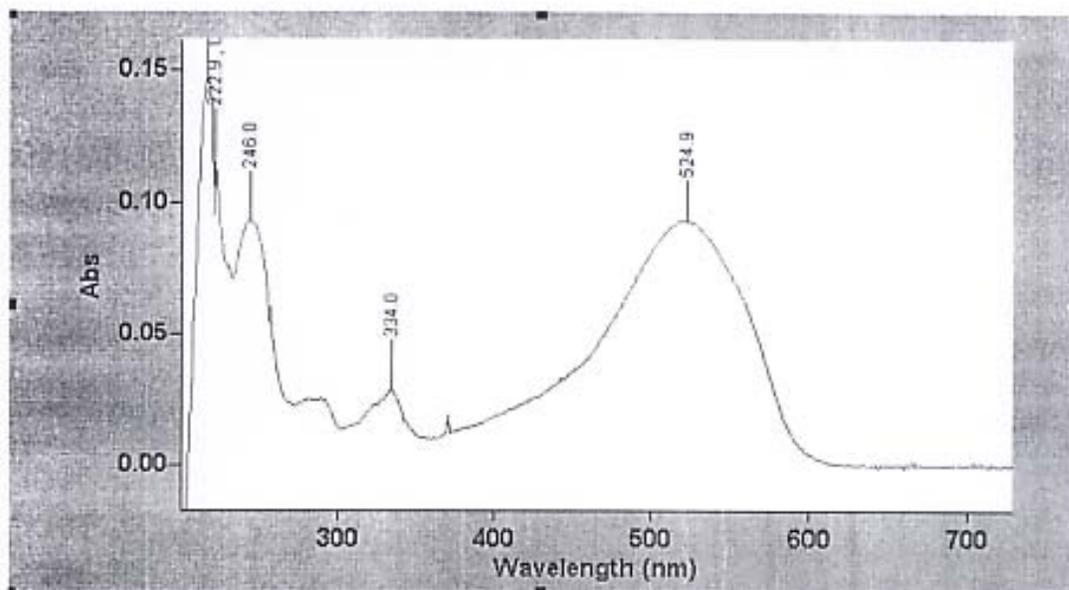
³Los autores usaron como solvente ácido fosforicfenoltolueno (PPhT) 10% y el coeficiente de extinción molar fue determinado a 550 nm en lugar del máximo.

FUENTE: Tomado de FULEKI, T. y FRANCIS F.J. 1968. Quantitative Methods for Anthocyanins. Extraction and Determination of Total Anthocyanin in cranberries. Journal Of Food Science. (EE.UU). pp 73.

