

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## **1.1 Antecedentes**

El término colorantes naturales se aplica a aquellos productos alimenticios de origen animal, vegetal o incluso mineral en los cuales se encuentran pigmentos de forma también natural. A la vez se consideran naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos, como algunos insectos e incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo. En este sentido y aunque pudieran tener composición y potencial de tinción idénticos, se contraponen a los artificiales que son los obtenidos por síntesis química. Por tanto, los colorantes naturales son pigmentos coloreados obtenidos de materia prima principalmente de origen animal y vegetal, aunque también puede ser de origen mineral. (Membreño, 2006).

El color de un alimento es una de las características de calidad que el consumidor primero percibe y que más influye en la elección del mismo. En la actualidad colorear los alimentos es una práctica común, ya sea para resaltar, recuperar o uniformar su color original o simplemente para hacerlos más atractivos. (Ortega, 2004).

Las Antocianinas fueron conocidas durante siglos como el color de la savia de las células, en 1835 Ludwig Marquart propuso el término Antocianina derivado de las palabras griegas: Antho que significa flor y Kyanos que significa azul oscuro (Xiaonan Sui, 2017).

Las antocianinas forman uno de los seis grupos de flavonoides existentes. Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, esto es: compuestos que la planta elabora, pero no son vitales, pues en su ausencia el organismo puede continuar viviendo. Las antocianinas son verdaderos colorantes naturales, ya que son pigmentos hidrosolubles. Son los responsables de los colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas y fresas. Las funciones de las antocianinas en las plantas son múltiples, y van desde la protección de la radiación solar hasta la de atraer insectos polinizadores. La estabilidad de las antocianinas está condicionada por una serie de factores como el potencial redox, temperatura, el pH del medio, la interacción con otros radicales y moléculas, entre otros. Se ha estudiado que el cambio de un pH ácido (mayor estabilidad) hacia otro alcalino hace variar de color hacia el rojo (efecto

batocrómico) dando compuestos inestables que se decoloran rápidamente. También las antocianinas son afectadas por la temperatura, produciéndose cambios en su estructura molecular (pérdida del glicósido) que resulta en una pérdida del color. (indumentaria(CIAI))

En la antigüedad los colorantes naturales eran muy utilizados, como en las civilizaciones precolombinas, américa latina, o los antiguos egipcios, los cuales sentaron bases desde el uso en la tinción textil, alimentos y cosméticos. Mucho tiempo después sus propiedades se ampliaron a la tinción de productos farmacéuticos. (Castillo y Ramírez; 2006).

Durante muchos años los productos, sobre todo los alimenticios fueron elaborados con la presencia de colorantes sintéticos, que en determinado tiempo llegan a ser nocivos para la salud, como es bien sabido hoy en día se hace imperiosa la necesidad de mejora y proteger la calidad de vida de las personas y uno de los factores determinados de esta cuestión es la alimentación, en la cual se ven involucrados los colorantes que las personas consumen en su dieta diaria ya sea en pequeñas o en grandes cantidades por lo que se plantean como una mejor opción los del tipo natural, en este caso, a partir de la mora impidiendo así provocar enfermedades graves que pueden ser ocasionadas por los colorantes sintéticos.

En Bolivia, no existen industrias ni empresas dedicadas a la producción y comercialización de Extracto de Antocianinas.

Las fuentes naturales de Antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales, frutas, cereales de color rojo hasta azul morado, como es el caso de los pigmentos rojos en rábanos, cebollas rojas, cerezas, frambuesas, Arándanos, uvas entre otros. (Castañeda & Beltrán, 2015).

**Tabla I- 1 Contenido de Antocianinas en Fuentes Naturales**

<b>Fuente de antocianinas</b>	<b>Contenido de Antocianinas (mg/100g)</b>
Cebolla roja	23,3-48,5
Fresa	19-55
Arándano rojo	67-140
Mora	82,5 -325,9
Arándano( <i>vaccinium myrtillus L</i> )	300-1017
Arándano( <i>vaccinium carymbasum L</i> )	61,8-438
Maíz rojo	1642
Baya de sauco	664-1.816

**Fuente:** Pascual Teresa, 2010.

## **1.2 Usos y aplicaciones del colorante natural**

El colorante natural de mora es un producto novedoso y con atractivas propiedades nutricionales, que puede ser usado como ingrediente en la elaboración de diferentes alimentos funcionales. El colorante natural de mora puede ser utilizado para la preparación de distintos alimentos de panadería o como colorante para alimentos cárnicos, lácteos, dulces, caramelos, gelatinas, helados, bebidas alcohólicas y no alcohólicas, así también en productos farmacéuticos y cosméticos.

Aporta gran riqueza en Polifenoles antioxidantes que posee la mora. Estos flavonoides retardan el envejecimiento, neutralizan los reactivos radicales libres, mejoran la circulación sanguínea, fortalecen los capilares, previenen afecciones cardíacas al evitar la formación de coágulos, reducen el daño de la fibromialgia, protegen del cáncer, mejoran afecciones de piel (soriasis, eccemas), detienen la degeneración muscular y mejoran la vista.

La antocianina ha demostrado ser eficaz en la prevención y tratamiento de enfermedades no transmisibles como la hipertensión arterial, hipercolesterolemia e incluso el cáncer, así lo demostró el doctor Jorge Arrollo en su estudio de “Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado (*zeaMays L.*) en ratas” el cual tuvo una reducción de la presión arterial media en un 20.1% y “Reducción del colesterol. (Sauñi, 2014).

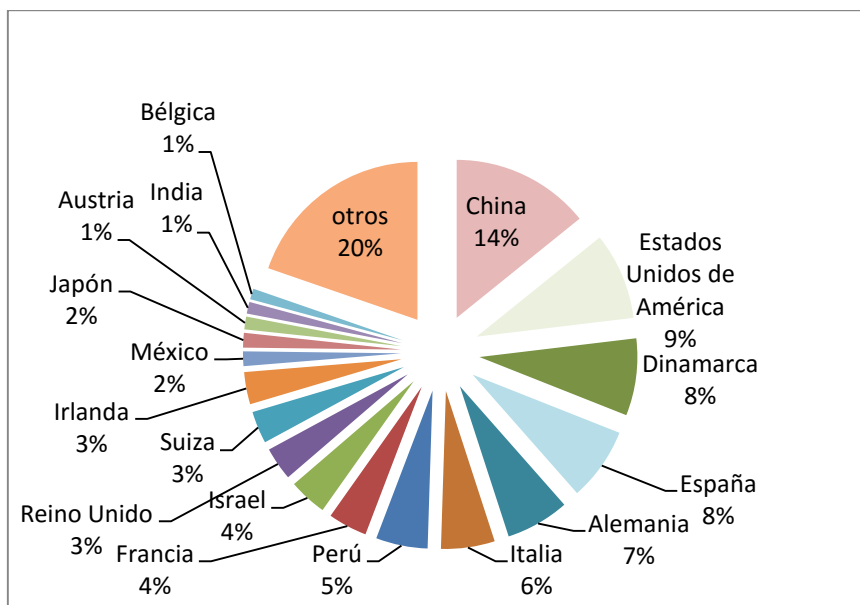
### **1.3 Aspectos del Mercado**

#### **1.3.1 Oferta de colorantes naturales**

En el 2016 las exportaciones totales a nivel mundial de materias colorantes de origen vegetal o animal fueron de 9 741 toneladas, lo que representó un crecimiento de 8,8 % respecto al 2015. Las mayores exportaciones se sustentan en la mayor demanda internacional por utilizar colorantes naturales en lugar de los colorantes sintéticos, debido a que los primeros ayudan conservar de mejor forma la salud de las personas.

Los principales países exportadores de colorante natural son China y Estados Unidos, con una participación de 14% y 9 % respectivamente.

**Figura 1- 1 Oferta de colorantes naturales**



**Fuente:** (TRADE-MAP, 2018)

Para este producto de origen vegetal o animal, China y Estados Unidos son los principales exportadores, con una participación de 14% y 9 % respectivamente, seguido de Dinamarca y España con el 8% de participación en las importaciones a nivel mundial.

### 1.3.2 Demanda de colorantes naturales

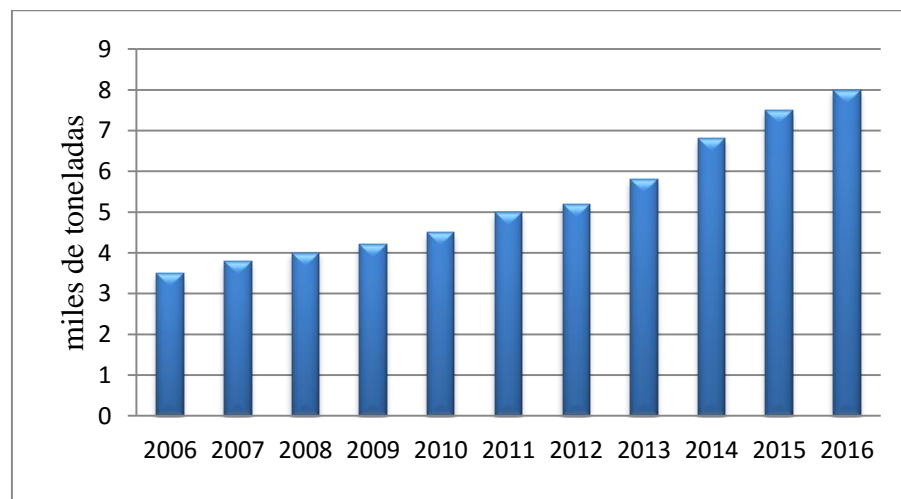
El segmento objetivo para la comercialización del producto son industrias alimenticias y aquellas que son proveedoras de los aditivos para comercializar los productos finales en el departamento de Tarija y el resto del país.

A nivel mundial hay una tendencia a cambiar los hábitos de alimentación, mediante el consumo de productos sanos y saludables, esto hace que los consumidores presten mayor atención a los componentes de lo que adquieren. En ese sentido, debido a que los colorantes que se utilizan para la elaboración de algunos alimentos (en muchos casos sintéticos), como gaseosas, jugos, caramelos, embutidos, etc., han sido asociados a déficit atencional en niños, alergias y/o efectos cancerígenos.

Debido a esto, se ha generado una creciente demanda por adquirir colorantes naturales frente a los sintéticos. Es así que ya existen regulaciones en algunos países se impide el uso de ciertos colorantes sintéticos. Por ejemplo, Allura Red AC (16035) se está prohibido en muchos países europeos. Otro ejemplo, es la prohibición del uso de Tartrazina, que da color amarillo en Austria, Finlandia y Noruega.

Los principales compradores de colorantes naturales son los mercados europeos, EE.UU. y Japón; sin embargo, se espera que el crecimiento en la demanda de estos productos durante los próximos años, se dé por el aumento del consumo de alimentos procesados y congelados, en las regiones de Asia Pacífico y América Latina (Mercados, 2016)

**Figura 1- 2 Consumo Global de colorantes naturales**



**Fuente:** (Analytics, 2016)

### 1.3.2 Precios de Antocianinas

la tabla I-2, que muestran los precios en Euros de la cantidad respectiva de Antocianinas.

**Tabla I- 2 Precios de Antocianinas**

<b>Empresa</b>	<b>procedencia</b>	<b>cantidad (Kg)</b>	<b>precio en euros</b>
Andicol	España	1	2500
Astek S.A.	Colombia	1	2600
Colsabor S.A.S	Colombia	0,25	600
Concentrados las delicias S.A.S	Colombia	0,5	1100
Totalquimicos SM Ltda	Perú	1	3800
Productos el rriero Cia-Ltda	Colombia	0,25	1100

Fuente (Cruz, 2019)

La marca GNC “General Nutrition Coporation” procedente de Estados Unidos es quien suministra Extracto de Antocianinas al Mercado Nacional.

El precio es de 165 Bs por 100 cápsulas de 500mg, es decir 165 Bs los 50 gr de antocianinas en polvo.



### Fotografía I- 1 Antocianinas



**Fuente:** Elaboración propia 2020

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

Obtener (a nivel experimental) colorante natural (Antocianinas) de Mora (*Robus Ulmifolius*) cultivada en el departamento de Tarija.

### 1.4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la materia prima: Mora (*Robus Ulmifolius*) cultivada en el departamento de Tarija para la obtención experimental de colorante natural (Antocianina).
- Diseñar y ejecutar la fase experimental para la obtención de colorante natural (Antocianinas) de Mora (*Robus Ulmifolius*).
- Elaborar el balance de materia y energía para la extracción de colorante natural de mora.

- Determinar el rendimiento del proceso de obtención experimental de colorante natural (Antocianinas) de Mora (*Robus Ulmifolius*) cultivada en el departamento de Tarija.
- Caracterizar el producto obtenido: colorante natural (Antocianinas) de Mora (*Robus Ulmifolius*).

## **1.5 Justificación**

### **1.5.1 Justificación Económica**

Existe un mercado potencial de colorantes naturales y sintéticos en el país, que es abastecido en su totalidad con producto importado, ya que en la actualidad, no existe producción nacional, y no existe estudios de obtención de colorante natural a partir de la mora en el departamento de Tarija, motivo por el cual se podría estudiar esta posibilidad para una futura industrialización, debido a la disponibilidad de materia prima, como los otros insumos requeridos, en cantidad y costo están disponibles dentro de la región y de esta manera reemplazar los colorantes sintéticos por los naturales, según TRADE MAP (Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresas), en el año 2019 Bolivia importó aproximadamente 60 toneladas de colorantes naturales.

### **1.5.2 Justificación Tecnológica**

El proceso y la tecnología para la extracción de colorantes naturales de origen animal o vegetal, están desarrolladas, pero no se conocen o aplican a gran escala.

No existen industrias dedicadas a la elaboración de colorantes naturales en el departamento de Tarija y en el resto del país.

Los equipos necesarios para la extracción de colorante natural son relativamente sencillos y accesibles, por lo tanto, no tiene limitaciones y no demanda gran inversión.

### **1.5.3 Justificación Social**

El presente trabajo tiene como fin dar un nuevo uso a la mora, y de esa manera fomentar la producción de la misma en Bolivia, promoviendo el trabajo de agricultores, industrias, comerciantes y público en general, mejorando así la calidad de vida de las personas, generando otras fuentes de ingresos, y de este modo apoyar a la economía de Bolivia aprovechando los recursos para generar nuevos productos en la industria alimenticia.

### **1.5.4 Justificación Ambiental**

Los métodos de extracción del colorante natural, no son sustancialmente contaminantes para el medio ambiente, ya que por un lado no se utilizan reactivos dañinos para su producción y con respecto a la población, ésta no será sometida a ningún aspecto de contaminación.

En los próximos años habrá una reducción considerable del uso de los colorantes sintéticos, debido a que algunos de ellos presentan efectos nocivos para la salud, en su reemplazo, aparece un notable interés por el uso de los colorantes naturales, que hasta ahora no requieren certificación alguna para su empleo.

**CAPÍTULO II**  
**MARCO TEÓRICO**

## **2.1 Caracterización de la materia prima**

### **2.1.1 Descripción Botánica de la Mora**

La zarzamora es un arbusto sarmentoso trepador, original de Europa (Países Bajos e Italia) a África del Norte puede llegar a alcanzar tres metros de altura, más ancho que alto pues cada año produce unos vástagos muy largos de color violeta, espinosos, acanalados, cubiertos de una cera blanca-azulada que enraízan en otoño. Las hojas son compuestas de 3-5 folíolos en forma palmeada, un poco correosas y pubescentes por el envés. Tienen el margen aserrado con forma ovada u obovada a veces moteada de rojo. Sus flores son blancas o rosadas, dispuestas en panículas, con 5 sépalos y 5 pétalos redondeados. El fruto es múltiple de color rojo al principio y negro al madurar, formado de pequeñas drupas apelotonadas formando una polidrupa, maduran entre junio y septiembre.

Las moras ofrecen unas propiedades nutricionales enormes. Son extremadamente ricas en antocianinas, unos pigmentos vegetales que presentan un color rojizo, con enormes propiedades antioxidantes que protegen la vista y los capilares de una excelente manera. El hecho de consumir estos frutos, podría ayudarnos a mejorar nuestro nivel de visión y nuestra circulación. (Anónimo, 2015)

#### **2.1.1.1 Rubus ulmifolius**

Es una especie de arbusto aculeado de la familia de las rosáceas y es popularmente conocido por sus frutos comestibles. Conocida comúnmente por la zarzamora, zarza o mora. Original de Europa (Países Bajos e Italia) a África del Norte puede llegar a alcanzar tres metros de altura (Anónimo, 2015)

**Tabla II- 1 Clasificación taxonómica de la mora**

<b>Nombre Científico:</b>	<i>Rubus ulmifolius</i>
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Ranunculidae
<b>Orden:</b>	Rosales
<b>Familia:</b>	Rosaceae
<b>Género:</b>	Rubus
<b>Especie:</b>	R. ulmifolius

**Fuente:** (Anónimo, 2015)

**Tabla II- 2 Características Organolépticas de la Mora**

<b>Requisitos</b>	<b>Descripción</b>
Color	Negro intenso
Olor	Característico del fruto fresco
Sabor	Agridulce
Aspecto	Frutas en su mayoría de tamaño regular

**Fuente:** (CIPLANE, 2008)

### 2.1.2 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

La mora es un fruto polidrupa, esto quiere decir que se encuentra formada por varias drupas en forma de racimo; se puede hacer la comparación de una mora y un racimo de uvas a gran escala, dentro de cada drupa se encuentra una semilla que algunas veces cuando se la consume resulta incómoda. (villarruel, 2014)

Su peso es de 3gramos a 5 gramos, su consistencia es dura y su sabor es agridulce cuando es tierna y cuando es muy madura tiende a ser más dulce, la mora está compuesta más o menos de 100 a 120 semillas. La mora es una fruta perecedera, por lo que la cosecha se la realiza antes de que ésta llegue a la total maduración, es decir

cuando el fruto presenta una coloración rojo escarlata, para así evitar su deterioro.  
(villarruel, 2014)

**Figura 2- 1 Fruto de mora**



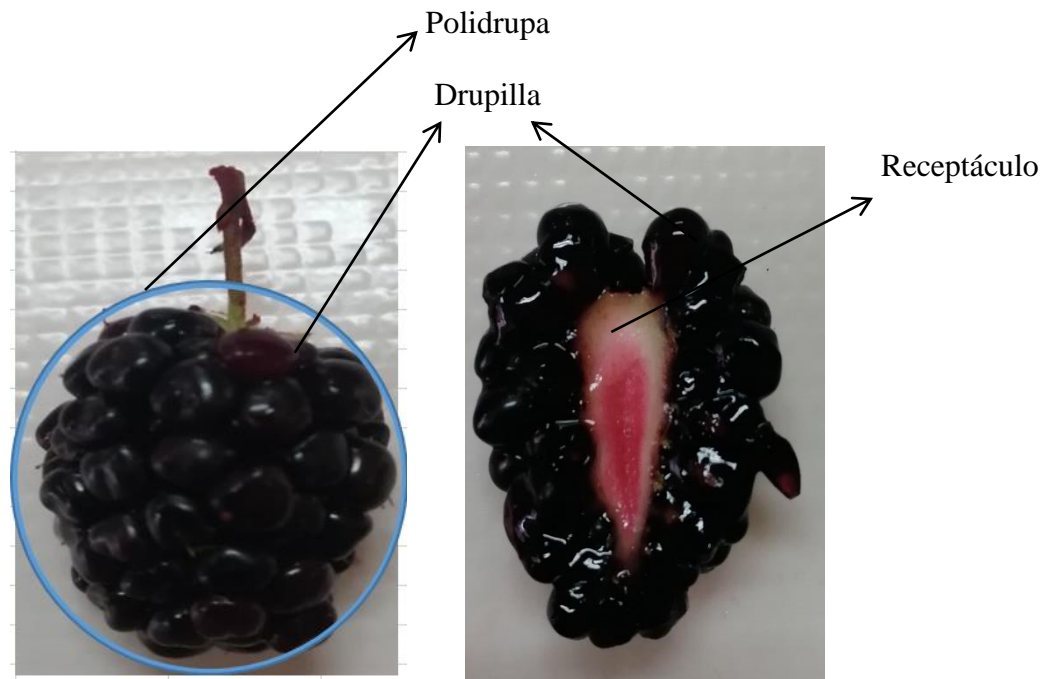
**Fuente:** (moreu, 2014)

**Tabla II- 3 Composición Química de la mora**

<b>Nutrientes</b>	<b>Valor (%)</b>
Humedad	85.2
Proteínas	1.1
Grasas	1.1
Carbohidratos	9.7
Celulosa	2.5
Minerales	0.4

**Fuente:** (Anónimo, 2015)

**Fotografía 2- 1 Anatomía de la mora**



**Fuente:** Elaboración propia 2020

### **2.1.3 Propiedades de la mora**

Como casi todas las bayas y frutos del bosque, las moras son muy beneficiosas para la salud. Tienen pocas calorías debido a su pobre aporte de hidratos de carbono, pero están cargadas de vitaminas y algunos minerales. Poseen buenas cantidades de vitamina C, vitamina E y fibra soluble e insoluble. Además, contienen buenas dosis de potasio, hierro y calcio, aunque son menos aprovechables que los procedentes de origen animal.

Pero si algo distingue a los frutos rojos de otro tipo de frutas, es la fuerte acción antioxidante. Su color intenso nos indica la alta cantidad de pigmentos naturales, antocianinas y carotenoides, que combaten la acción de los radicales libres que son negativos para la salud. Así, las moras poseen acciones antiinflamatorias, antibacterianas y contribuyen al buen funcionamiento del sistema inmunológico. (FUCHS, 2012)



### 2.1.4 Disponibilidad Regional de Mora

La especie cultivada en el valle central de Tarija es la *Rubus Ulmifolius* (zarzamora negra), perteneciente a la familia rosáceas.

El rendimiento de la mora en el año 2013 alcanzó 9,2 hectáreas de superficie cultivada, tal como se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla II- 4 Superficie cultivada de Mora**

<b>Provincia</b>	<b>Localidad</b>	<b>Superficie cultivada (ha)</b>
Cercado	Turumayo, Erquiz, La victoria,	3,1
Méndez	San Lorenzo	2,3
O Connor	Entre Ríos	2
Aniceto Arce	Padcaya	1.8
<b>Total</b>		<b>9,2</b>

**Fuente:** (INE, 2013)

La producción que se obtiene por hectárea cultivada de Mora.

La cosecha de Mora se lo realiza entre los meses de noviembre a marzo.

### 2.2 Definición de Colorante

El término colorantes naturales se aplica a aquellos productos alimenticios de origen animal, vegetal o incluso mineral en los cuales se encuentra de forma también natural. A la vez se consideran naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos, como algunos insectos e incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo. En este sentido y aunque pudieran tener composición y potencial de tinción idénticos, se contraponen a los artificiales que son los obtenidos por síntesis química. Por tanto, un colorante natural es un pigmento coloreado obtenido de materia prima principalmente de origen animal y vegetal, aunque también puede ser de origen mineral. (Membreño, 2006).

El color de un alimento es una de las características de calidad que el consumidor primero percibe y que más influye en la elección del mismo. En la actualidad colorear los alimentos es una práctica común, ya sea para resaltar, recuperar o uniformar su color original o simplemente para hacerlos más atractivos. (Ortega, 2004).

### **2.3 Clasificación de los Principales Colorantes Naturales**

Los colorantes naturales vegetales se pueden agrupar en seis familias, que son:

#### **2.3.1 Carotenoides**

Los carotenoides son estructuras isoprenoides, presentes en colorantes y pigmentos naturales en plantas superiores, algas, hongos y bacterias. Las estructuras químicas básicas de estos compuestos poseen dobles enlaces insaturados y la mayoría son tetraterpenos con 40 átomos de carbono. A los carotenoides que poseen átomos de oxígeno en sus moléculas se los conoce como xantofilas. Los restantes constituyen el grupo de los carotenos. Los colorantes y pigmentos de este grupo presentan una paleta de colores que varía desde amarillo pálido, pasando por anaranjado, hasta rojo oscuro. Ejemplos de ello son el licopeno (color rojo del tomate y la sandía) y el beta caroteno (color anaranjado de la zanahoria). (indumentaria(CIAI))

#### **2.3.2 Anticánónicos**

Las antocianinas forman uno de los seis grupos de flavonoides existentes. Los flavonoides son metabolitos secundarios de las plantas, esto es: compuestos que la planta elabora, pero no son vitales, pues en su ausencia el organismo puede continuar viviendo. Las antocianinas son verdaderos colorantes naturales, ya que son pigmentos hidrosolubles. Son responsables de los colores rojo, anaranjado, azul y púrpura de las uvas, manzanas y fresas. Las funciones de las antocianinas en las plantas son múltiples, y van desde la protección de la radiación solar hasta la de atraer insectos polinizadores. La estabilidad de las antocianinas está condicionada por una serie de factores como el potencial redox, temperatura, el pH del medio, la interacción con otros radicales y moléculas, entre otros. Se ha estudiado que el cambio de un pH ácido (mayor estabilidad) hacia otro alcalino hace variar de color hacia el rojo (efecto batocrómico)

dando compuestos inestables que se decoloran rápidamente. También las antocianinas son afectadas por la temperatura, produciéndose cambios en su estructura molecular (pérdida del glicósido) que resulta en una pérdida del color. (indumentaria(CIAI))

### **2.3.3 Flavonoides**

Los flavonoides en general se caracterizan por ser polifenoles solubles en agua, algunos con una estructura de glucósidos (azúcares) y otros de polímeros naturales.

A estos últimos pertenecen los taninos condensados, polímeros naturales formados por monómeros de antocianidina, presentes en semillas y tejidos vegetativos de ciertas forrajeras. Otro grupo de flavonoides importantes son las flavonas, colorantes amarillos presentes en pétalos de flores como la primula, o en la piel de frutos como las uvas, responsables del color amarillento de los vinos blancos. (indumentaria(CIAI)).

### **2.3.4 Betaláinicos**

Las betalainas son colorantes naturales constituidos por aproximadamente 70 pigmentos hidrosolubles con estructura de glucósidos y que se han clasificado en dos grupos importantes: las betacianinas y las betaxantinas. Las betacianinas son unos cincuenta colorantes naturales identificados de color rojo o violeta que se encuentran en plantas como la remolacha (*Beta vulgaris*) y frutos de la tuna y en algunos basidiomicetos. (indumentaria(CIAI))

### **2.3.5 Insectos**

Dentro de este grupo hay dos componentes de importancia. La primera de ellas es la denominada cochinilla, que involucra una variedad de especies de un insecto parásito de diversas plantas según su origen, y que produce un color rojo muy apreciado. La otra es el kermes, insecto parásito de dos especies arbóreas: la encina (el kermes americano) y la coscoja (el kermes europeo). También de este animal se extrae un colorante rojo. (indumentaria(CIAI))

### 2.3.6 Organismos marinos

Los colorantes animales de organismos marinos, tienen en común la especie de moluscos cefalópodos. Uno de ellos es la denominada cañadilla (*murex brandaris*) de la que se extrae un color púrpura muy apreciado en la antigüedad y con un rico anecdotario, y el otro es la jibia o sepia común, de la que se extrae de su saco de tinta un colorante marrón rojizo. (indumentaria(CIAI))

**Tabla II- 5 Principales colorantes naturales**

<b>Materia Prima</b>	<b>Colorante Natural</b>	<b>Color</b>
Cúrcuma ( <i>Cúrcuma longa</i> )	Curcumina	Amarillo
Cochinilla ( <i>Dactylopius coccus</i> )	Carmín	Rojo
Mora ( <i>Rubus ulmifolius</i> )	Antocianinas	rojo- violeta
Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	B- Caroteno	amarillo-anaranjado
Alfalfa ( <i>medicago sativa</i> )	Clorofila	verde claro- verde oscuro
Materias vegetales	Carbón Vegetal	gris – negro
Azúcar ( <i>glucosa, sacarosa</i> )	Caramelo	marrón oscuro
Remolacha( <i> beta vulgaris</i> )	Betalaína	rojo morado
Pimentón ( <i>capsicum annum</i> )	Oleorresina De Pimentón	Anaranjado
Bija ( <i>Bixa orellana</i> )	Anato	Amarillo

**Fuente:** (Flavorix, 2012)

### 2.4 Definición de Antocianinas

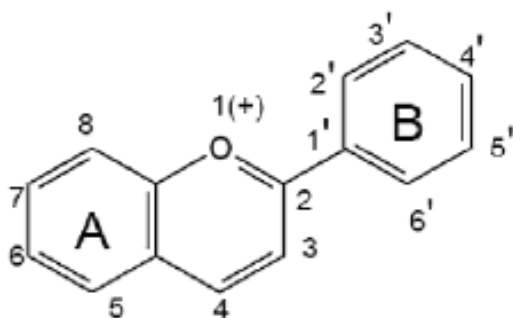
Las antocianinas son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la

salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras. (Zapata, 2014).

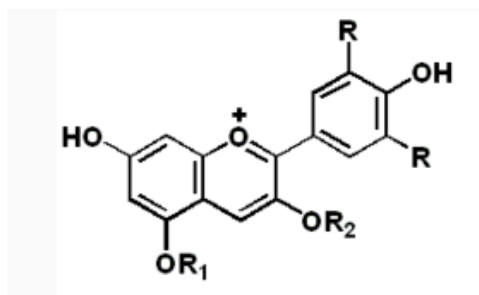
Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano.

Las antocianinas representan un grupo muy amplio de compuestos fenólicos vegetales, estos son los pigmentos hidrosolubles rojos, azules y púrpuras de las flores, frutas y verduras. Estas poseen una estructura básica en común, químicamente son glucósidos de las antocianinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianina, que es la aglicona, a la que se une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión *flavilio*. (Baudi, 1993), también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión como se puede ver en la Figura 2-2. (Badui, 1993).

**Figura 2- 2 Estructura del 2-fenil benzopirilio y Antocianinas**



**2-fenil benzopirilio**



**Antocianinas**

Las antocianinas se encuentran ampliamente en el reino vegetal y son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul. Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. Estos pigmentos son normalmente disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son

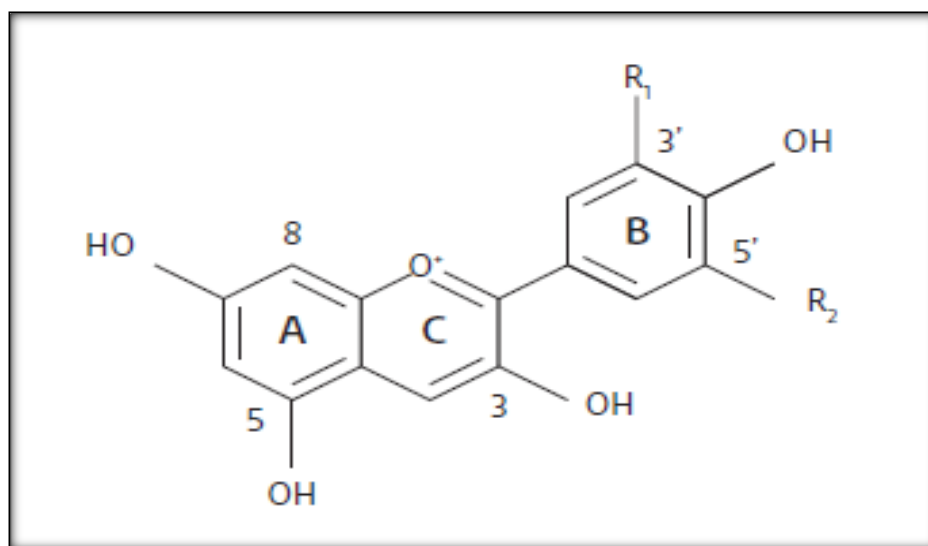
localizadas en regiones discretas llamadas antocianoplastos (Castañeda-Sanchez & J.A. Guerrero- beltran, 2011)

Las antocianinas destacan por sus propiedades farmacológicas y terapéuticas, entre las que se pueden mencionar, antioxidante y propiedades antiinflamatorias, antihipertensivo, al inhibir a la enzima convertidora de la angiotensina, preventiva en enfermedades asociadas a la obesidad, etc. (Zeballos, 2016)

#### 2.4.1 Estructura de las Antocianinas

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas

**Figura 2- 3 Estructura de las antocianinas**



**Tabla II- 6 Sustituyentes de las Antocianinas**

Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{max}}$ (nm)espectro visible
	R1	R2	
Pelarganidina	H	H	494 (Naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

**Fuente:** (GARZÓN, 2008)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules, mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico (Fig. 2-4), caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Stintzing et al., 2002, demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura.

#### **2.4.2 Biosíntesis de las Antocianinas**

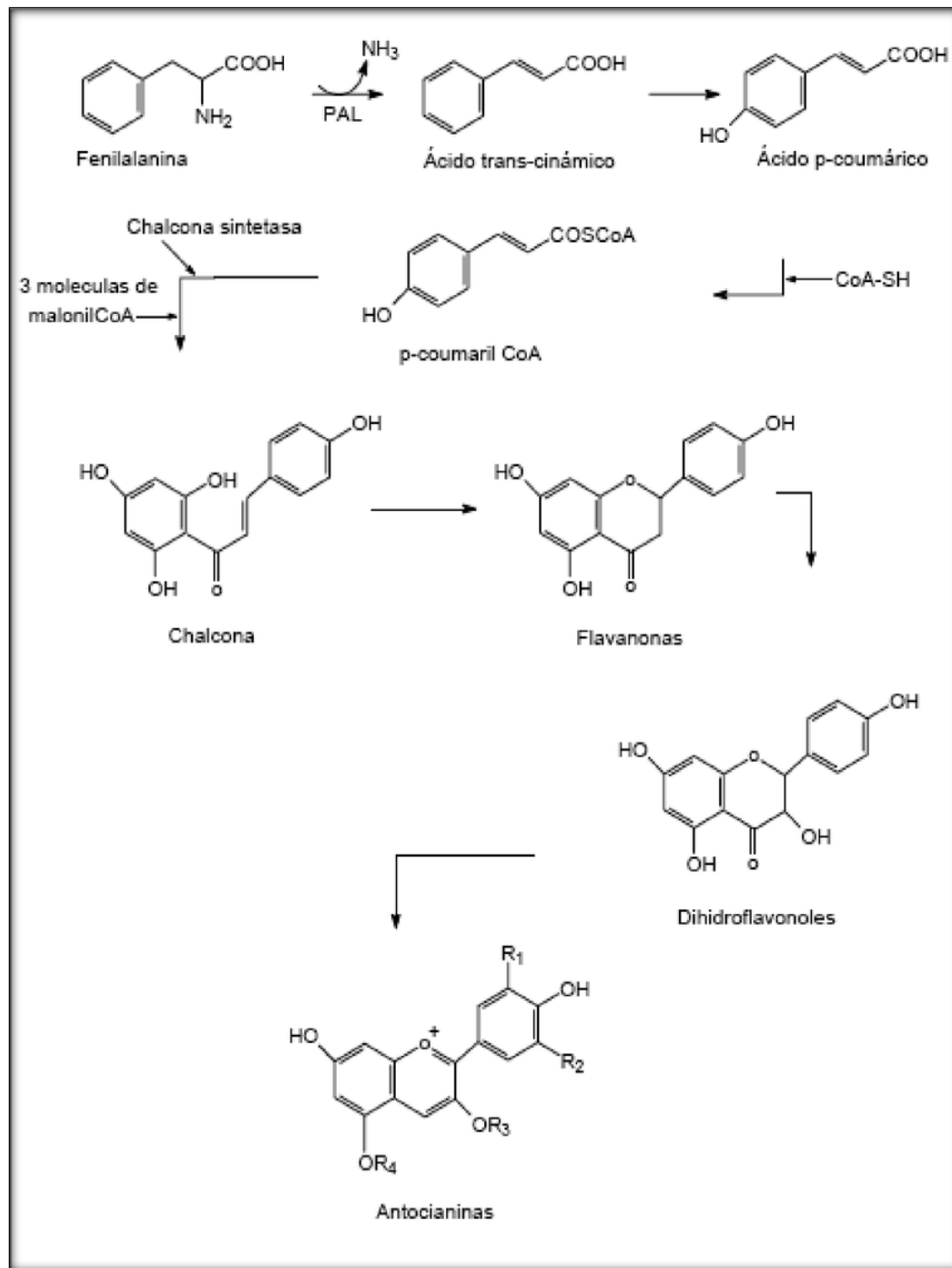
Los precursores de las antocianinas son bien conocidos (Springob et al., 2003). Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta de ácido shikímico. El ácido shikímico

da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de NH<sub>3</sub> se convierte en ácido p-coumárico (Figura 2-4).