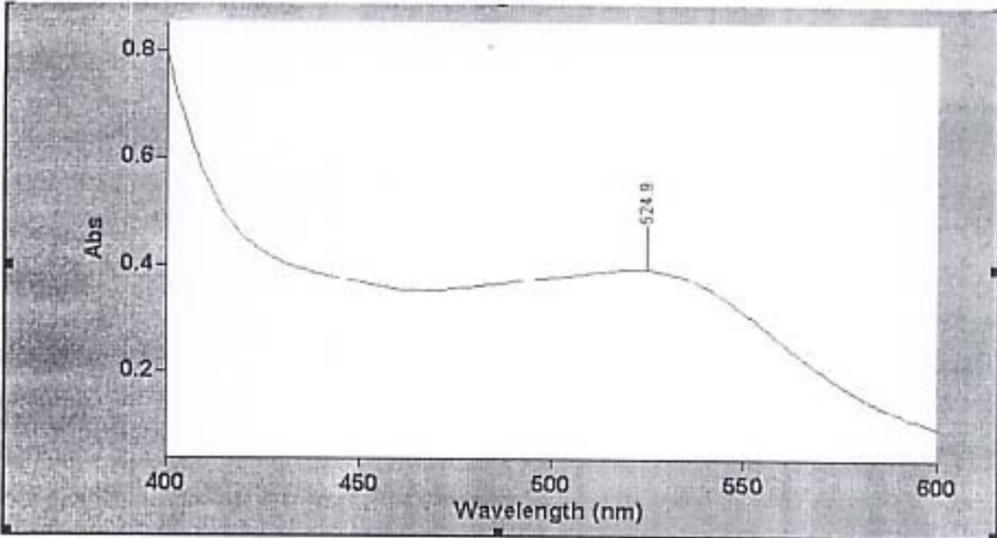
ANEXO No.6

MAXIMO DE ABSORBANCIA DE LAS MUESTRAS,
QUE PUEDEN SER USADAS COMO ALTERNATIVAS NATURALES DE
CONSUMO DEL COLORANTE ARTIFICIAL ROJO No.2, A DIFERENTE pH.

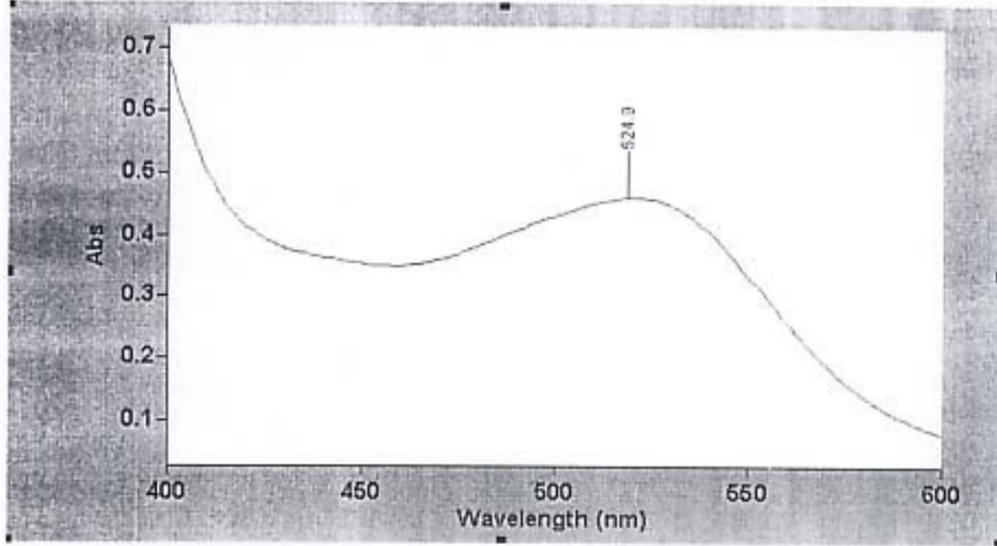
Rojo No.2



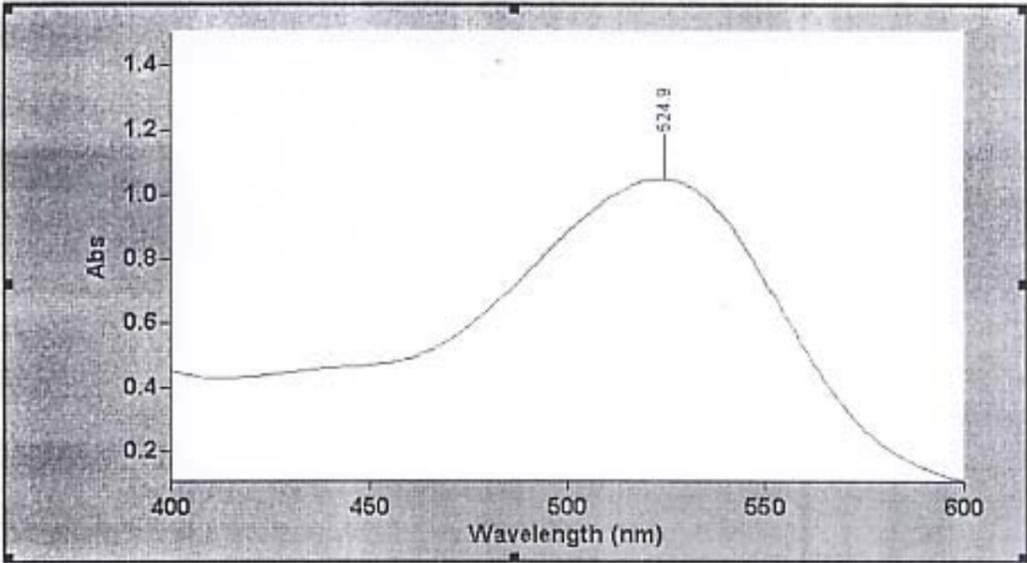
Cereza pH 4



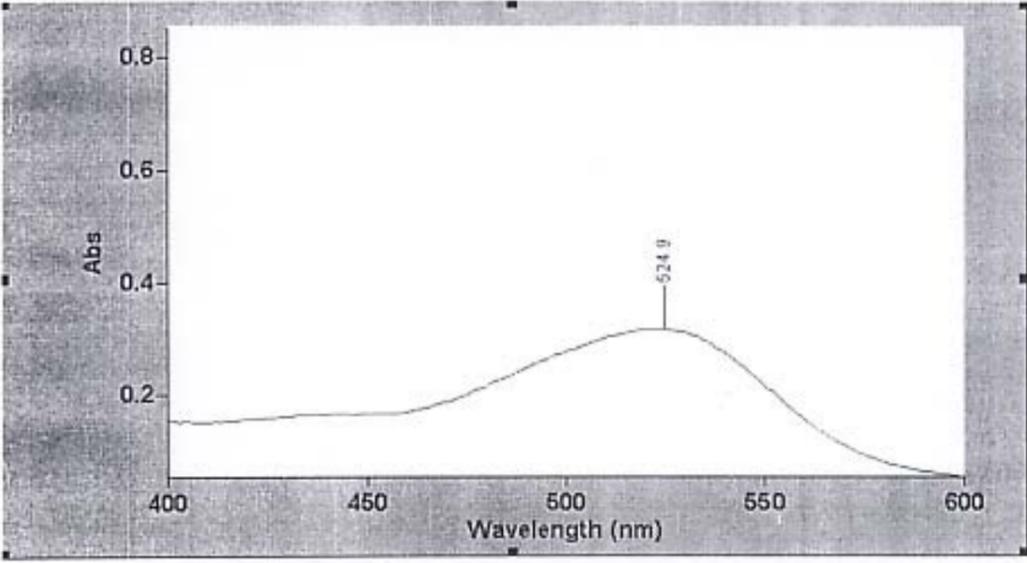
Cereza pH 5



Mora pH 5



Saúco pH 4



ANEXO No. 7

CÁLCULOS PARA DETERMINAR LA ESTABILIDAD DE ANTOCIANINAS
UTILIZANDO ECUACIONES MATEMÁTICAS.

La degradación de los colorantes antociánicos fue monitoreada a través de determinar el cambio de absorbancia respecto al tiempo (días que se realizó el seguimiento) a 524.9 nm como se muestra en las gráficas Absorbancia vrs días de la sección 8.5.

El modelo matemático que mejor encajó fue el logarítmico de la forma $(\Delta b = a * \ln(t) + b)$, donde (Δb) es la Absorbancia, (t) tiempo y (a) y (b) son constantes).

Para poder comparar las diferentes muestras entre sí, se procedió a calcular la primera derivada de cada una de las ecuaciones, así se determinó el cambio de la absorbancia (Δ Absorbancia) respecto al tiempo (Δ Tiempo), es decir la estabilidad que presenta cada extracto.