El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonilCoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posteriores posibles reacciones de metilación de los hidróxilos seguidas de acilaciones.



Figura 2- 4 Biosíntesis de las Antocianinas



Fuente: (Delgado-Vargas, 2000)

### **2.4.3 Factores que Afectan la Estabilidad de las Antocianinas**

Las antocianinas, de manera general, son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentra, afectan su estabilidad la temperatura a la que se almacena, el pH, la luz, presencia de enzimas, el oxígeno, otros componentes como flavonoides o proteínas (Zeballos, 2016).

#### **2.4.3.1 Temperatura**

Los tratamientos térmicos influyen significativamente en la destrucción de las antocianinas.

Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de la fruta, ya que se favorece tanto la extracción que incluso se puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros. (Lasso, 2011)

#### **2.4.3.2 Iones metálicos**

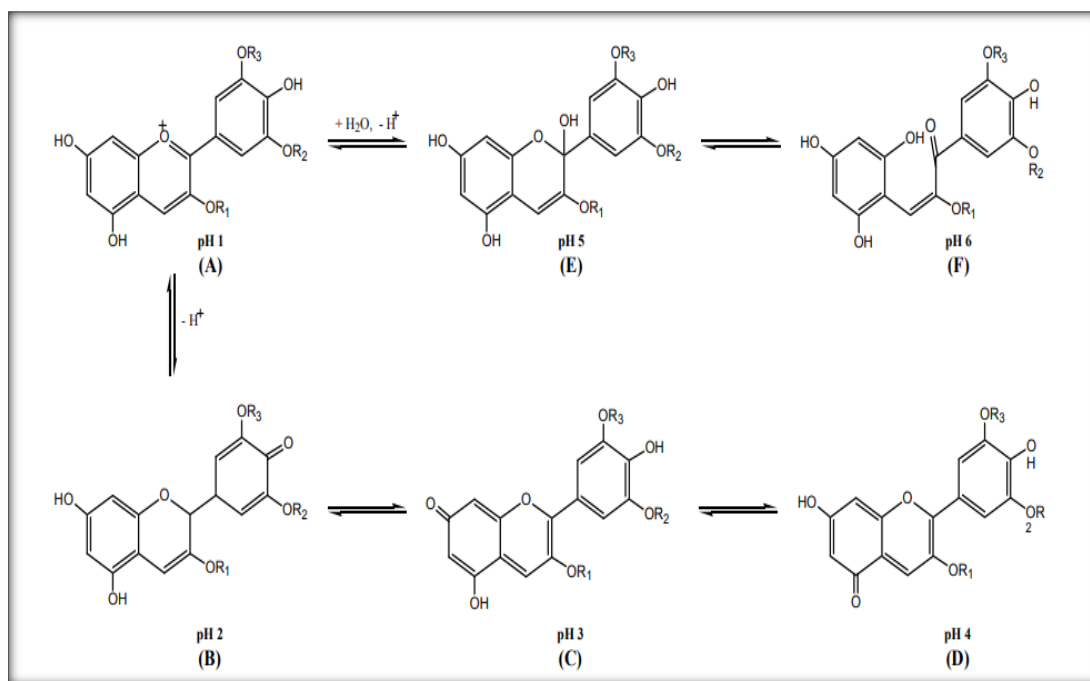
Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables. (Lasso, 2011)

#### **2.4.3.3 pH**

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad (Figura 2-5). A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas (Figura 2-5 A), a valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la forma quinodales (Figura 2-5 B, C y D) de color azul. A pH entre 5 y 6 se observan

las especies pseudobase carbinol, que es incolora (Figura 2-5 E), y chalcona, de color amarillo (Figura 3-5 F), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (Zapata, 2014)

**Figura 2- 5 Estructura de antocianinas a diferentes pH**



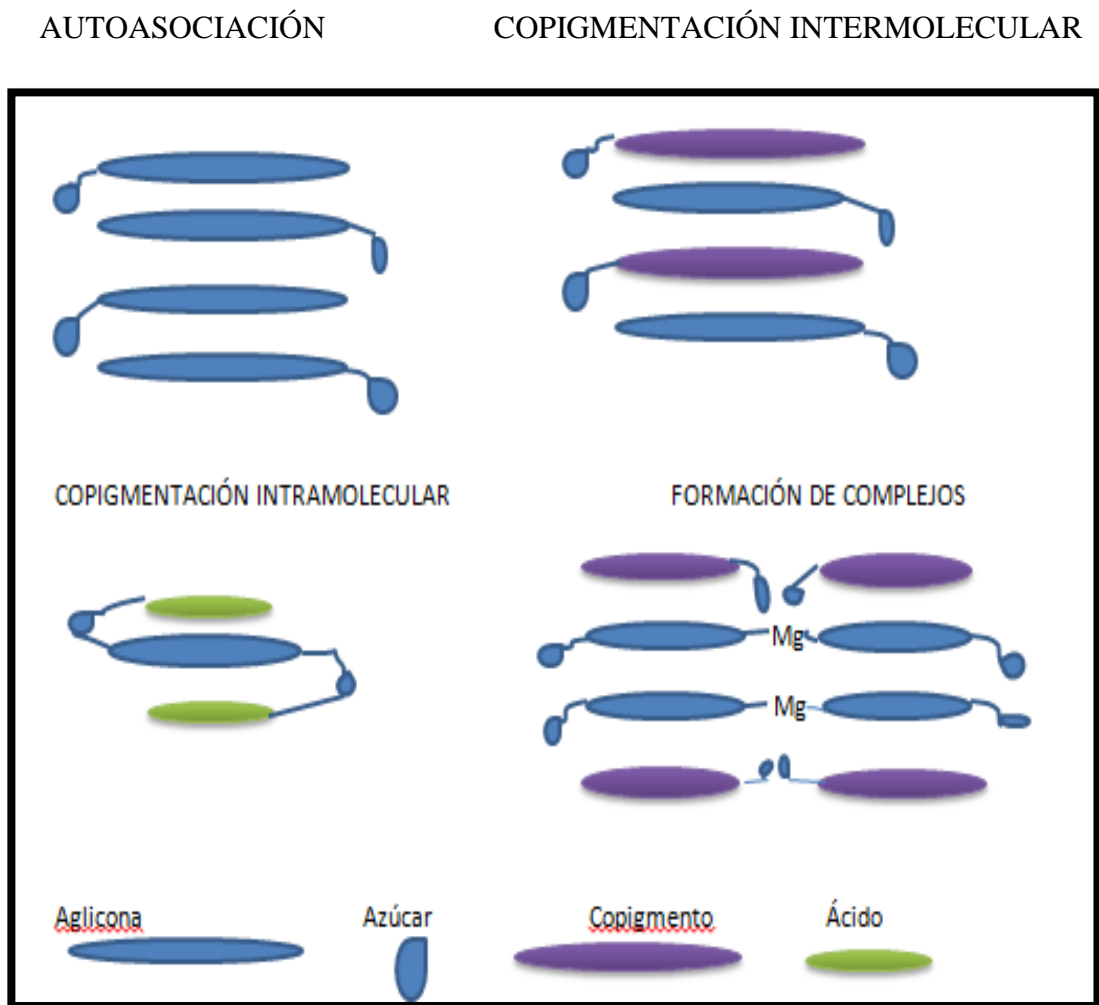
**Fuente:** (Aliaga, 2017)

#### 2.4.3.4 Copigmentación

La copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de la estructura del catión flávilo. Las formas coloreadas de las antocianinas pueden estabilizarse por interacción con componentes, llamados copigmentos, que existen en las células de las flores, frutas y berries (Rein, 2005). Los copigmentos pueden ser flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos y grupos acilo aromáticos, entre otros.

La copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido (Mazza, 1995) y puede ocurrir a través de una serie de interacciones. Los mecanismos más importantes son las: copigmentación intermolecular, copigmentación intramolecular, autoasociación y formación de complejos de metales:

**Figura 2- 6 Interacciones de Antocianinas**



**Fuente:** (Zapata, 2014)

#### **2.4.3.5 Agua**

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora. Sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación. Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (Kopjar y Piližota, 2009; Lewis y Walker, 1995).

Dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas, resulta conveniente su eliminación para disminuir las probabilidades de ataque nucleofílico al catión flavilio. (Zapata, 2014).

#### **2.4.4 Determinación de las Antocianinas**

Existen distintas formas para determinar antocianinas ya sea en forma total o en forma separada cada antocianina. Si se quiere establecer las antocianinas en forma general muchos autores de diversos estudios utilizan el método de pH diferencial. Pero si se desea determinar las antocianinas en forma separada se recomienda utilizar cromatografía.

##### **2.4.4.1 Determinación de antocianinas de forma total**

La forma más utilizada para determinar antocianinas en forma total es la basada en diferencial de pH.

El contenido total de antocianinas en extractos crudos que contiene otros materiales fenólicos, que son determinadas por mediciones de absorción de la solución a una determinada longitud de onda. Esto es posible porque las antocianinas tienen una típica banda de absorción entre 490 y 550 nm en la región del espectro visible. Esta banda está lejos de la banda de absorción de otros fenoles, y tiene un máximo espectro en el

rango UV. En muchas instancias, sin embargo, este simple método es inapropiado por la interferencia de productos de degradación de antocianinas o melanoidinas de reacciones de pardeamiento. En ambos casos, el acercamiento debe ser usado para diferenciar y/o métodos sustractivos para cuantificar antocianinas y su producto de degradación (Lasso, 2011)

#### 2.4.4.2 Ley de Lambert-Beer

Esta ley expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática (de longitud de onda fija) y concentración de un cromóforo en solución:

$$A = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ecuación 2-1}$$

##### Donde:

A=Absorbancia

$\varepsilon$ =coeficiente de absorción (m)

L= longitud de la celda (cm)

c=concentración de la sustancia absorbente en el medio

I=Intensidad de la luz incidente

$I_0$ =intensidad de la luz que atraviesa en el medio

La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración, a mayor número de moléculas mayor interacción de la luz con ellas; también depende de la distancia que recorre la luz por la solución a igual concentración, cuanto mayor distancia recorre la luz por la muestra más moléculas se encontrará; y por último, depende de  $\varepsilon$ , una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromoforo. Como A es adimensional, las dimensiones de  $\varepsilon$  dependen de las de c y l. La segunda magnitud (l) se expresa siempre en cm mientras que la primera (c) se hace, siempre que sea posible, en **m**, con lo que las dimensiones de  $\varepsilon$  resultan ser  $\text{m}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Este coeficiente así expresado, en términos de unidades de concentración molar, se denomina coeficiente de extinción molar ( $\varepsilon\text{M}$ ). Cuando, por

desconocerse el peso molecular del soluto, la concentración de la disolución se expresa en otras unidades distintas de M, por ejemplo,  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , las dimensiones de  $\epsilon$  resultan ser distintas, por ejemplo,  $\text{g}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ , y al coeficiente así expresado se denomina coeficiente de extinción específico ( $\epsilon_s$ ). (Lasso, 2011)

La ley de Lambert-Beer se cumple para soluciones diluidas; para valores de  $c$  altos,  $\epsilon$  varía con la concentración, debido a fenómenos de dispersión de la luz, agregación de moléculas, cambios del medio, etc. (Lasso, 2011)

#### **2.4.4.3 Espectrofotometría**

La espectrofotometría es una técnica que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética. La luz que se encuentra en el rango visible y ultravioleta de los espectros electromagnéticos presenta una energía de 150- 400  $\text{kJmol}^{-1}$ . La energía de la luz es usada para promover electrones de un estado de excitación a otro. Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud. Moléculas con electrones deslocalizados en sistemas aromáticos a menudo absorben la luz a 150-400  $\text{nm}$  (ultravioleta) o en la región visible de 400-800  $\text{nm}$ . (Sosa & Lopez Sanchez, 2004)

La espectrofotometría de absorción es usualmente usada con moléculas dispersas en un solvente transparente. La absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración y por consiguiente la espectrofotometría de absorción es ideal para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia de una molécula no sólo depende de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo. La espectrofotometría de absorción es por lo tanto una excelente técnica para seguir reacciones de unión a ligando, catálisis enzimáticas y transiciones (Sosa & Lopez Sanchez, 2004).

El espectrofotómetro nos permitirá medir la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción para antocianinas. Además, nos permitirá saber la cantidad de antocianinas presentes en las muestras a analizar.

## **2.5 Métodos empleados para la Extracción de Colorante Natural (Antocianinas)**

Se han desarrollado diferentes tecnologías de extracción de colorantes naturales.

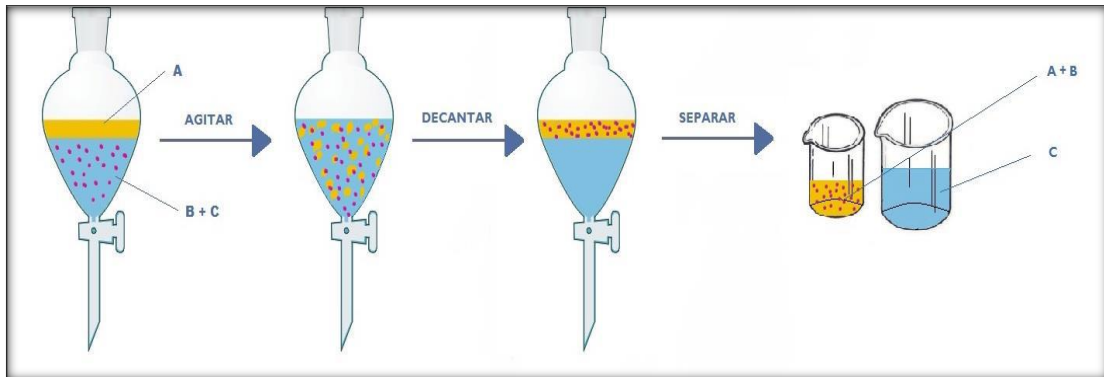
### **2.5.1 Extracción sólido-líquido**

La extracción sólido-líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente. El componente o componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida recibe el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte. La extracción sólido-líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso; así, se le conoce también como lixiviación, lavado, percolación, etc.

La forma en que el soluto esté contenido en el sólido inerte puede ser diversa. Así, puede ser un sólido disperso en el material insoluble o estar recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que esté adherido o retenido en el sólido, o bien estar contenido en su estructura molecular. Aplicaciones importantes de la extracción sólido-líquido en la industria alimentaria son: extracción de aceites y grasas animales y vegetales, lavado de precipitados, obtención de extractos de materias animales o vegetales, obtención de azúcar, fabricación de té y café instantáneo, entre otras. Este tipo de operaciones se lleva a cabo en una sola o múltiples etapas. Una etapa es una unidad de equipo en la que se ponen en contacto las fases durante un tiempo determinado, de forma que se realiza la transferencia de materia entre los componentes de las fases y va aproximándose al equilibrio a medida que transcurre el tiempo. Una vez alcanzado el equilibrio se procede a la separación mecánica de las fases. En realidad, es difícil que en una etapa se llegue al equilibrio, por lo que para el cálculo de las etapas reales es preciso definir la eficacia. Para una etapa, es el cociente entre el cambio en la composición que se logra realmente y el que debería haber tenido lugar en una situación de equilibrio bajo las condiciones de trabajo. (BARBOSA-CÁNOVAS, 2005)



**Figura 2- 7 Extracción Solido-Liquido por agitación y posterior reposo**



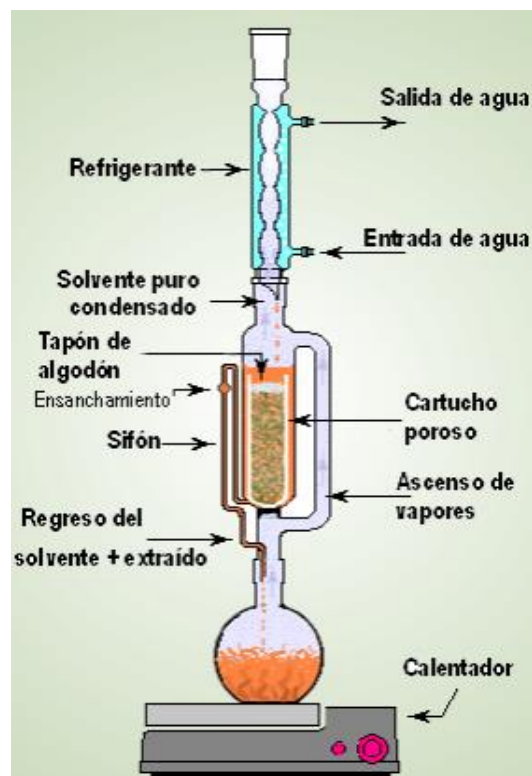
**Fuente:** (Ortega P. O., 2016)

Dentro de la extracción sólido líquido podemos encontrar diferentes métodos que serán descritos a continuación:

### **2.5.1.1 Extracción sólido líquido por extractor Soxhlet**

Se emplea un equipo de vidrio, que consta de tres partes: balón, corneta, condensador. El funcionamiento es el siguiente: En el balón se dispone el disolvente, en contacto con una manta calefactora; en la corneta es donde se deposita un cartucho de papel filtro o tela que contiene un peso dado de materia colorante; en el condensador es donde se condensa el disolvente que por efecto de la gravedad cae en la corneta embebiendo el material vegetal. Este método se emplea a bajas temperaturas para no degradar las moléculas. (Membreño S. A., 2006)

**Figura 2- 8 Extracción con equipo soxhlet**



Fuente: (Elena & Castillo, 2012)

### 2.5.1.2 Extracción sólido líquido por maceración

Esta extracción es sencilla. Se somete únicamente a la disolución del soluto en un solvente, dejando reposar hasta que el solvente penetre en la estructura celular, lo ablande y disuelva las porciones solubles, controlando convenientemente la temperatura y la duración del proceso. Martin et al. (1965), recomienda que la maceración se realice a una temperatura de 15 a 20°C. Si el tiempo de maceración es muy prolongado debe usarse conservadores para evitar alteraciones microbianas (Yúfera, 1979). La ventaja de esta extracción es producir un extracto con una concentración uniforme, sin embargo, resulta laboriosa, y para conseguir mejores rendimientos se requiere de mayor tiempo de extracción. En esta etapa se evalúa lo siguiente:

- Influencia del tiempo y temperatura de maceración.