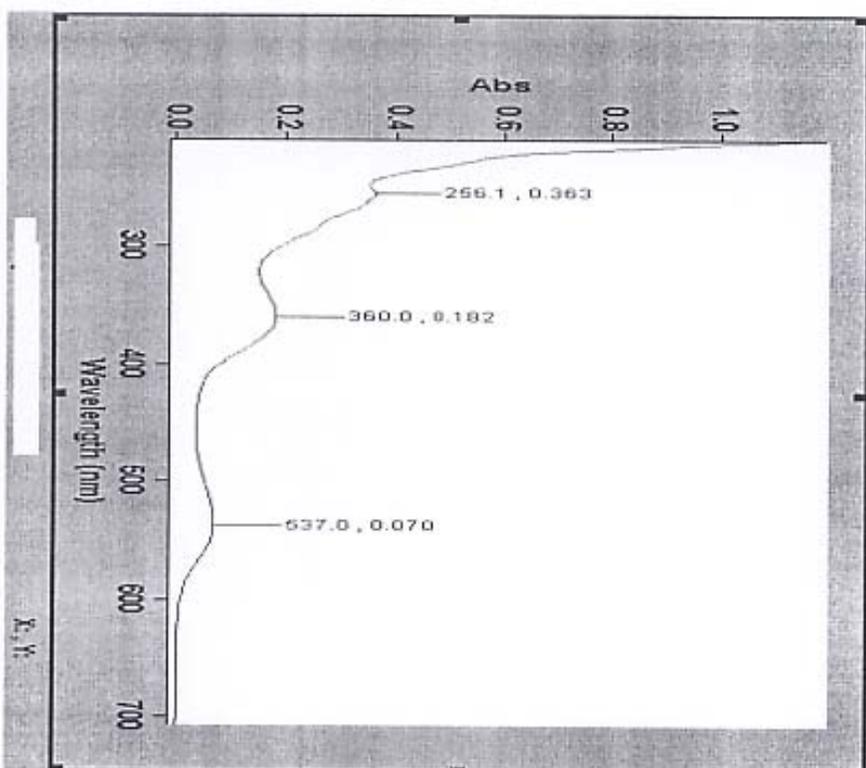
Al dividir d Absorbancia/ d tiempo de dos extractos se puede conocer cuantas veces es más inestable una solución de antocininas respecto a otra, por ejemplo, se presentan los resultados de Cereza pH 4 30 °C y Mora pH 5 50 °C.

fruta	Ecuación	dA/dt	$\frac{dA/dt \text{ (Mora)}}{dA/dt \text{ (Cereza)}}$
Cereza (pH4, 30 °C)	$Abs = -0.0999 \ln(t) + 0.6163$	$-0.0999/t$	2.48
Mora (pH5, 50 °C)	$Abs = -0.2478 \ln(t) + 1.2664$	$-0.2478/t$	

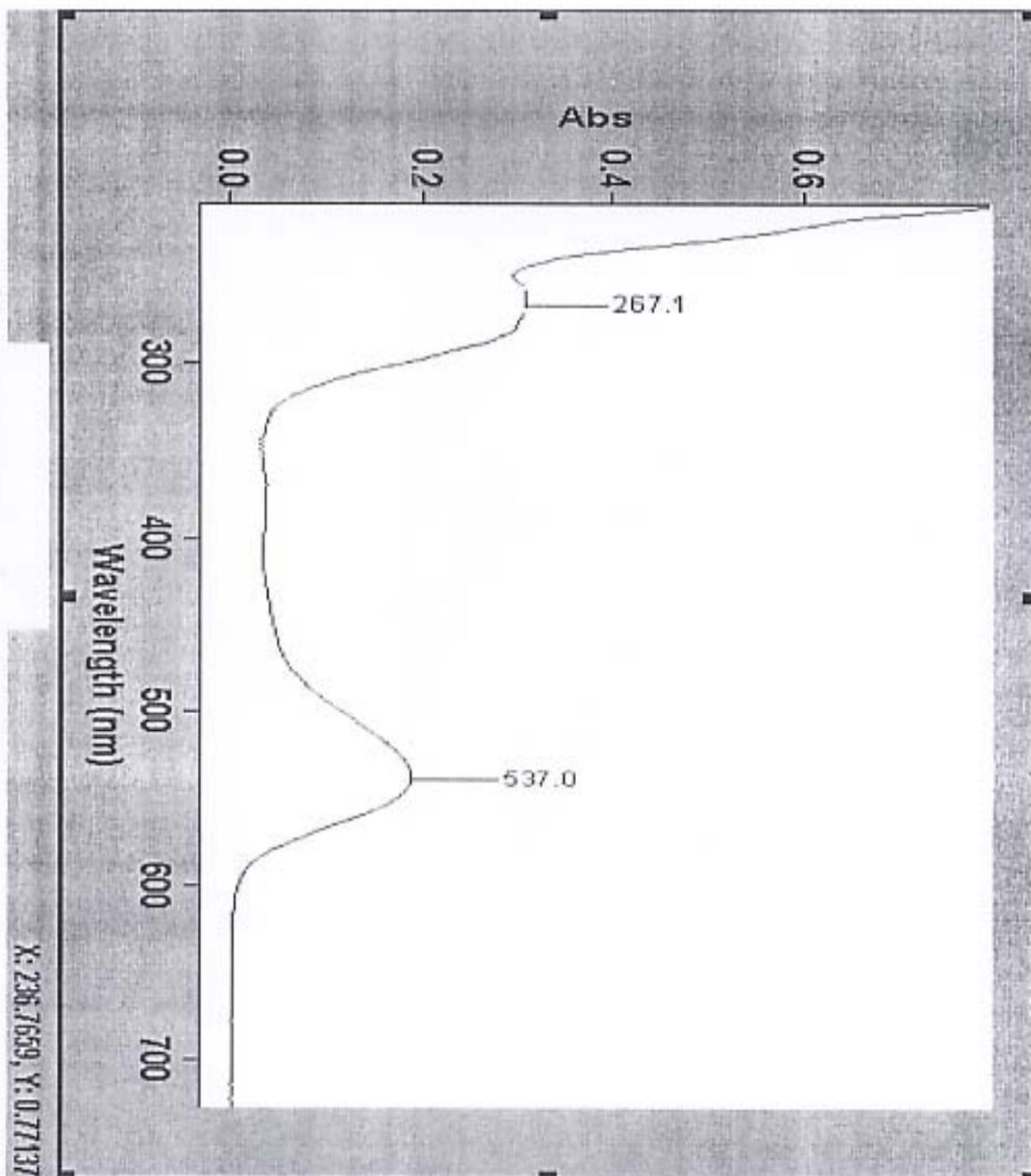
Lo anterior, indica que la proporción de la degradación de la Mora pH 5 y 50 °C es 2.48 veces más rápido que la degradación de la Cereza pH 4 y 30 °C.