- Influencia de la relación materia prima /solvente de extracción.
- Influencia del ácido.
- Influencia de la concentración del ácido.

**Figura 2- 9 Extracción por maceración**



**Fuente:** (CÁRDENAS, 2018 )

### **2.5.1.3 Extracción sólido líquido con agitación**

Es un procedimiento de extracción que tiene lugar exclusivamente sometiendo a la muestra a la acción del disolvente a través de un proceso de agitación. Por tanto, este proceso es solo aplicable a analitos unidos débilmente a la matriz de la materia prima. Una vez extraído el analito, se tiene que separar el disolvente de la matriz. En general el volumen de disolvente utilizado es elevado y por tanto suele ser necesaria la evaporación del mismo antes de la determinación final con el fin de preconcentrar los analitos. (Ortega P. O., 2016).

La extracción por agitación ha demostrado ser un método excelente en los procesos extractivos.

#### **2.5.1.4 Extracción por cocciones**

Los cocimientos son preparados líquidos que se confeccionan hirviendo con agua las sustancias vegetales (Martin et al.1965). La muestra se coloca en un recipiente de vidrio, se agrega el solvente y se somete a ebullición por diferentes tiempos. La temperatura de extracción debe ser tal que no afecte a la estructura del colorante (CÁRDENAS, 2018 ). En este método de extracción de la antocianina se evalúa:

- Influencia del número de etapas de extracción.
- Influencia del tiempo
- temperatura de calentamiento en la extracción.

#### **2.5.2 Extracción por compresión**

Para realizar este proceso se debe preparar la materia prima cortada en trocitos con la finalidad de incrementar la superficie de contacto; posteriormente se deposita la muestra en un vaso de precipitado y se somete a agitación junto con el solvente (metanol) por el lapso de 1 a 3 horas y a una temperatura no mayor a 45°C; posteriormente se traslada el producto a un embudo bushner para separar la parte sólida del líquido; la parte sólida que queda luego de la filtración, se somete a un proceso de compresión para obtener mayor rendimiento de la extracción y esto se reserva junto con el líquido extraído de la filtración. Luego de ello se transfiere el jugo concentrado a un rota-vapor para recuperar el solvente y las propiedades del producto. Una vez realizada esta operación se almacena en frascos de vidrio, en un lugar fresco y seco. (Ramírez, 2017)

### **2.6 Antecedentes de investigación respecto a extracción de colorantes naturales (Antocianinas)**

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales. El método usual de extracción de antocianinas es la extracción solido-liquido. Sin embargo, es de destacar la existencia de otros métodos. Así, científicos japoneses desarrollaron una metodología alternativa que consiste en extraer las antocianinas mediante fermentación de las matrices que las contienen,(Cruz, 2019).

Algunos de los estudios realizados para la extracción de colorante natural (Antocianinas) son los siguientes:

- Kousuke et al (1990) que realizó el estudio para la obtención de antocianinas a partir de la fermentación de batata morada mezclada con arroz.

Estos autores señalaron que las antocianinas extraídas de esta forma fueron más puras que las obtenidas por método de extracción sólido-líquido, sin embargo, no reportan datos de los componentes de las antocianinas extraídas y de su estabilidad. (Cruz, 2019).

- Zapata (2014) realizó el estudio para la obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria. Este consiste en un proceso fermentativo en el que los arándanos triturados fueron fermentados con cepas de *Sacharomyces cerevisiae*.

Con el proceso fermentativo se buscó obtener, por acción de las levaduras y a partir de los azúcares presentes en el sustrato a fermentar, una solución alcohólica, donde se solubilizan las antocianinas, además de metabolitos secundarios, tales como alcoholes superiores, éteres etílicos, ácidos grasos y acetatos que pudieran combinarse con las antocianinas y formar estructuras más estables (Cruz, 2019)

- Ramírez, Aguilar et al (2006), realizaron el estudio para la obtención de un colorante natural alimentario de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*).

En esta investigación se obtuvo un colorante natural a partir de la extracción metanólica de antocianinas presentes en la mora de castilla. Se caracterizó el extracto resultante por medio de métodos analíticos de cromatografía de capa delgada, junto con un análisis de estabilidad frente a diferentes condiciones ambientales y pruebas de toxicidad, el colorante alimentario resultó ser efectivo, relativamente estable, mantuvo la naturalidad de los productos y garantizó la inocuidad de éstos.

- Gorriti Gutiérrez et al (2009), estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de la coronta de maíz morado. Ensayaron extracciones con

soluciones etanólicas al 20% y pH 2 acondicionadas según el diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción.

Los resultados que se obtuvieron indican que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75°C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones menos efectivas fueron 25°C y 30 minutos.

También estudiaron la influencia de otras variables de proceso como solvente, el pH, la temperatura y el tiempo de extracción. Concluyeron que la extracción se vio favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20% como agente de extracción y un pH entre 2 y 4.

- (Cruz, 2019) Realizó el estudio de extracción de antocianinas de Arándano (*vaccinium corymbosum* L) cultivado en el valle central de Tarija.

En esta investigación se obtuvo un extracto de antocianinas presentes en el fruto del arándano, a partir de la extracción con metanol acidificado con ácido cítrico. En esta investigación se estudió variables como el pH, relación soluto/solvente y estado de la materia prima, donde se encontraron que las condiciones más óptimas y de mayor rendimiento son a pH 4, relación soluto/solvente de 1:3 g/ml y el estado de la materia prima con fruto fresco.

- (CARVALLO, 2019) realizó un estudio en la extracción de antocianinas a partir de la coronta de maíz morado. Realizando dos métodos de extracción para determinar cuál es el método más adecuado, método 1, extracción con etanol al 60% en un baño ultrasónico trabajando con dos variables pH y temperatura.

El segundo método es extracción de antocianinas por agitación magnética, este proceso de extracción de igual manera se trabajó con etanol al 60% tomando en cuenta variables como pH y temperatura.

## **2.7 Conservación del Extracto de Antocianinas**

Existen diversos métodos para la conservación de antocianinas

### **2.7.1 Encapsulación**

La encapsulación es una técnica que se ha aplicado para preservar y proteger numerosos ingredientes. Puede considerarse una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente, de la reacción con otros compuestos o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. (QUIMINET, 2006)

La principal ventaja es que un encapsulado se liberará gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado, obteniéndose productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales. Se utiliza también el término microencapsulación en la industria alimentaria o farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades. Los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se usan indistintamente. (QUIMINET, 2006)

### **2.7.2 Conservación de antocianinas en estado líquido**

Hace referencia a la conservación de extracto de antocianinas en dos temperaturas diferentes, para la degradación mínima de los componentes fenólicos:

Para tiempos prolongados de conservación de un año, es aconsejable una temperatura de -18°C.

Para el uso de extracto en dos días posteriores a su obtención, es aconsejable 4°C.

En todos los casos, el extracto debe encontrarse en botellas de vidrio ámbar herméticamente cerradas, para evitar la degradación por la presencia de la luz y oxígeno. (Cruz, 2019)

**CAPÍTULO III**  
**PARTE EXPERIMENTAL**

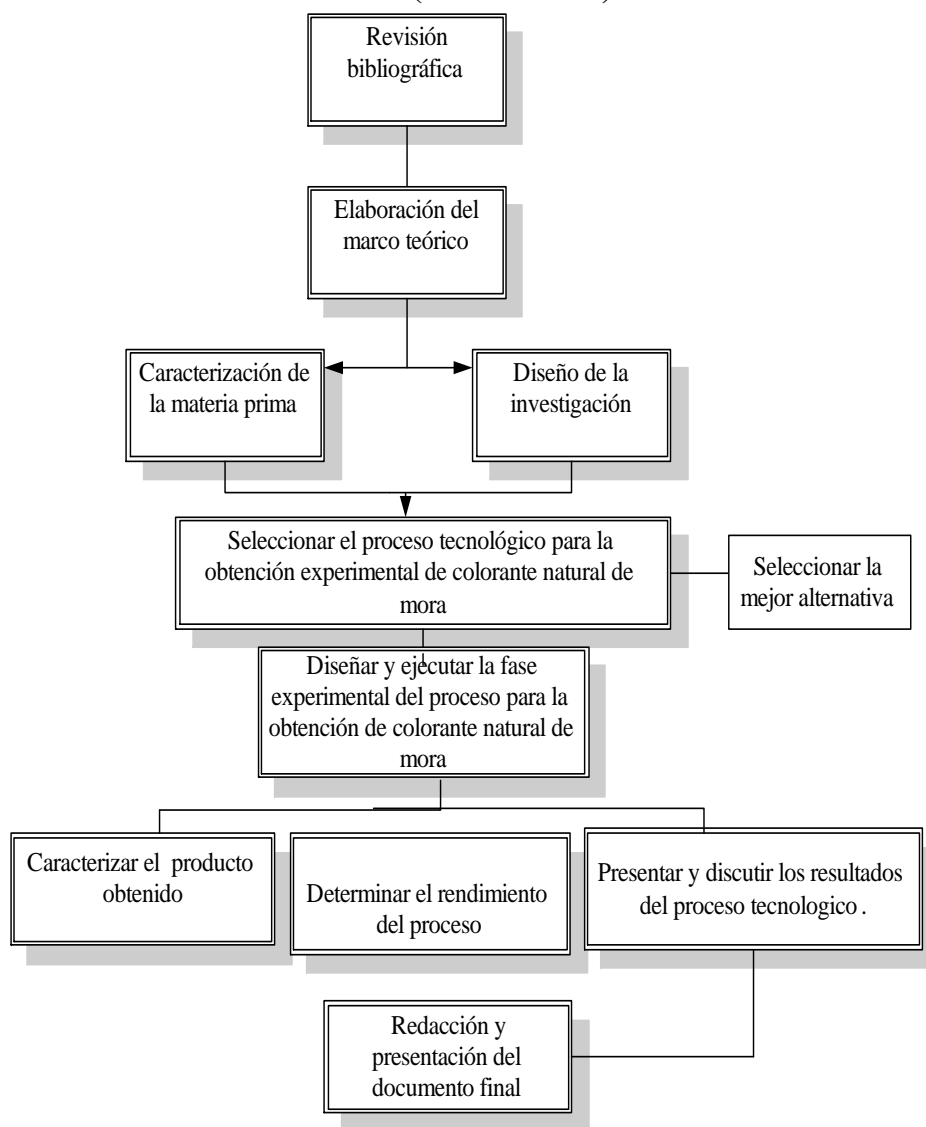


### 3.1 Descripción de la Metodología general del Estudio

El presente estudio consiste en una investigación aplicada para obtención de colorante natural (Antocianinas) de mora cultivada en el departamento de Tarija.

La metodología a aplicar en el estudio, con el fin de lograr los objetivos de la investigación se describe en la Figura 3-1.

**Figura 3- 1 Descripción de la Metodología del Estudio para la obtención de colorante natural (Antocianinas)**



**Fuente:** Elaboración propia 2019

### 3.2 Selección del Método a utilizar

Para la correcta selección del proceso para la obtención de colorante natural de mora, se desarrolla el diseño de matrices de decisiones, en las cuales se consideran como puntos de calificación a factores fundamentales del proceso, tomando en cuenta que el mismo sea fácil de ejecutar y por supuesto con bajo costo.

De acuerdo a referencia bibliográfica se reporta que se puede realizar la extracción mediante diferentes métodos como la extracción por fermentación y extracción por maceración con agitación magnética.

Se procede a realizar una matriz de decisión para la selección del método que se aplicará, se asigna una calificación de acuerdo a la escala predeterminada de 1 a 5.

En la tabla se muestran las calificaciones ponderadas, siendo el proceso adecuado aquel que acumule mayor puntuación.

**Tabla III- 1 Escala de Puntuación de 1 a 5**

<b>Escala de Puntuación</b>	<b>Puntuación</b>
Excelente	5
Muy Bueno	4
Buena	3
Regular	2
Mala	1

**Fuente:** Elaboración propia 2019

**Tabla III- 2 Criterios y ponderación**

<b>Factor evaluado</b>	<b>Comentarios del evaluador</b>	<b>Ponderación</b>
Aplicabilidad del proceso	Para las características del proceso, se desea que el proceso seleccionado pueda operar con una cantidad de materia determinada y que a la vez pueda tolerar variaciones.	10
Generación de subproductos con valor económico o de uso	En los procesos se genera subproductos que se les pueden dar un valor o uso.	10
Equipos	Se desea que para el proceso se cuente con todos los equipos necesarios	20
Operación	Se desea que la operación sea simple, flexible y confiable.	15
Costo	<b>Requerimiento de reactivos.</b> se favorece al proceso que use una menor cantidad de reactivos y que no sean dañinos para la salud.	35
Entorno e impacto ambiental	Se favorecerá al proyecto que genere menor impacto ambiental	10

**Fuente:** Elaboración propia 2019

**Tabla III- 3 Matriz de decisión para la selección del método de extracción de colorante natural (Antocianinas)**

A Valoración porcentual (%)	B Factores	Extracción Sólido líquido con Agitación			Extracción por Compresión			Extracción Soxhlet		
		C	D	E	F	G	H	I	J	K
		Calif.	C/5	D*A	Calif.	F/5	G*A	Calif.	I/5	J*A
10	Aplicabilidad del proceso	5	1	10	3	0,6	6	4	0,8	8
10	Generación de subproductos con valor económico o de uso	3	0,6	6	5	1	10	3	0,6	6
20	Equipos	5	1	20	3	0,6	12	4	0,8	16
35	Costo	5	1	35	3	0,6	21	3	0,6	21
15	Operación	4	0,8	12	3	0,6	9	3	0,6	9
10	Entorno e impacto ambiental	3	0,6	6	3	0,6	6	3	0,6	6
<b>100</b>	<b>TOTAL</b>			<b>89</b>			<b>64</b>			<b>66</b>

**Fuente:** Elaboración propia 2019

De acuerdo a las tablas anteriores se observa que el método de extracción sólido-líquido con agitación tiene una mayor puntuación final respecto a la extracción por compresión y extracción soxhlet,

De manera que el método que se usará en la investigación es el método de extracción sólido-líquido con agitación, debido a que tiene una menor complejidad y se obtiene mejor rendimiento y con un menor costo.

### 3.3 Selección del solvente para la extracción de Colorante Natural

Un buen solvente debe ser lo más selectivo posible, con una viscosidad lo suficientemente baja para facilitar su flujo a través del sólido y de bajo punto de ebullición para que el extracto pueda concentrarse por la evaporación del solvente sin sufrir daño por la temperatura.

**Tabla III- 4 Ventajas y desventajas de los solventes para la Extracción de colorante natural**

<b>Método</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Acetona con cloroformo	Mayor pureza que otros métodos. 30% Más efectivo que el metanol Alta recuperación de antocianinas	Efectos tóxicos y crónicos para la salud humana.
Metanol con 0.001 % de HCl	Este es el método más efectivo después de acetona y cloroformo.	HCl es corrosivo Metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
Etanol con 0.001 % de HCl	80% tan efectivo como el metanol.	Degradación durante la concentración del pigmento.
Agua con 0.001 % HCl	27% tan efectivo como el metanol	Bajo rendimiento
Metanol acidificado con ácido cítrico	Es el más eficiente de los ácidos orgánicos	El metanol tiene efectos tóxicos para la salud humana.
Etanol acidificado con ácido cítrico	Minimiza la descomposición de los pigmentos. Efecto no toxico para el consumo del ser humano.	Concentración del extracto retarde con respecto al metanol con HCl. Menor rendimiento

**Fuente:** (Cruz, 2019)

Por tanto, en base al análisis se llega a la conclusión de que el mejor solvente para la extracción de Antocianinas de mora, es el etanol acidificado con ácido cítrico, ya que el colorante natural a obtener es para consumo humano por lo que se debe considerar un solvente que no sea toxico para la salud de las personas.

El procedimiento de extracción debe maximizar la recuperación de antocianinas con una mínima cantidad de impurezas y mínima alteración o degradación del medio natural.

El conocimiento de los factores que influyen en la estructura y la estabilidad de antocianinas son vitales y ha sido mencionado anteriormente, es por esto que tomando en cuenta estos factores se, se decide realizar la extracción de colorante natural mediante el método de extracción por maceración con agitación, el solvente seleccionado es el etanol acidificado con ácido cítrico.

### **3.4 Selección de las variables del proceso de extracción de colorante natural (antocianinas)**

Las variables seleccionadas para el proceso son las siguientes:

#### **3.4.1 Temperatura**

Los estudios realizados reportan por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60°C) se degradan según una cinética de primer orden. En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. (Zapata, 2014).

Para el presente trabajo de extracción de colorante natural de Mora (Antocianinas), se considera temperaturas dentro de ese rango, debido que a mayor temperatura afecta las propiedades de la materia prima, es por eso que se trabajará a una temperatura mínima de 25°C y máxima de 50°C.

#### **3.4.2 Relación soluto-solvente**

La transferencia de antocianinas al seno del solvente se produce hasta alcanzar el equilibrio en la concentración de antocianinas en todo el conjunto del sistema de extracción. Por tanto cuanto mayor sea la proporción de soluto-solvente, mayor será el gradiente de concentración entre las partículas de mora y la solución extractiva y así la velocidad de difusión de las antocianinas aumentará. (Cruz, 2019)

En estudios similares de extracción de antocianinas se realizaron con relaciones soluto/solvente de entre 1:2 y 1:3 g/ml. De manera que la extracción no es tan efectiva, por lo tanto, para ésta investigación se realizará con relaciones más altas de manera que consiga una máxima extracción.

Para una mejor extracción se realizará a una relación soluto-solvente de 1:5 y 1:10 g/ml.

### **3.4.3 pH**

Se tomó el pH como una variable considerable debido que las antocianinas son inestables al pH y dependiendo de ello pueden encontrarse en diversas formas químicas, y tomando como una variable se puede controlar y estabilizar y de esta manera tener un producto en un estado óptimo.

Estudios realizados muestran rangos de experimentación de 1 a 8. En general se puede señalar que a bajos valores de pH se puede lograr un mayor rendimiento en la extracción (Zapata, 2014).

Para este presente trabajo de investigación se decide trabajar a valores de pH entre 3,1 y 4, debido a que se busca obtener un colorante natural (Antocianinas) para uso alimenticio por lo que se requiere un extracto altamente puro. Por otro lado, a valores muy altos de pH podrían producir una degradación rápida de las antocianinas.

### **3.4.4 Granulometría**

La granulometría es una variable que permite conocer la cantidad de colorante extraída a diferentes tamaños de la partícula con una determinada cantidad de solvente con el fin de encontrar el tamaño óptimo donde se pueda tener un mayor rendimiento

Tamaños menores proveen radios de adsorción más rápidos el cual reduce la cantidad de tiempo de contacto requerida. Cuanto más fino es el tamaño de las partículas mejor es el acceso al área superficial y más rápida es la tasa de cinética de absorción. (García y Granillo, 2017)

Para ésta investigación experimental se realizará una comparación con un tamaño de partículas pequeñas entre 6-25 micras (moras licuadas) y un tamaño mucho más grande (moras cortadas por la mitad), y ver cuánto influye el tamaño en la extracción.

#### **3.4.5 Variable respuesta: Rendimiento**

la variable respuesta (R), es el rendimiento sobre la concentración de Antocianinas después de la extracción en g de colorante / g de materia prima inicial de extracción.

### **3.5 Diseño experimental para la obtención de colorante natural (Antocianinas)**

El diseño experimental es una serie de pruebas en las cuales se inducen variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que, sean posibles observar, identificar y cuantificar las causas de los cambios en la respuesta de salida. (Montgomery, 1991)

Con este diseño experimental se pretende determinar las variables correspondientes, para un alto rendimiento de extracción del colorante natural de Mora.

En un diseño experimental se manipulan una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés. El diseño experimental prescribe una serie de pautas relativas a qué variables hay que manipular, de qué manera, cuántas veces hay que repetir el experimento y en qué orden para poder establecer con un grado de confianza predefinido la necesidad de una presunta relación de causa-efecto.

#### **3.5.1 Modelo del diseño factorial**

El diseño experimental del presente estudio es realizado por el proceso de extracción sólido líquido con agitación, el diseño factorial pertenece al modelo  $2^k$ , donde 2 son los niveles y k representa los factores.

$$\text{Modelo del diseño factorial} = 2^k$$

$$\text{N}^\circ \text{ variables} = 4$$

$$\text{Subniveles} = 2$$

$$\text{N}^\circ \text{ de Experiencias} = 2^4 = 16$$



Para obtener el número correcto de las repeticiones a realizar en el proceso de extracción se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{N}^\circ \text{ de repeticiones} = \text{N}^\circ \text{ de Grados de libertad del experimento}$$

$$\text{Grados de libertad} = \text{Factores} (\text{N}^\circ \text{ Repeticiones} - 1) \geq 4$$

$$\text{Grados de libertad} = \text{Factores} (\text{N}^\circ \text{ Repeticiones} - 1) = 4$$

$$\text{Factores} (\text{N}^\circ \text{ Repeticiones} - 1) = 4$$

Despejando el número de repeticiones

$$4 (\text{N}^\circ \text{ repeticiones} - 1) = 4$$

$$4 * \text{N}^\circ \text{ repeticiones} - 4 = 4$$

$$4 * \text{N}^\circ \text{ repeticiones} = 8$$

$$\text{N}^\circ \text{ de repeticiones} = \frac{8}{4} = 2$$

Con esto determinamos que el número de repeticiones para el experimento es de 2 por lo tanto:

$$N_{\text{exp}} = 16 \times 2 = 32 \text{ experimentos}$$

Del cálculo se concluye que se realizan 32 experimentos.

**Tabla III- 5 Factores y niveles**

FACTORES	NIVELES	
	Min	Max
A = Temperatura (°C)	25	50
B = Relación soluto-solvente	1:5	1:10
C = pH	3,1	4
D=Granulometría	Moras licuadas (ML)	Moras cortadas a la mitad (MCM)
R = Rendimiento	Rendimiento	

**Fuente:** Elaboración propia (2019)

**Tabla III- 6 Codificación de variables**

FACTORES	NIVELES	
	Min	Max
A = Temperatura (°C)	-	+
B = Relación soluto-solvente	-	+
C = pH	-	+
D=Granulometría	-	+

**Fuente:** Elaboración propia

La tabla muestra la matriz de diseño para los 16 experimentos sin la réplica.

**Tabla III- 7 Matriz de diseño**

Nº Corrida	A	B	C	D	R
1	-	-	-	-	Y1
2	+	-	-	-	Y2
3	-	+	-	-	Y3
4	+	+	-	-	Y4
5	-	-	+	-	Y5
6	+	-	+	-	Y6
7	-	+	+	-	Y7
8	+	+	+	-	Y8
9	-	-	-	+	Y9
10	+	-	-	+	Y10
11	-	+	-	+	Y11
12	+	+	-	+	Y12
13	-	-	+	+	Y13
14	+	-	+	+	Y14
15	-	+	+	+	Y15
16	+	+	+	+	Y16

**Fuente:** Elaboración propia 2019

La tabla muestra el plan de experimentación para los 16 experimentos sin replica

**Tabla III- 8 Plan de experimentación**

<b>Nº Corrida</b>	<b>Factor A</b>	<b>Factor B</b>	<b>Factor C</b>	<b>Factor D</b>	<b>Rendimiento R</b>
1	25	1:10	3,1	ML	Y1
2	50	1:10	3,1	ML	Y2
3	25	1:5	3,1	ML	Y3
4	50	1:5	3,1	ML	Y4
5	25	1:10	4	ML	Y5
6	50	1:10	4	ML	Y6
7	25	1:5	4	ML	Y7
8	50	1:5	4	ML	Y8
9	25	1:10	3,1	MCM	Y9
10	50	1:10	3,1	MCM	Y10
11	25	1:5	3,1	MCM	Y11
12	50	1:5	3,1	MCM	Y12
13	25	1:10	4	MCM	Y13
14	50	1:10	4	MCM	Y14
15	25	1:5	4	MCM	Y15
16	50	1:5	4	MCM	Y16

**Fuente:** Elaboración propia 2019

Para las réplicas se sigue el mismo plan de experimentación de la tabla III-7

### **3.6 Equipos materiales y reactivos necesarios**

#### **3.6.1 Equipos**

Los equipos empleados durante el desarrollo de la parte experimental se mencionan a continuación, además de sus especificaciones en el (anexo A).

- Balanza analítica de 0.1 mg de precisión
- Equipo de filtración (trompa de vacío, Embudo buchner y kitazato)
- Agitador magnético
- pH-metro
- Rota Evaporador
- Espectrofotómetro UV-Vis

#### **3.6.2 Materiales de Laboratorio**

Los materiales empleados durante el desarrollo de la parte experimental se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla III- 9 Material de Laboratorio**

<b>Descripción</b>	<b>Capacidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Tipo</b>
Vasos de precipitación	200 ml	2	vidrio
	1000 ml	2	
Probeta graduada	100 ml	2	vidrio
Pipetas graduadas	1 ml	1	vidrio
	10 ml	1	
Varilla	-	1	vidrio
Erlenmeyer	250 ml	2	vidrio
Kitasato	1000 ml	1	vidrio
Embudo Buchner	200 ml	1	porcelana
Tubos de ensayo con rosca	-	10	vidrio
Vidrio de reloj	-	2	vidrio
Fascos de vidrio ámbar	200	10	vidrio
	100	20	
Papel filtro	pliegues	8	-
Papel aluminio	pliegue	10	-
Termómetro	-	1	vidrio

**Fuente:** Elaboración propia 2020

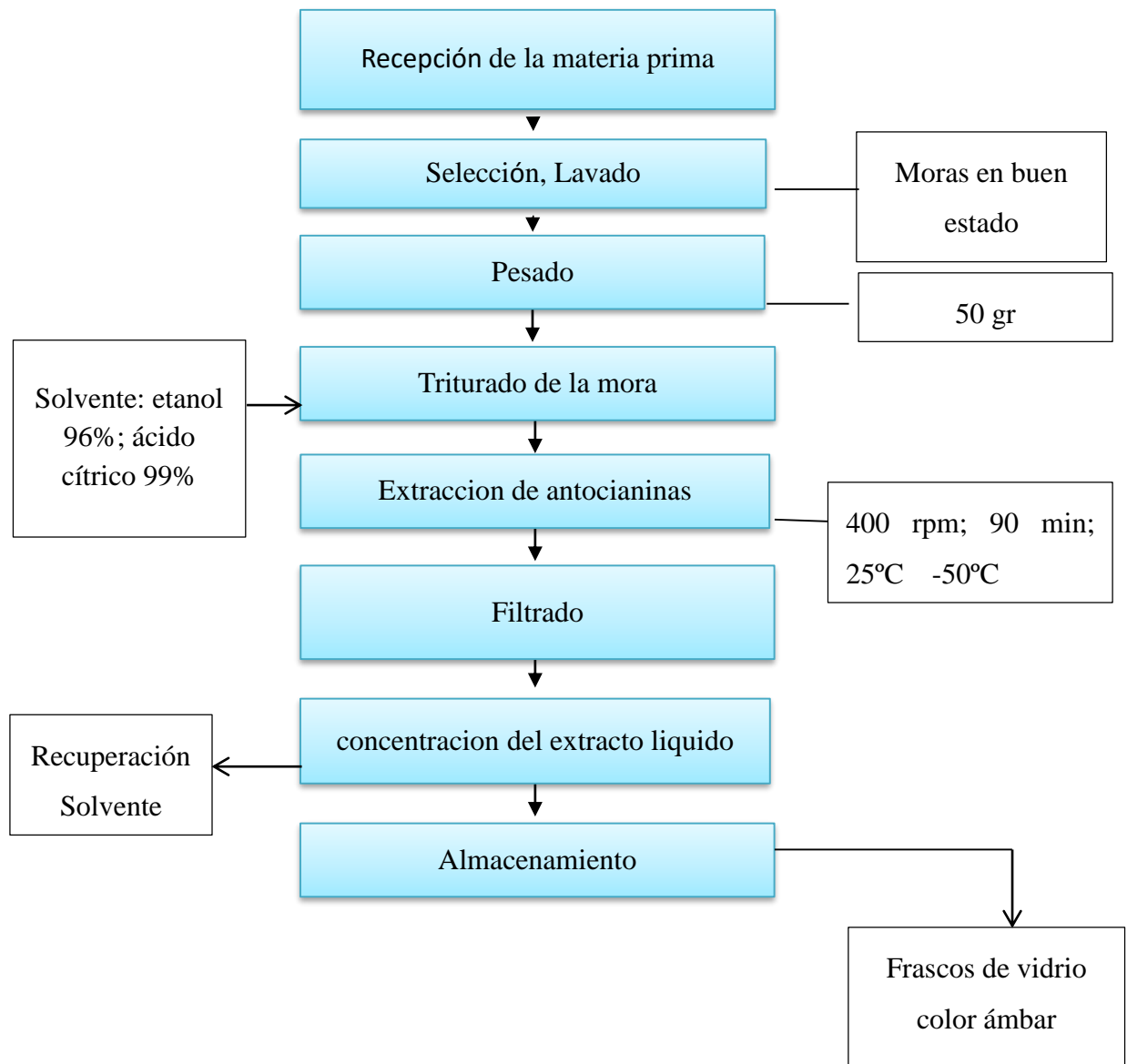
### **3.6.3 Sustancias Reactivos empleados**

- Etanol 96 %
- Metanol 99,8 %
- Ácido cítrico 99,99 %
- Solución tampón de pH 4.5
- Solución tampón de pH 1
- Ácido clorhídrico 1 N
- Agua destilada

### **3.7 Diseño del proceso experimental**

El proceso a desarrollar es extracción por maceración con agitación y como solvente etanol acidificado con ácido cítrico.

**Figura 3- 2 Esquema del proceso de obtención de colorante natural (antocianinas de mora)**



**Fuente:** Elaboración propia 2019

### 3.7.1 Descripción del proceso

#### 4.7.1.1 Recepción de materia prima.

La recepción de mora constituye un punto primordial a tener en cuenta, el mismo se obtendrá directamente de los productores de mora del departamento de Tarija.

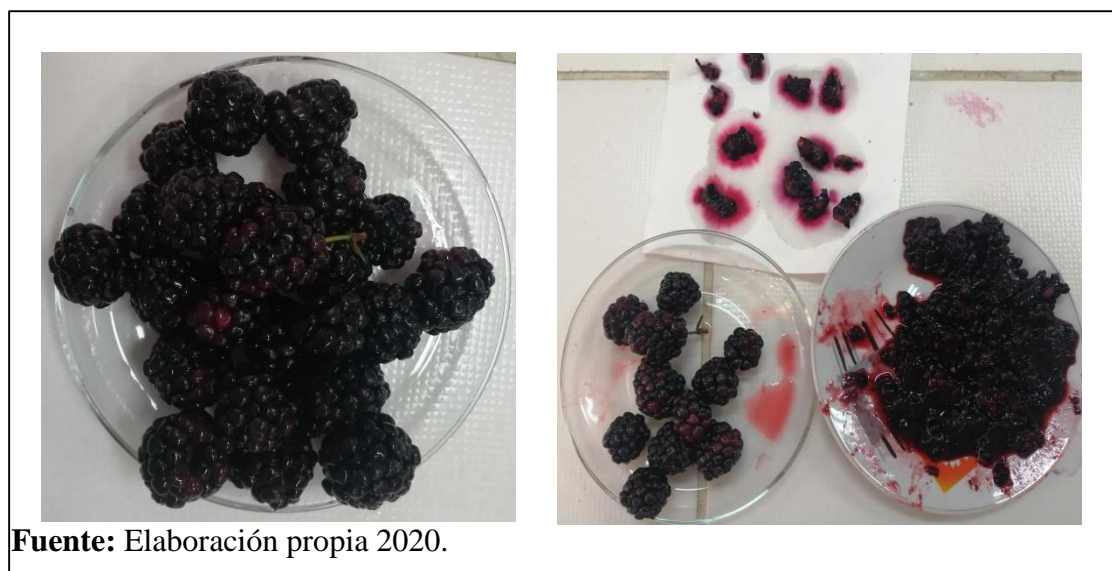
La procedencia de la materia prima es de la localidad de Turumayo perteneciente al departamento de Tarija.

#### 3.7.1.2 Selección y lavado de la materia prima

Para la selección del fruto se tiene en cuenta criterios como el costo del fruto, tamaño y madurez. La selección de la mora se la realiza para escoger aquellas que se encuentren en buen estado sin presentar signos de descomposición, daño o alteración.

El proceso de lavado se realiza para eliminar algunas impurezas que pueden estar presentes en el fruto, y se las realizará directamente con agua de grifo.

**Fotografía 3- 1 Selección y lavado de la mora**





### 3.7.1.3 Pesado

El pesado de la materia prima se lo realiza con la intención de tener el menor error posible y trabajar con las mismas cantidades en todas las experiencias.

Se pesa en una balanza analítica (especificaciones técnicas, ver anexo A) 50 g de la materia prima a utilizar durante el proceso con la finalidad de calcular el rendimiento y las pérdidas en el proceso de extracción.

#### Fotografía 3- 2 Pesado de la mora



**Fuente:** Elaboración propia 2020

### 3.7.1.4 Triturado

Se realiza el triturado de la mora con la finalidad de incrementar la superficie de contacto, ya que las antocianinas se almacenan alrededor de todo el tejido y de esta manera se facilita el proceso de extracción del colorante.

El triturado se realiza en una licuadora de uso general (especificaciones técnicas, ver Anexo A), donde se mezcla la materia prima con el solvente ya acidulado, por un tiempo de 90 seg.

**Fotografía 3- 3 Triturado de la materia prima**



**Fuente:** Elaboración propia 2020

### **3.7.1.5 Extracción**

Luego de tener la mora triturada se procede a verterla en un baño de inmersión con etanol durante 90 min con agitación a una temperatura desde 25°C a 50°C (se elige esta temperatura para conservar las propiedades del colorante, además para conservar la mayor cantidad de solvente ya que el punto de ebullición del etanol es 78°C), en un agitador magnético (Anexo A) a 400 rpm, protegiéndolo de la luz para evitar la degradación de las antocianinas.

**Fotografía 3- 4 Extracción del colorante natural, mediante agitación**



**Fuente:** Elaboración propia 2020

### **3.7.1.6 Filtración**

Una vez Concluido el tiempo de agitación procede a separar la parte líquida de la parte sólida residual, mediante el proceso de filtración simple en el cual se utiliza como medios filtrantes un embudo buchner conectado a un quitasato y una bomba (especificaciones, ver Anexo A) y papel filtro wathman N°42

**Fotografía 3- 5 Filtración al vacío**



**Fuente:** Elaboración propia 2020

**Fotografía 3- 6 Residuos primera y segunda Extracción**

<b>MORAS LICUADAS (ML)</b>	
<b>Residuo primera Extracción</b>	<b>Residuo segunda Extracción</b>
	
<b>MORAS CORTADAS POR LA MITAD (MCM)</b>	
<b>Residuo primera extracción</b>	<b>Residuo segunda extracción</b>
	

**Fuente:** Elaboración propia 2020

### 3.7.1.7 Concentración

En esta etapa se toma la mezcla de líquido extraído de la filtración con alto porcentaje en alcohol para someterlo a un proceso de evaporación, utilizando un rota vapor (especificaciones técnicas, ver Anexo A) a una temperatura de 50°C durante un período de tiempo de 90 min para concentrar el colorante hasta que el alcohol recuperado sea 6 veces menos que el inicial.

**Fotografía 3- 7 Concentración del extracto**



**Fuente:** Elaboración propia 2020.

### 3.7.1.8 Almacenamiento

El colorante obtenido se guarda en botellas de vidrio ámbar, para su posterior análisis.

### 3.7.1.9 Cuantificación de antocianinas

Para realizar el análisis de antocianinas haremos uso de un espectrofotómetro UV-visible (Especificaciones ver Anexo A) para esto se debe llevar todos los extractos a las mismas condiciones.

Posteriormente se preparan soluciones tampón a pH 1 de cloruro de potasio (acidificada con ácido clorhídrico ver anexo C) y pH 4,5 de acetato de sodio (acidificada con ácido clorhídrico, ver anexo C). La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción es proporcional al contenido de antocianinas.