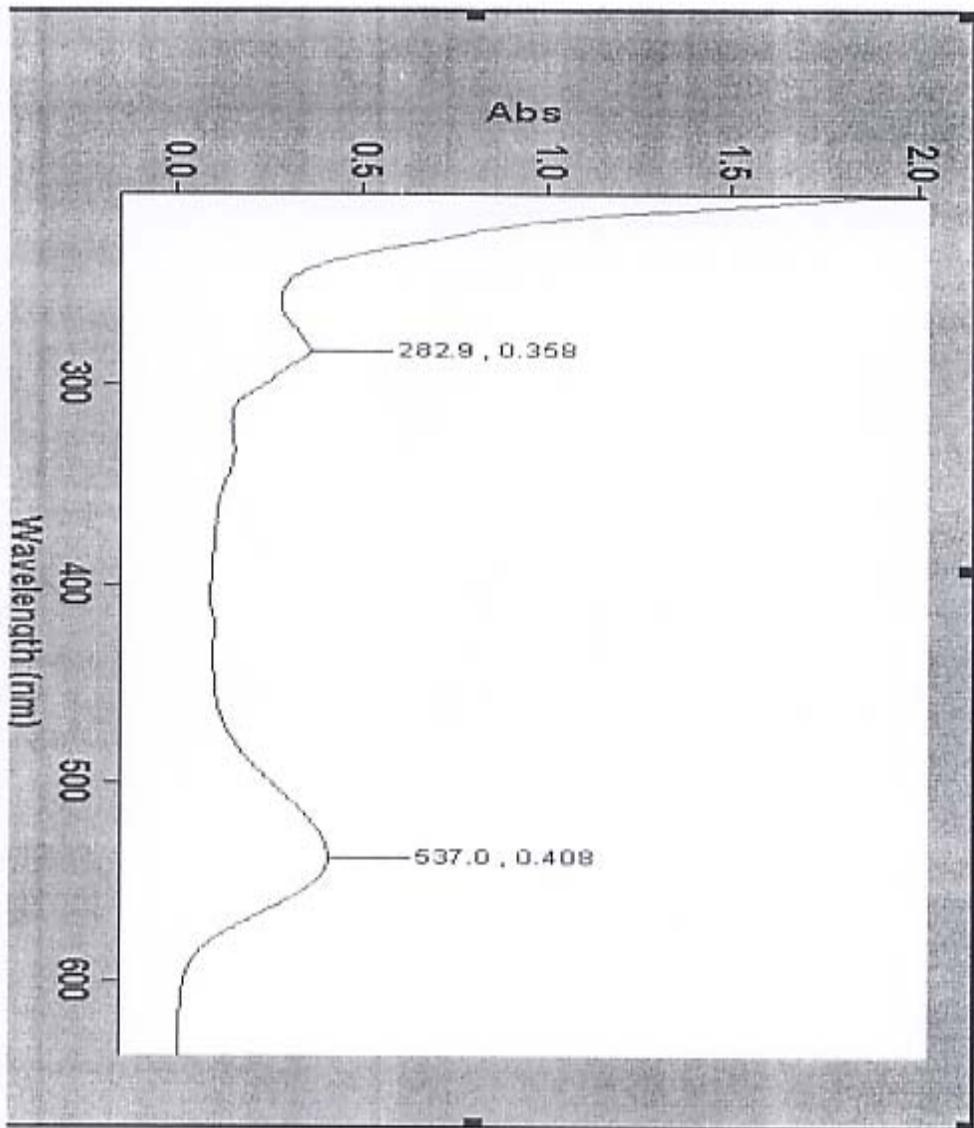
De esta manera se procedió para todas las muestras tomando como referencia que la muestra más inestable fue la proveniente del extracto de Mora pH 5 y 50 °C .

ANEXO No. 8
ESPECTROS DE MÁXIMA ABSORCIÓN EN LA REGIÓN 200-700 nm DE LAS DIFERENTES MUESTRAS.
Espectro No.1 Cereza



Espectro No.2 Miora





Espectro No.3 Saúco

ANEXO No.9

CÁLCULOS PARA REALIZAR LA DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD TOTAL DE ANTOCIANINAS PRESENTES EN LAS DIFERENTES MUESTRAS.

Para determinar el total de antocianinas presentes en las diferentes muestras se utilizó la siguiente formula:

$$T \text{ Acy mg/100 g} = \text{Abs} * \text{VD} * \text{VD/ME} * \text{VTE/CF} * \text{PM/E}$$

Donde: T Acy mg/ 100 g = Total de antocianinas (mg) presentes en las cáscaras del fruto de cereza (100g).

Abs = valor de absorbancia leído en la solución 1 B($\lambda= 537\text{nm}$)

VTE = Volumen final de la solución IA (mL).

VD= Volumen final de la solución 1B (mL), sol. preparada para medir la absorbancia.

ME= Volumen de muestra del extracto que fue diluida en la solución 1 B (mL).

CF = Cantidad de cáscara de cereza utilizada (g).

PM= Peso Molecular de la antocianina presente en el fruto de la cereza.

ϵ = Coeficiente de Extinción molar de la antocianina presente en el fruto de la cereza.