### 3.7.2 Balance de Materia y Energía

#### 3.7.2.1 Balance de Materia

El balance de materia proporciona datos sobre flujos intermedios y pérdidas en el proceso, ya sea por extracción, filtrado y/o concentración del extracto

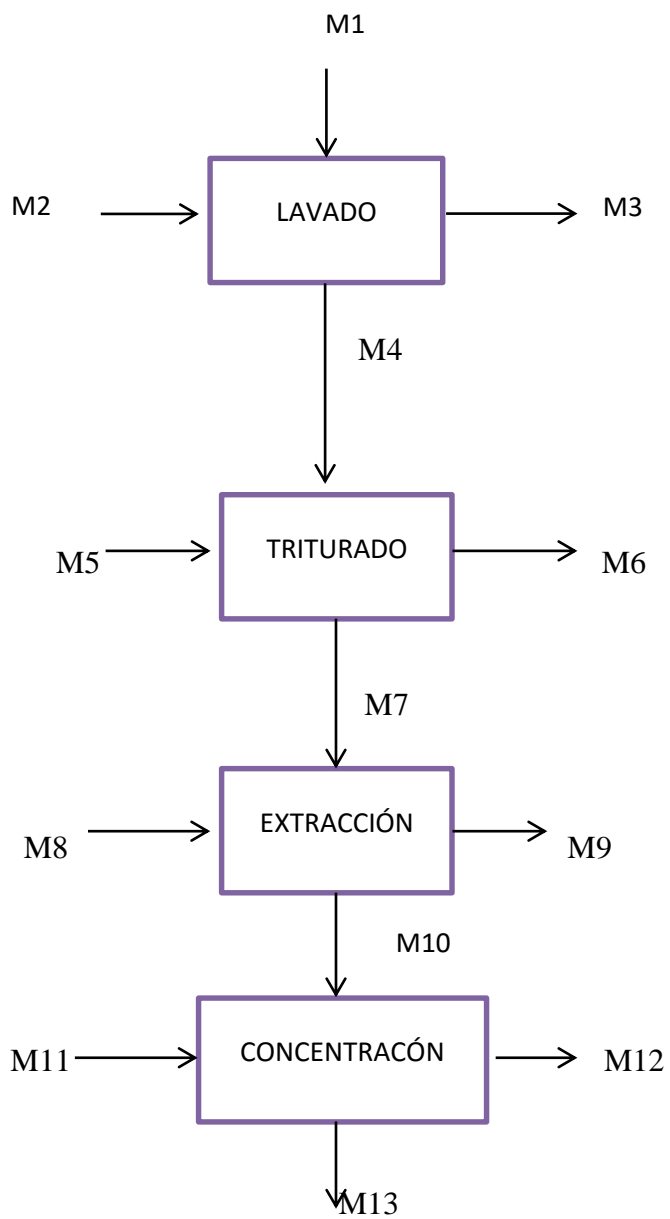
Para el balance de materia se realizó la extracción a partir de 50 gramos de mora. El balance se realizó, en el proceso de extracción en las condiciones más óptimas de rendimiento; a una relación de 1:10 soluto: solvente, 90 minutos, pH 4 y 50 °C.

**Tabla III- 10 Datos para el Balance de Materia y Energía**

DATOS	
Masa de mora	50,186
Densidad de la mora (CEANID)	0,98 g/ml
Volumen del Etanol 96° GL	1000 ml
Densidad del agua (Bibliografía )	1 g/ml
Tiempo de extracción	90 min
Volumen del ácido cítrico	0,56 ml
Densidad del etanol a 87°GL (Det. En Laboratorio)	0,82 g/ml
Densidad del extracto concentrado (Det. En laboratorio)	0,8724 g/ml
Temperatura de ebullición del etanol a P <sub>red</sub> (Tablas)	34°C
Temperatura de la concentración	50°C
Temperatura final del agua de concentración	30°C
Masa de extracto concentrado	0,01900 Kg

Masa del etanol recuperado	590 g
$C_{pOH}$ = Calor específico de etanol	0,60 Kcal/Kg °C
$C_{p\text{ agua}}$ = calor específico del agua	1 Kcal/Kg°C
$C_{pExt}$ = calor específico del extracto (Bibliografía)	0,85 Kcal/Kg°C
$M_{OH}$	0,63578 Kg
$M_{H_2O}$	0,0065 Kg
$\lambda_{OH}$ = Calor latente del alcohol	845Kj/Kg

**Fuente:** Elaboración propia 2021

**Figura 3- 3 Balance de materia para la extracción de antocianinas de mora**



**Tabla III- 11 Especificaciones de las corrientes**

<b>CORRIENTE</b>	<b>ESPECIFICACIÓN</b>
M1	Mora
M2	Agua
M3	Agua + impurezas
M4	Mora lavada
M5	Etanol acidulado
M6	Pérdidas por triturado
M7	Mezcla de mora triturada
M8	Etanol acidulado
M9	Pérdidas+ residuo
M10	Extracto
M11	Etanol recuperado
M12	Pérdidas en el concentrado
M13	Extracto de antocianinas

**Fuente:** Elaboración propia 2021

**Tabla III- 12 Especificaciones Corriente másica**

<b>CORRIENTE MASICA</b>	<b>ESPECIFICACION</b>
<p>M# Corriente másica global</p>	<p><b>M</b> = Corriente másica  <b>#</b>= Número de corriente, toma valores de            1,2,3,4....13</p>
<p>M#E Corriente másica de cada componente</p>	<p><b>M</b> = Corriente másica  <b>#</b> = Número de corriente, toma valores de            1,2,3,4....13</p> <p><b>E</b> = Abreviatura del componente de la corriente, sus significados son:            Ac=Ácido            Ant=Antocianinas,            H<sub>2</sub>O=Agua            OH=Etanol            S=Sólidos.</p> <p>M#Ac =Masa de ácido            M#H<sub>2</sub>O= Masa de agua            M#Ant= Masa de Antocianinas            M#S=Masa de sólidos            M#OH= Masa de Alcohol</p>

**Fuente:** Elaboración propia 2021

**Tabla III- 13 Datos de Análisis fisicoquímicos de la materia prima y producto necesarios para el Balance de materia**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Materia prima</b>	<b>Producto</b>
Acidez (como ac. Cítrico)	%	1,11	1,09
Densidad	g/ml	0,98	0,8724
Humedad	%	88,55	74,35
Solidos solubles	°Brix	7,9	21,1
Concentración total de antocianinas		81,045mg/100g	92,32mg/100 ml

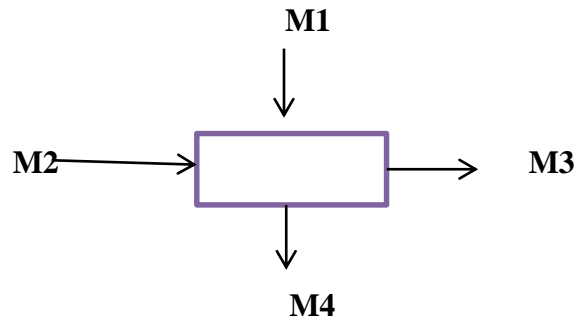
**Fuente:** Elaboración Propia 2021

### **Preparación del solvente acidificado**

Para preparar la solución acida se utiliza 12 gramos de ácido cítrico en 100 ml de agua, y se toma de esta solución 0,56 ml para acidificar hasta pH 4, los 500 ml de alcohol que serán utilizados en la extracción.

El alcohol tiene una concentración inicial de 96 °GL, lo que quiere decir es que por cada 100 ml de alcohol existen 4 ml de agua.

### 3.7.2.1.1 Balance de materia en la etapa de lavado



$M_1$  (Mora) = 50,186 g

$M_2$  (Agua) = 250g

$M_3$  (Agua + impurezas)

$M_4$  (Mora lavada) = 50,006 g

#### Balance Global

$$M_1 + M_2 = M_3 + M_4 \quad \text{Ec. 3.1}$$

$$M_3 = M_1 + M_2 - M_4$$

$$M_3 = (50,186 + 250 - 50,006) \text{ g}$$

$$M_3 = 250,18 \text{ g}$$

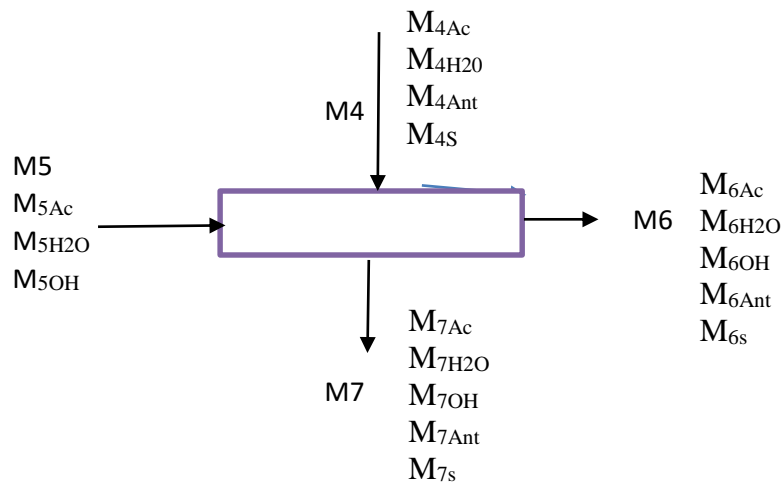
#### Determinación de impurezas

$$I = M_3 - M_2 \quad \text{Ec.3.2}$$

$$I = 250,18 - 250$$

$$I = 0,18 \text{ g}$$

### 3.7.2.1.2 Balance de materia en la etapa triturado



$M_4$  (Mora lavada) = 50,006 g

$M_5$  (Etanol acidificado) = 400 g

$M_6$  (Pérdidas por triturado) =

$M_7$  (mezcla de mora triturada) = 448,03 g

$$M_5 + M_4 = M_6 + M_7 \quad \text{Ec.3.3}$$

$$M_6 = M_4 + M_5 - M_7 \quad \text{Ec.3.4}$$

$$M_6 = (50,006 + 400 - 448,03) \text{ g}$$

$$M_6 = 1,976 \text{ g}$$

**Balance para M4: Mora lavada = 50,006 g**

$$M_{4Ac} = 50,006 * \frac{1,11g}{100 \text{ g de materia prima}} = 0,555 \text{ g}$$

$$M_{4H2O} = 50,006 * \frac{88,55g}{100 \text{ g de materia prima}} = 44,280 \text{ g}$$

$$M_{4S} = 50,006 * \frac{7,9g}{100 \text{ g de materia prima}} = 9,950 \text{ g}$$

$$M_{4\text{Ant}} = 50,006 \text{ g de mora} * \frac{81,075 * 10^{-3} \text{ g de antocianinas}}{100 \text{ g de materia prima}} = 0,040 \text{ g}$$

### Balance para M<sub>5</sub>: 400 g

Para determinar la masa del alcohol se toma en cuenta que está a una concentración de 96°GL por lo que en 100 ml de alcohol hay ml de agua, entonces la masa de agua y alcohol en la corriente M<sub>5</sub> es:

$$M_{5\text{H}_2\text{O}} = 20 \text{ g de agua en el alcohol}$$

$$M_{5\text{OH}} = 380 \text{ g}$$

$$M_{5\text{Ac}} = 0,56 \text{ ml de solución} * \frac{12 \text{ g de ácido cítrico}}{100 \text{ ml de solución}} = 0,067 \text{ g de ácido}$$

### Balance para M<sub>7</sub>: Mora total triturada

$$M_4 + M_5 = M_7 + M_6 \quad \text{Ec.3.5}$$

Según cálculo de la Ec. 3.5

$$M_7 = 50,006 \text{ g} + 400 \text{ g} - 1,976 = 448,03 \text{ g}$$

$$M_{7\text{H}_2\text{O}} = (20 \text{ g} + 44,280) \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 63,998 \text{ g}$$

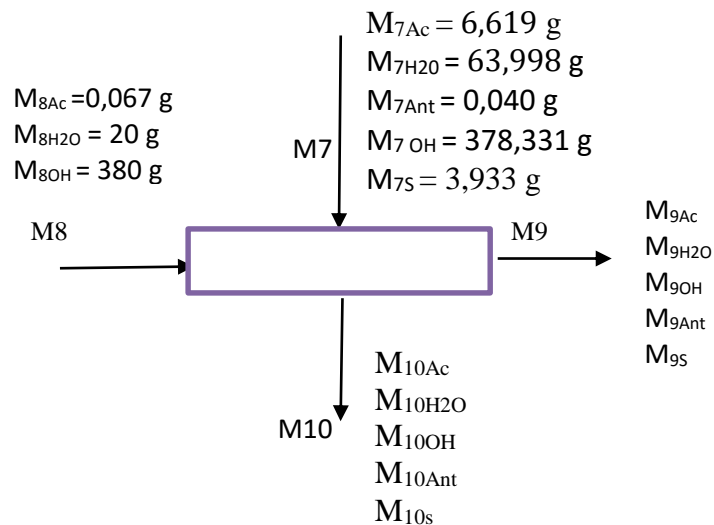
$$M_{7\text{Ac}} = (0,555 \text{ g} + 0,067) \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 0,619 \text{ g}$$

$$M_{7\text{Ant}} = 0,041 \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 0,041 \text{ g}$$

$$M_{7\text{OH}} = 380 \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 378,331 \text{ g}$$

$$M_{7S} = 3,950 \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 3,933 \text{ g}$$

### 3.7.2.1.3 Balance de materia en la etapa de extracción y filtración



**Donde:**

M7: Mezcla de mora triturada = **448,03 g**

M8: Etanol acidulado = 400g

M9: Pérdidas + Residuo

M10: Extracto bruto = 705 g

**Calculo para corriente M9:**

$$M_7 + M_8 = M_9 + M_{10} \quad \text{Ec.3.6}$$

**Despejando la ecuación 3. 6**

$$M_9 = M_7 + M_8 - M_{10}$$

$$M_9 = 448,03 \text{ g} + 400 \text{ g} - 705 \text{ g}$$

$M_9 = 143,5$  g de los cuales 129 g corresponden al solvente y 14,03 g de mora

Para el cálculo de la masa de alcohol en la corriente  $M_9$  se sigue el siguiente análisis:

Si para 400 g de solución hay 38° g de agua, entonces para 129 g de solución hay 125,55 g de alcohol.

$$M_{9OH} = 122,550 \text{ g}$$

$$M_{H_2O} = 129 \text{ g} - 122,5 \text{ g} = 6,450 \text{ g de agua en OH}$$

$$M_{H_2O} = 14,03 * \frac{88,55 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 12,423 \text{ g de agua en la mora}$$

$$M_{9H_2O \text{ Total}} = 6,450 + 12,423 = 18,873 \text{ g}$$

$$M_{9S} = 14,03 \text{ g} * \frac{7,9 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 1,108 \text{ g}$$

$$M_{9Ant} = 14,03 \text{ g} * \frac{81,075 \times 10^{-3} \text{ g}}{100 \text{ g}} = 0,011 \text{ g}$$

$$M_{9Ac} = 14,03 * \frac{1,11 \text{ g}}{100 \text{ g}} = 0,1557 \text{ g}$$

Asumiendo una extracción del 90% entonces:

$$M_{9Ant} = 0,011 \text{ g} * 0,10 = 1,1 \times 10^{-3} \text{ g}$$

$$M_{9Ac} = 0,1557 \text{ g} * 0,10 = 0,016 \text{ g en la mora}$$

Si en 400 g de OH ----- 0,067 g de ac

129 g ----- X=0,021 g de ácido en OH

Entonces:

$$M_{9Ac \text{ Total}} = 0,016 \text{ g} + 0,021 = 0,037 \text{ g}$$



**Balance para M<sub>10</sub> : extracto bruto = 705 g**

$$M_7 + M_8 = M_9 + M_{10} \quad \text{Ec. 3.7}$$

$$M_{10H_2O} = M_{7H_2O} + M_{5H_2O} - M_{9H_2O} \quad \text{Ec.3.8}$$

$$M_{10H_2O} = 63,998 \text{ g} + 20 \text{ g} - 18,873 \text{ g}$$

$$M_{10H_2O} = 65,125 \text{ g}$$

$$M_{10Ac} = M_{7Ac} + M_{5Ac} - M_{9Ac} \quad \text{Ec. 3.9}$$

$$M_{10Ac} = 0,619 \text{ g} + 0,067 \text{ g} - 0,038 \text{ g}$$

$$M_{10Ac} = 0,648 \text{ g}$$

$$M_{10OH} = M_{7OH} + M_{5OH} - M_{9OH} \quad \text{Ec.3.10}$$

$$M_{10OH} = 378,331 \text{ g} + 380 \text{ g} - 122,550 \text{ g}$$

$$M_{10OH} = 635,781 \text{ g}$$

$$M_{10S} = M_{7S} - M_{9S} \quad \text{Ec. 3.11}$$

$$M_{10S} = 3,933 \text{ g} - 1,108 \text{ g}$$

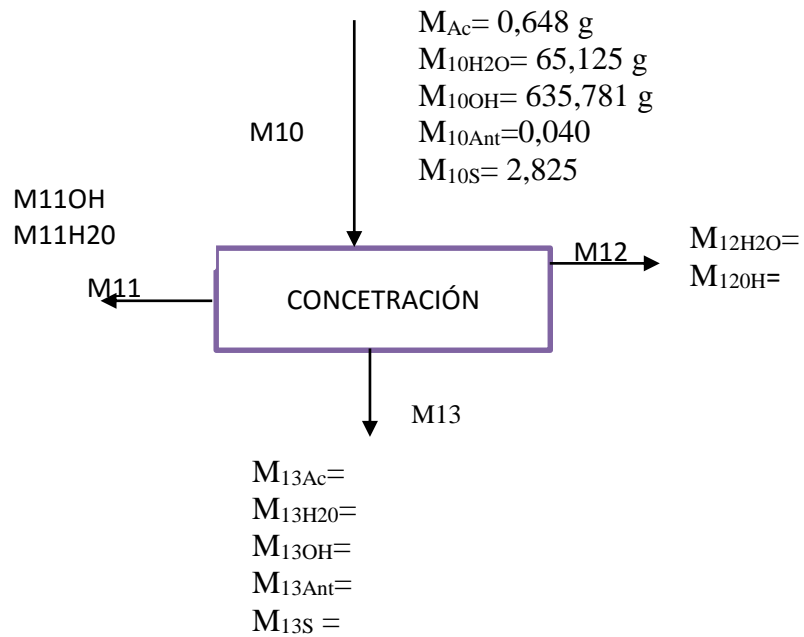
$$M_{10S} = 2,825 \text{ g}$$

$$M_{10Ant} = M_{7Ant} - M_{9Ant} \quad \text{Ec.3.12}$$

$$M_{10Ant} = 0,041 \text{ g} - 1,1 \times 10^{-3} \text{ g}$$

$$M_{10S} = 0,040 \text{ g}$$

### 3.7.2.1.4 Balance de materia en la etapa de concentración



$M_{10}$  (Extracto Bruto) = 705 g

$M_{11}$  (Etanol recuperado) = 590 g

$M_{13}$  (Extracto de Antocianinas) = 19,00g

$M_{12}$  (Pérdidas en la concentración)

$$M_{10} = M_{11} + M_{12} + M_{13} \quad \text{Ec. 3.13}$$

**Despejando la ecuación 3.13**

$$M_{12} = M_{10} - M_{11} - M_{13}$$

$$M_{12} = 705 \text{ g} - 590 \text{ g} - 19,00 \text{ g}$$

$$M_{12} = 96,00 \text{ g}$$

### Balance para M11: Etanol recuperado

Para determinar la cantidad de alcohol en la corriente M11, se emplea el alcoholímetro dando un valor de 93°GL. es decir que por cada 100 ml de alcohol hay 7 ml de agua, entonces:

$$M_{11 \text{ H}_2\text{O}} = 41,3 \text{ g}$$

$$M_{11 \text{ OH}} = 548,7 \text{ g}$$

### Balance para M13

Para determinar la masa de alcohol y agua se procede a determinar la humedad en una termo balanza de infrarrojo, especificación técnica (ver anexo A) por lo que:

$$M_{13(\text{H}_2\text{O}+\text{OH})} = 19 \text{ g} * \frac{74,35\%}{100\%} = 14,1265 \text{ g}$$

Para determinar la cantidad de etanol en la corriente M13, se emplea el alcoholímetro dando un valor de 33°GL.

$$M_{13\text{H}_2\text{O}} = 12,73 \text{ g}$$

$$M_{13\text{OH}} = 1,396 \text{ g}$$

Según datos del producto terminado realizado en CEANID se determina masa de sólidos y masa de ácido:

$$M_{13\text{Ac}} = 19 \text{ g} * \frac{1,09}{100} = 0,2071 \text{ g}$$

$$M_{13\text{S}} = 19 \text{ g} * \frac{21,1}{100} = 4,009 \text{ g}$$

$$M_{13\text{Ant}} = \frac{\frac{92,34 \text{ mg de antocininas}}{100 \text{ ml de extracto}}}{0,8724 \text{ g/ml}} * 19,00 \text{ g extracto conc} = 15,31 \text{ mg} = 0,0153 \text{ g}$$

**Balance para M<sub>12</sub>:**

**Balance para etanol en M<sub>12</sub>**

$$M_{12} = M_{10} - M_{11} - M_{13} \quad \text{Ec.3.14}$$

$$M_{12H_2O} = M_{10H_2O} - M_{11H_2O} - M_{13H_2O}$$

$$M_{12H_2O} = 65,125 \text{ g} - 41,3 \text{ g} - 12,73 \text{ g} = 11,095 \text{ g}$$

**Balance para el agua en M<sub>12</sub>**

$$M_{12OH} = M_{10OH} - M_{11OH} - M_{13OH}$$

$$M_{12OH} = 635,781 \text{ g} - 548,70 \text{ g} - 1,396 \text{ g} = 85,685 \text{ g}$$

**Rendimiento del proceso de extracción**

$$\text{Rendimiento del Proceso} = \frac{m_{\text{Extracto}} * C_{\text{Extracto}}}{m_{\text{mora inicial}} * C_{\text{inicial}}} * 100$$

$$\text{Rendimiento del proceso} = \frac{19 \text{ g} * \frac{92,34 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}{0,8724 \frac{\text{g}}{\text{ml}}}}{50,006 \text{ g} * 81,045 \frac{\text{mg}}{\text{gr}}} * 100 = 49,62\%$$

**Figura 3- 4 Resumen Balance de materia**

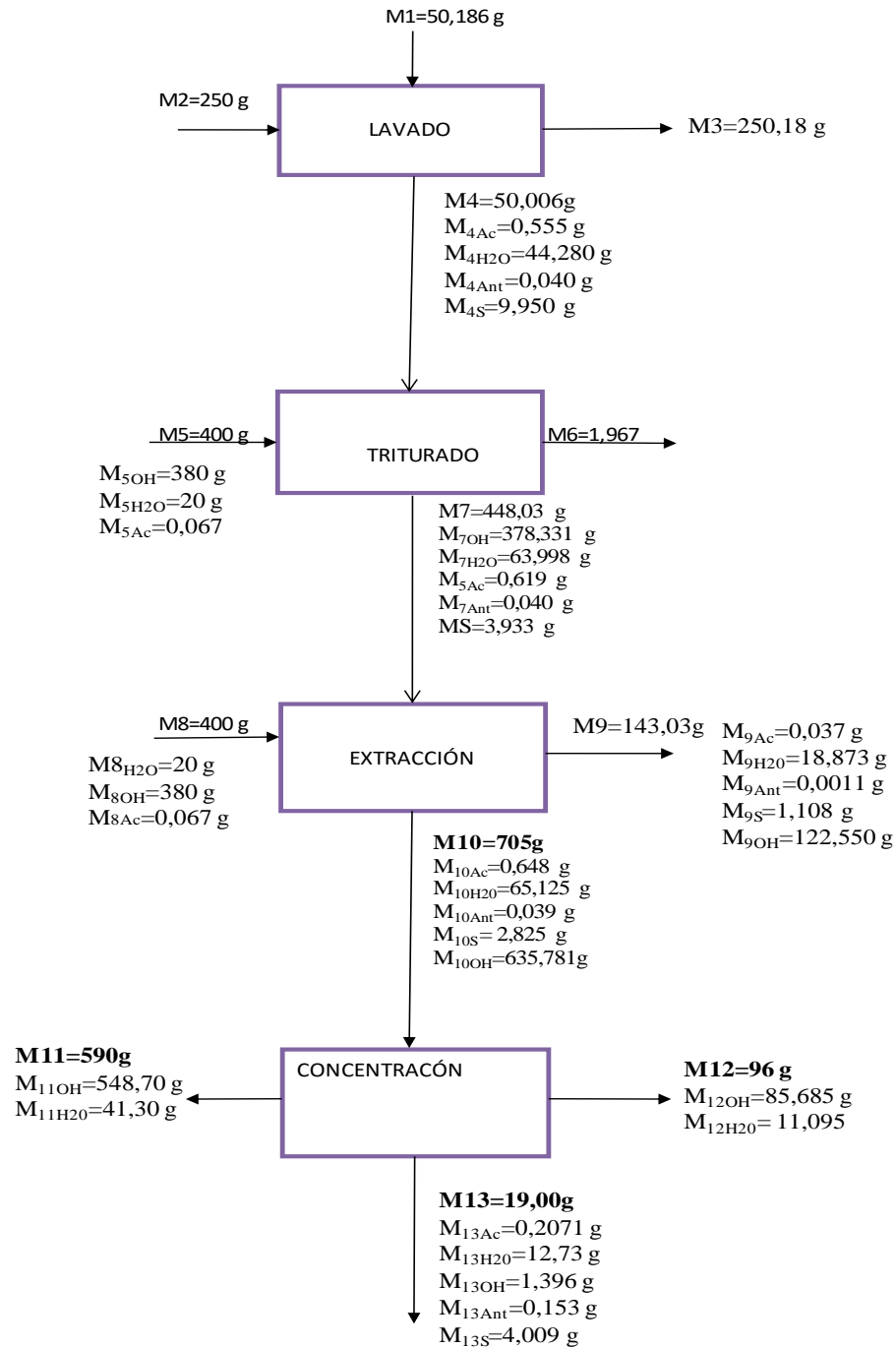


Tabla III- 14 Resumen de balance de materia

Etapa	Corriente	Masa (g)	Corriente	Masa (g)
LAVADO (g)	M1	50,186		
	M2	250		
	M3	250,18		
	M4	50,006	M <sub>4Ac</sub>	0,555
			M <sub>4H2O</sub>	44,280
			M <sub>4Ant</sub>	0,040
			M <sub>4s</sub>	9,950
TRITURADO	M5	400	M <sub>5Ac</sub>	0,067
			M <sub>5H2O</sub>	20
			M <sub>5OH</sub>	380
	M6	1,976		
	M7	448,03	M <sub>7Ac</sub>	0,619
			M <sub>7H2O</sub>	63,998
			M <sub>7Ant</sub>	0,040
			M <sub>7s</sub>	3,933
			M <sub>7OH</sub>	378,331
EXTRACCIÓN + FLTRADO	M8	400	M <sub>8Ac</sub>	0,067
			M <sub>8H2O</sub>	20
			M <sub>8OH</sub>	380
	M9	143,03	M <sub>9Ac</sub>	0,037
			M <sub>9H2O</sub>	18,873
			M <sub>9Ant</sub>	0,0011
			M <sub>9S</sub>	1,108
			M <sub>9OH</sub>	122,550
	CONCENTRADO	M10	705	M <sub>10Ac</sub>
M <sub>10H2O</sub>				65,125
M <sub>10Ant</sub>				0,039
M <sub>10S</sub>				2,825
M <sub>10OH</sub>				635,781
M11		590	M <sub>11OH</sub>	548,70
			M <sub>11H2O</sub>	41,30
M12		96	M <sub>12OH</sub>	85,685
			M <sub>12H2O</sub>	11,095
M13		19	M <sub>13Ac</sub>	0,2071
			M <sub>13H2O</sub>	12,73
			M <sub>13Ant</sub>	0,153

			M <sub>13s</sub>	4,009
			M <sub>13OH</sub>	1,396

**Fuente:** Elaboración propia 2021

### 3.7.2.2 Balance de Energía

En la siguiente sección se realiza el balance de energía en la etapa de extracción y rota-evaporación.

Balance en el agitador magnético

La velocidad a la que se trabaja para el agitado es de 400r rev/min. Para obtener los watts a los que trabaja el agitador se hace una relación entre las velocidades y energía utilizada.

Potencia = 80W

Velocidad =1500 rev/min

$$Q_1 = \frac{80 W * 400 rpm/min}{1500 rpm/min} = 21,333 W = 0,02133 Kw$$

#### 3.7.2.2.1 Balance de Energía Rota Evaporador

La bomba de vacío reduce la presión en 69,9 Kpa, por lo que la presión del sistema es:

$$P_{sist} = P_{atm} - P_{red} \quad \text{Ec.3.15}$$

$$P_{sist} = 83 Kpa - 69,9Kpa$$

$$P_{sist} = 13,1 Kpa$$

A esta presión la temperatura de ebullición del etanol es:

$$T_{bOH} = 34^\circ C$$

#### Datos

**T baño:** 50 °C

**T sistema:** 34°C (extracto en el balón)

**T inicial:** 20 °C del agua

Masa Extracto=19 g=0,0019kg

$C_{p_{Ext}}=0,85 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C}$

Masa de Etanol = 0,63578 Kg

$C_{p_{OH}} = 0,60 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C}$

$M_{H_2O}= 0,0065 \text{ Kg}$

$C_{p_{H_2O}}= 1 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C}$

Balance en el sistema de evaporación

$$Q_T = Q_{Sensible} + Q_{Latente}$$

$$Q_{Sensible} = (m_{OH} * C_{p_{OH}} * \Delta T) + (m_{ext} * C_{p_{ext}} * \Delta T) + (m_{H_2O} * C_{p_{H_2O}} * \Delta T) \quad \text{Ec.3.16}$$

$$Q_{Sensible} = (0,63578 \text{ Kg} * 0,60 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20)) +$$

$$(0,0019 \text{ Kg} * 0,85 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20)) +$$

$$(0,065 \text{ Kg} * 1 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20))$$

$$Q_{Sensible} = 6,476 \text{ Kcal} * \frac{4,184 \text{ Kj}}{1 \text{ K cal}} = 27,095 \text{ Kj}$$

$$Q_{Latente} = m_{H_2O} + \lambda_{vap} + m_{OH} * \lambda_{vap} \quad \text{Ec. 3.17}$$

Para calcular  $\lambda_{vap}$  de alcohol y agua se sigue la siguiente formula (datos tomados del manual del Ingeniero Quimico, Tabla 2-193).

$$\lambda_{vap} = C * (1 - T)^{C_2 + C_3 * T_{Red} + C_4 * (T_{Red})^2}$$

$$\lambda_{vap} = 5,96 \times 10^7 * \left( 1 - \frac{307,15^\circ\text{K}}{514^\circ\text{K}} \right)^{(0,3359 + 0 * 307,15 + 0 * 307,15^2)}$$

$$\lambda_{vap} = 5,96 \times 10^7 * 0,7365 = \frac{4,39 \times 10^7 \text{ j}}{\text{Kmol}}$$



Llevando de gramos a mol

1mol -----46,069 gr de OH

X-----635,781 g

X= 13,80 mol = 0,013 Kmol de alcohol

Por lo tanto:

$$\lambda_{vap} = 4,39 \times 10^7 * 0,013 \text{ Kmol} = 605820 \text{ J} = 605,82 \text{ KJ}$$

$$\lambda_{vapH2O} = C * (1 - T)^{C_2 + C_3 * T_{Red} + C_4 * (T_{Red})^2} \quad \text{Ec.3.18}$$

$$\lambda_{vap} = 5,2053 \times 10^7 * \left(1 - \frac{307,15^\circ K}{647,14^\circ K}\right)^{(0,3199 + (-0,202 * 0,4746 + 0,25795 * 0,4746^2))}$$

$$\lambda_{vap} = 5,2053 \times 10^7 * 0,8364 = 43539834,86 \frac{\text{J}}{\text{Kmol}}$$

Llevando masa de agua a mol

1mol -----18,015 gr de H2O

X-----52,395 g

X= 2,908 mol = 0,002908 Kmol

Por lo tanto:

$$\lambda_{vap} = 43539834,86 \frac{\text{J}}{\text{Kmol}} * 0,002908 \text{ Kmol} = 126613,83 \text{ J} = 126,61 \text{ KJ}$$

$$Q_{Latente} = 605,82 \text{ KJ} + 126,613 \text{ KJ} = 732,433 \text{ KJ}$$

$$Q_T = 27,095 \text{ KJ} + 732,433 \text{ KJ} = 759,528 \text{ KJ}$$

### 3.7.2.2.2 Balance de energía en el condensador

El agua necesaria para condensar el etanol es:

$$E_{\text{vaporación}} = Q_{\text{Condensación}}$$

$$759,528 \text{ Kj} = m_{\text{H}_2\text{O}} * C_P * (\Delta T)$$

$$m_{\text{H}_2\text{O}} = \frac{759,528 \text{ Kj}}{\frac{4,184 \text{ Kj}}{\text{Kg}^\circ\text{C}} * (30 - 20)^\circ\text{C}}$$

$$m_{\text{H}_2\text{O}} = 18,15 \text{ Kg}$$

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

#### 4.1 Análisis de la materia prima

El análisis de la materia prima para el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación se lo realizó en el Centro de Análisis Investigación y Desarrollo (CEAND), a continuación, se muestra el detalle de los resultados.

**Tabla IV- 1 Caracterización de la materia prima**

<b>Parámetro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Valor</b>
Acidez (como ac. Cítrico)	%	1,11
Azúcares totales	%	4,36
Ceniza	%	0,47
Densidad	g/ml	0,98
Fibra	%	1,33
Proteína total	%	1,85
Grasa	%	0,06
Humedad	%	88,55
pH		2,77
Sólidos solubles	°Brix	7,9

**Fuente:** CEANID 2020

#### 4.2 Análisis de Antocianinas en la materia prima

Para realizar el análisis de antocianinas en la materia prima: mora, se realiza la extracción en dos etapas utilizando como disolvente metanol al 1 % acidulado con ácido clorhídrico (HCl), el análisis se realizó por triplicado usando un espectro uv-visible.

**Tabla IV- 2 Tabla análisis de antocianinas en la materia prima**

N° MUESTRA	LONGITUD DE ONDA (nm)					RESULTADO
	PH=1		PH=4,5		$\Delta A$	
	510	700	510	700		
1	0,580	0,002	0,057	0,001	0,522	87,168
2	0,517	0,004	0,06	0,002	0,455	75,980
3	0,528	0,001	0,052	0,004	0,479	79,988
Concentración total de antocianinas						81,045

AM=Antocianinas manométricas

$\Delta A$ = Variación de absorbancia

$$\Delta A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{\lambda_{\text{vis-max}}} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

### 4.3 Datos y resultados de los extractos

La tabla IV-3 muestra las masas de mora con las que se dio inicio al proceso y el extracto obtenido al final del proceso.