Para calcular el total de antocianinas (mg) presentes en las muestras de mora y saúco (100g) se utilizó la formula anterior remplazando los valores de:

Abs por valor de absorbancia leídos en la soluciones 2B($\lambda=537 \text{ nm}$) y 3B($\lambda=537 \text{ nm}$) respectivamente.

VTE por volumen final de las soluciones 2A y 3A respectivamente.

VD por volumen final de las soluciones 2B y 3B respectivamente.

ME por volumen de muestra del extracto que fue diluida en las soluciones 2B y 3B respectivamente.

CF por la cantidad de fruto utilizado tanto de mora y saúco respectivamente.

PM por peso molecular de la antocianina presente en el fruto de la mora y saúco respectivamente.

ϵ por coeficiente de extinción molar de la antocianina presente en el fruto de la mora y saúco respectivamente.

ANEXO No. 10

ANTOCIANINA PRESENTE EN EL FRUTO DE: CEREZA, MORA Y SAUCO.

Pigmento	Peso Molecular	Medio	Absorción máxima (nm)	ϵ max.
Cianidin-3,5-diglucosido	664.5	0.1N HCL-EtOH (15:85)	535	$1.25 E^{-4}$

(4:73) (12:3095) (14:4634)

ANEXO No. 11

CÁLCULOS PARA REALIZAR LA DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD TOTAL DE ANTOCIANINAS EXPRESADAS EN TÉRMINOS DE EQUIVALENTES DE ROJO No.2

Para determinar la cantidad de antocianinas expresadas en términos de mg de rojo No.2 por gramo de cereza a pH 4 se utilizó la siguiente fórmula:

$$Y = \text{Con} * \text{VD} * \text{VTE} / (\text{ME}_{\text{pH}} * \text{CF})$$

Donde:

Y = mg de *Rojo* No.2/g de fruto de cereza

Conc = concentración (g/L) de Rojo No.2 obtenido al despejar concentración de la ecuación la curva de calibración para el colorante *Rojo* No.2

VD = Volumen final de la solución 1A4 (mL). sol. preparada para medir la absorbancia.

VTE = Volumen final de la solución 1A (mL)

ME_{pH} = Volumen de muestra del extracto 1A que fue diluida en la solución buffer a pH 4, solución 1A4 (mL).

CF = Cantidad de cereza utilizada (g).

Para calcular la cantidad en mg de rojo No.2 por gramo de fruto de mora y saúco se utilizó la formula anterior remplazando los valores de:

Conc por valor de concentración obtenida para las diferentes frutas.

VD por el volumen final de las soluciones en las que se determinó la absorbancia, preparadas a diferente pH según el caso.

VTE por volumen final de las soluciones 2A y 3A respectivamente.

ME_{pH} por volumen de muestra del extracto 2A Y 3A que fue diluida en las soluciones buffer a distintos valores de pH.

ANEXO No. 12

CURVA DE CALIBRACIÓN ROJO No.2

Instrumento utilizado: Espectrofotómetro, UV-Visible Varian Cary 50 Bio.

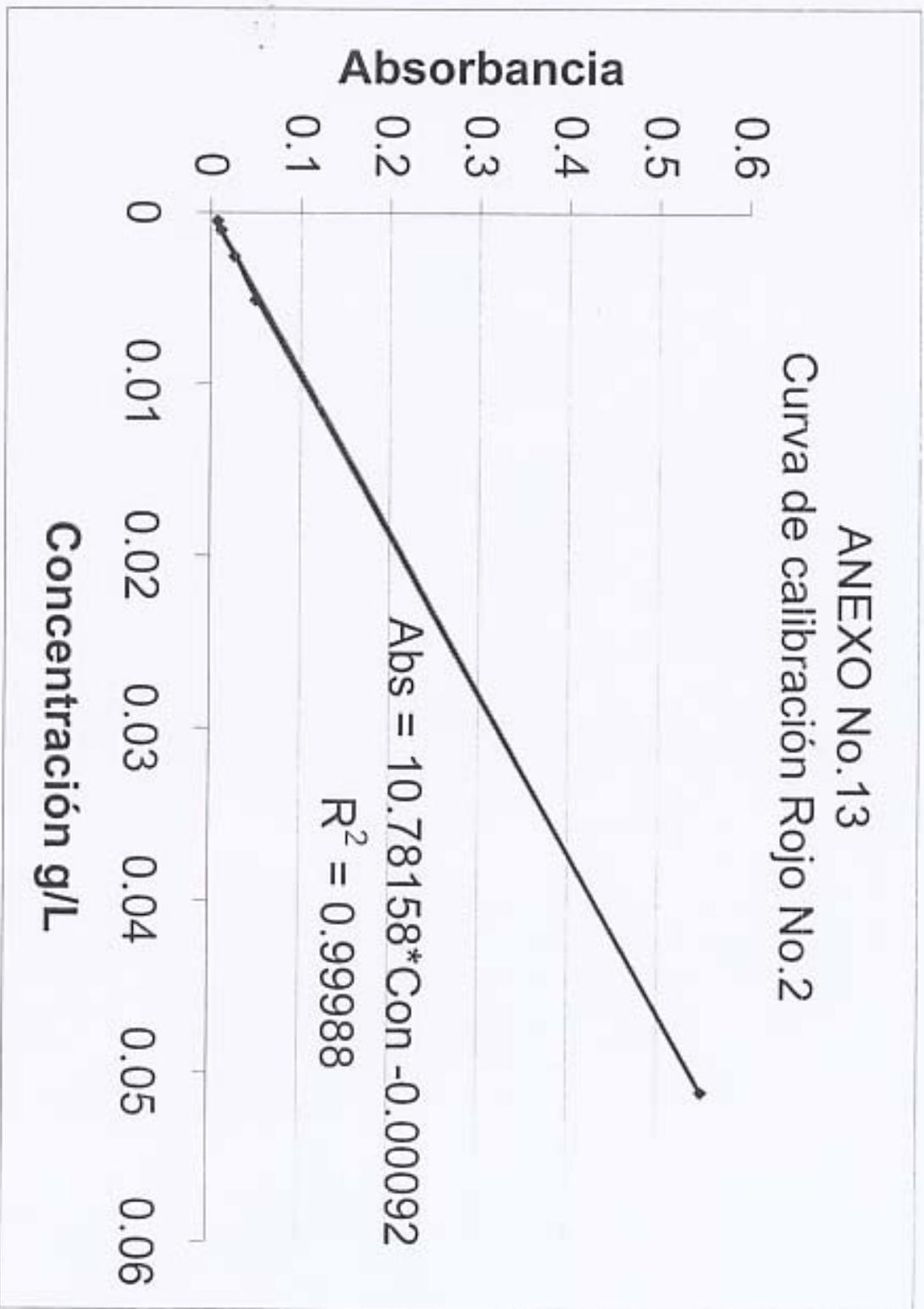
Longitud de onda: 524.9 nm.

Determinación de: Absorbancia.

Tiempo promedio entre cada lectura: 0. 1 segundos.

Replicas: 3

<i>Estándar No.</i>	<i>Concentración g/L.</i>	<i>Lecturas (Abs).</i>	<i>Promedio de lecturas (Abs).</i>	<i>Desviación estándar.</i>
1	0.00051	0.0074	0.0074	0.0000
		0.0074		
		0.0074		
2	0.00102	0.0113	0.0113	0.0000
		0.0113		
		0.0113		
3	0.00255	0.0264	0.0264	0.0000
		0.0264		
		0.0264		
4	0.00510	0.0499	0.0499	0.0000
		0.0499		
		0.0499		
5	0.05100	0.5494	0.5493	0.0001
		0.5493		
		0.5492		





Walter Fuentes Miranda,
Autor.



Ph. D. Oscar Manuel Cobar Pinto,
Asesor.



Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto,
Director de Escuela.



Ms. Sc. Gerardo Arroyo Catalán,
Decano.