**Tabla IV- 3 Datos y resultados de los extractos**

<b>N° Exp</b>	<b>Masa de muestra</b>	<b>Masa extracto (g)</b>	<b>volumen extracto (ml)</b>
1,00	50,05	30,00	34,39
2,00	50,15	20,00	22,93
3,00	50,00	22,00	25,22
4,00	50,01	17,00	19,49
5,00	50,01	19,00	21,78
6,00	50,00	18,00	20,63
7,00	50,01	22,00	25,22
8,00	50,04	18,00	20,63
9,00	50,12	18,00	20,63
10,00	50,01	18,00	20,63
11,00	50,02	16,00	18,34
12,00	50,01	22,00	25,22
13,00	50,01	23,00	26,36
14,00	50,02	19,00	21,78
15,00	50,01	27,00	30,95
16,00	50,02	18,00	20,63
17,00	50,01	25,00	28,66
18,00	50,15	19,00	21,78
19,00	50,01	22,00	25,22
20,00	50,01	15,00	17,19
21,00	50,01	20,00	22,93
22,00	50,00	20,00	22,93
23,00	50,01	22,00	25,22
24,00	50,04	19,00	21,78
25,00	50,01	18,00	20,63
26,00	50,01	19,00	21,78
27,00	50,02	18,00	20,63
28,00	50,01	21,00	24,07
29,00	50,00	21,00	24,07
30,00	50,03	22,00	25,22
31,00	50,02	26,00	29,80
32,00	50,02	18,00	20,63

**Fuente:** Elaboración propia 2021

#### 4.4 Análisis de extracto de antocianinas de mora

Las características del extracto de antocianinas de mora se describen a continuación:

**Tabla IV- 4 Características del extracto de antocianinas**

<b>Parámetro</b>	<b>unidad</b>	<b>Valor</b>
Acidez (como ac. Cítrico)	%	1,09
Azúcares totales	%	3,07
Densidad	g/ml	0,8724
Proteína total	%	0,22
Grasa	%	0,12
Humedad	%	74,35
Solidos solubles	°Brix	21,1
pH(20°C)		4,38

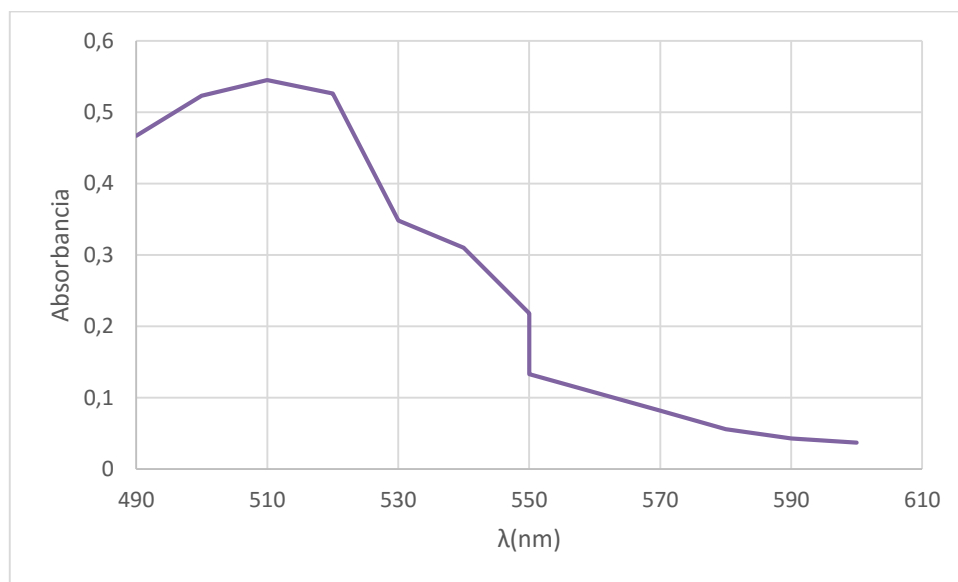
**Fuente:** CEANID

#### 4.5 Determinación de la Máxima Absorbancia

El análisis espectrofotométrico UV, es una técnica comúnmente usada para identificar y cuantificar antocianinas, el espectro de absorción de las antocianinas depende del pH, la absorción máxima esta presenta a 490-550 nm en la región visible.

Para determinar cuál es la longitud de onda de máxima absorción se realiza un barrido de 490 a 600 nm.

**Figura 4- 1 Determinación de máxima absorbancia**



La curva nos muestra que la máxima absorción de antocianinas se puede observar a una longitud de onda de 510 nm.

#### 4.6 Análisis de la concentración de antocianinas

Para la determinación de la concentración de antocianinas, se lo realiza mediante el método de pH diferencial.

##### 4.6.1 Método pH Diferencial

El método de pH diferencial es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4,5 incoloras). Se prepararon diluciones del extracto con solución buffer pH 1 de



cloruro de potasio y con solución buffer pH 4,5 de acetato de sodio. Se midió la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de máxima absorbancia. Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antociana presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina. (Nieves del Socorro Martínez-Cruz, 2011)

La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción será proporcional al contenido de antocianinas (Whitaker, 2001)

Procedimiento: para la determinación de la concentración de antocianinas en los extractos se preparan soluciones buffer a pH 1 y a pH 4,5.

Se toma una alícuota de 0,1 ml y se diluye en 10 ml de solución buffer de cloruro de potasio pH 1 y se mide la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorción de Antocianinas) con un Espectrofotómetro UV- Visible.

Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se mide la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizan contra un blanco de agua ultra pura. Se realiza el mismo procedimiento utilizando solución buffer de pH 4,5 de acetato de sodio, con el fin de eliminar la absorbancia debida a la intensidad de color de pigmentos poliméricos amarrados y antocianinas degradadas (Anexo D).

La concentración de las Antocianinas se expresa como mg cianidina-3 glucósido/1 L de extracto. La concentración de antocianinas monoméricas se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$AT \text{ (mg/L)} = \frac{\Delta A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l}$$

**Donde:**

AT: Antocianinas totales.

$\Delta A$ : Cambio en la Absorbancia.

PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido = 449.2 g/mol.

FD: Factor de dilución.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido = 26900.

l: Longitud de paso de celda, 1cm.

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos.

**El cambio de la absorbancia (A) se calculó de la forma siguiente:**

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4,5}$$

Para un mejor tratamiento de datos se expresa la concentración como mg cianidina-3-glucósido/100 ml de extracto, llevando todos los extractos a un volumen de 100 ml, para que se encuentre en las mismas condiciones para su análisis.

La fórmula queda de la siguiente manera:

$$AT \text{ (mg/L)} = \frac{\Delta A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l}$$

100: Factor de conversión de g a mg y de L a ml.

Tabla IV- 5 Resultado de análisis de antocianinas en los extractos

N° MUESTRA	LONGITUD DE ONDA (nm)				$\Delta A$	RESULTADO
	PH=1		PH=4,5			AT
	510	700	510	700		Mg/100ml
1	0,116	0,004	0,013	0,003	0,102	56,61
2	0,093	0,002	0,012	0,002	0,081	67,80
3	0,097	0,004	0,011	0,002	0,084	63,56
4	0,074	0,002	0,012	0,003	0,063	61,79
5	0,122	0,002	0,021	0,006	0,105	92,34
6	0,092	0,004	0,014	0,004	0,078	72,81
7	0,103	0,002	0,015	0,004	0,090	68,31
8	0,065	0,002	0,008	0,002	0,057	52,43
9	0,051	0,002	0,007	0,002	0,044	40,82
10	0,049	0,005	0,005	0,001	0,040	37,11
11	0,082	0,003	0,008	0,002	0,073	76,19
12	0,080	0,001	0,010	0,002	0,071	53,77
13	0,049	0,004	0,008	0,003	0,040	28,89
14	0,054	0,004	0,010	0,004	0,044	38,67
15	0,076	0,004	0,012	0,002	0,062	38,07
16	0,086	0,005	0,008	0,001	0,074	68,92
17	0,111	0,004	0,012	0,002	0,097	64,79
18	0,097	0,003	0,012	0,002	0,084	73,83
19	0,097	0,003	0,011	0,002	0,085	64,52
20	0,064	0,002	0,011	0,003	0,054	60,12
21	0,182	0,003	0,029	0,008	0,158	87,95
22	0,096	0,005	0,016	0,005	0,080	66,63
23	0,115	0,003	0,013	0,003	0,102	77,15

<b>24</b>	0,063	0,003	0,009	0,002	0,053	46,92
<b>25</b>	0,045	0,002	0,007	0,002	0,038	35,25
<b>26</b>	0,053	0,006	0,007	0,001	0,041	35,74
<b>27</b>	0,088	0,003	0,010	0,002	0,077	71,81
<b>28</b>	0,075	0,001	0,009	0,002	0,067	53,32
<b>29</b>	0,044	0,003	0,008	0,003	0,036	28,63
<b>30</b>	0,052	0,004	0,011	0,004	0,041	30,89
<b>31</b>	0,070	0,004	0,011	0,003	0,058	37,24
<b>32</b>	0,083	0,005	0,003	0,001	0,076	70,85

**Fuente:** Elaboración propia 2021

#### **4.7 Rendimiento de Antocianinas**

El rendimiento de concentración de antocianinas se realiza mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{\text{masa del extracto} * \text{Concentración de antocianinas}}{\text{masa materia prima} * \text{Cantidad de Antocianinas en la Materia Prima}} * 100$$

**Tabla IV- 6 Rendimiento de Antocianinas en los Extractos**

N° MUESTRA	TEMPERATURA	RELACION STO/STE	PH	GRANULOMETRIA	RENDIMIENTO (%)
1	25	1:10	3,1	ML	47,987
2	50	1:10	3,1	ML	38,241
3	25	1:05	3,1	ML	39,554
4	50	1:05	3,1	ML	29,708
5	25	1:10	4	ML	49,625
6	50	1:10	4	ML	37,071
7	25	1:05	4	ML	42,507
8	50	1:05	4	ML	26,679
9	25	1:10	3,1	MCM	20,735
10	50	1:10	3,1	MCM	18,890
11	25	1:05	3,1	MCM	34,469
12	50	1:05	3,1	MCM	33,453
13	25	1:10	4	MCM	18,793
14	50	1:10	4	MCM	20,774
15	25	1:05	4	MCM	29,073
16	50	1:05	4	MCM	35,074
17	25	1:10	3,1	ML	45,806
18	50	1:10	3,1	ML	39,560
19	25	1:05	3,1	ML	40,147
20	50	1:05	3,1	ML	25,504
21	25	1:10	4	ML	49,748
22	50	1:10	4	ML	37,694
23	25	1:05	4	ML	48,003
24	50	1:05	4	ML	25,201
25	25	1:10	3,1	MCM	17,948
26	50	1:10	3,1	MCM	19,202
27	25	1:05	3,1	MCM	36,544
28	50	1:05	3,1	MCM	31,666
29	25	1:10	4	MCM	17,005
30	50	1:10	4	MCM	19,215
31	25	1:05	4	MCM	27,376
32	50	1:05	4	MCM	36,063

**Fuente:** Elaboración propia 2021

En la tabla IV-5, se muestran los resultados y la condición más favorable a las que se obtuvo una mayor cantidad de antocianinas respecto a la materia prima.

El máximo rendimiento es obtenido a una temperatura de 25°C, una relación soluto/solvente 1:10(g/ml), pH 4 y moras licuadas (con un tamaño de partículas entre 6 y 25 micras).

#### 4.8 Análisis estadístico del diseño experimental

Para el tratamiento estadístico de los datos del diseño factorial, se utilizó el programa Minitab 18

En la siguiente tabla se muestra el resumen del diseño

**Tabla IV- 7 Resumen del diseño**

Factores:	4	Diseño de la base:	4:16
Corridas:	32	Réplicas:	2
Bloques:	1	Puntos centrales (total):	0

**Fuente:** Elaboración propia, Minitab 18.

#### 4.8.1 Análisis de varianza

La varianza es una medida de dispersión que representa la variabilidad de una serie de datos respecto a su media, el análisis de varianza muestra las principales variables que afectan a las variables respuesta del diseño factorial del proyecto, las cuales son, temperatura, relación soluto/disolvente, pH y granulometría.

**Tabla IV- 8 Análisis de varianza (ANOVA)**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	15	3223,22	214,88	83,69	0
Lineal	4	1653,54	413,39	160,99	0
T	1	260,62	260,62	101,5	0
R	1	57,05	57,05	22,22	0
pH	1	0,01	0,01	0	0,958
G	1	1335,87	1335,87	520,26	0
Interacciones de 2 términos	6	1450,94	241,82	94,18	0
T*R	1	9,38	9,38	3,65	0,074
T*pH	1	0,21	0,21	0,08	0,777
T*G	1	421,35	421,35	164,1	0
R*pH	1	0,22	0,22	0,08	0,776
R*G	1	1007,84	1007,84	392,51	0
pH*G	1	11,95	11,95	4,65	0,047
Interacciones de 3 términos	4	104,53	26,13	10,18	0
T*R*pH	1	3,3	3,3	1,28	0,274
T*R*G	1	24	24	9,35	0,008
T*pH*G	1	72,36	72,36	28,18	0
R*pH*G	1	4,88	4,88	1,9	0,187
Interacciones de 4 términos	1	14,21	14,21	5,53	0,032
T*R*pH*G	1	14,21	14,21	5,53	0,032
Error	16	41,08	2,57		
Total	31	3264,31			

**Fuente:** Elaboración propia, Minitab 18

**Donde:**

T=Temperatura

R=Relación soluto/disolvente

G=Granulometría

Los valores P de los factores e interacciones obtenidos de la tabla IV-8 que son inferiores a 0,05 son valores significativos, mismos que indican que estos factores e interacciones son muy influyentes para obtener un mayor rendimiento en el proceso de extracción de antocianinas.

Las variables que muestran mayor significancia son temperatura, relación soluto/disolvente, granulometría, temperatura \* granulometría, relación soluto/disolvente \* granulometría y temperatura\* pH\*granulometría, de igual manera se puede observar en la tabla que los valores insignificantes son aquellos que son mayor a 0,05, como la variable pH que tiene un valor de 0,958 que no es significativa para el proceso.

**Tabla IV- 9 Resumen del modelo variable respuesta**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7,26947	96,87%	94,13%	87,48%

**Fuente:** Elaboración propia, Minitab 18

El valor cuadrático ajustado es muy prometedor para predecir la variable respuesta en posteriores experimentos.

#### **4.8.2 Determinación del rendimiento de antocianinas y modelo matemático para diseño factorial 2<sup>4</sup>**

Para determinar el modelo matemático se realiza una regresión con todas las variables significativas; temperatura, relación soluto/disolvente, granulometría, temperatura



\*granulometría, relación soluto/disolvente \* granulometría y temperatura \*pH\* granulometría, como se muestra en la tabla IV-8.

**Tabla IV- 10 Variables para la relación**

<b>Término</b>	<b>Efecto</b>	<b>Coef</b>	<b>EE del cof</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor p</b>	<b>FIV</b>
Constante		32,479	0,283	114,66	0	
T	-5,708	-2,854	0,283	-10,07	0	1
R	2,67	1,335	0,283	4,71	0	1
pH	0,03	0,015	0,283	0,05	0,958	1
G	-12,922	-6,461	0,283	-22,81	0	1
T*R	-1,083	-0,541	0,283	-1,91	0,074	1
T*pH	0,163	0,081	0,283	0,29	0,777	1
T*G	7,257	3,629	0,283	12,81	0	1
R*pH	-0,164	-0,082	0,283	-0,29	0,776	1
R*G	11,224	5,612	0,283	19,81	0	1
pH*G	-1,222	-0,611	0,283	-2,16	0,047	1
T*R*pH	0,642	0,321	0,283	1,13	0,274	1
T*R*G	1,732	0,866	0,283	3,06	0,008	1
T*pH*G	3,007	1,504	0,283	5,31	0	1
R*pH*G	-0,781	-0,39	0,283	-1,38	0,187	1
T*R*pH*G	1,333	0,666	0,283	2,35	0,032	1

**Fuente:** Elaboración propia Minitab 18.

#### **Ecuación de regresión lineal variable respuesta: rendimiento de Extracción**

Según los coeficientes indicados en la tabla IV-10, el modelo matemático para la

Obtención de Extracto de Antocianinas de Mora responde a la ecuación:

$$\begin{aligned} \%R = & 32,479 - 2,854 T + 1,335 R + 0,015 \text{ pH} - 6,461 G - 0,541 T*R + 0,081 T*pH \\ & + 3,629 T*G - 0,082 R*pH + 5,612 R*G - 0,611 \text{ pH}*G + 0,321 T*R*pH \\ & + 0,866 T*R*G + 1,504 T*pH*G - 0,390 R*pH*G + 0,666 T*R*pH*G \end{aligned}$$

El proyecto de investigación tiene la finalidad de determinar los efectos principales de las variables como temperatura, relación soluto/disolvente, pH, granulometría y no así

los efectos combinados ya que al combinar las variables no muestra los efectos verdaderos que tiene cada variable sobre el proceso por lo que la ecuación de regresión lineal de la variable respuesta queda de la siguiente manera:

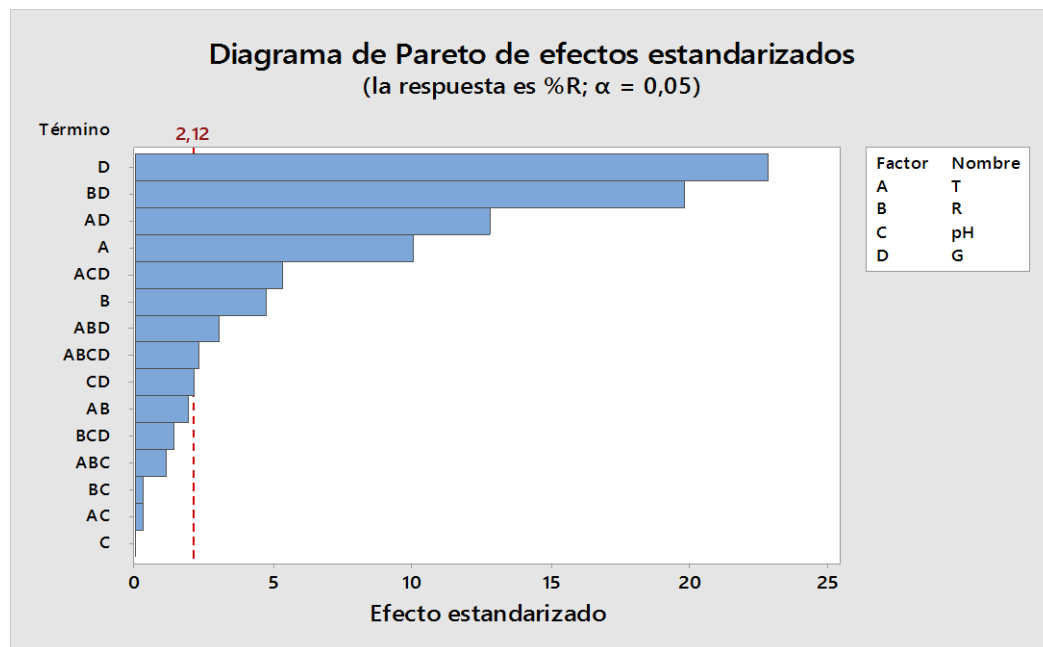
$$\%R = 32,479 - 2,854 T + 1,335 R + 0,015 \text{ pH} - 6,461 G$$

Como se puede ver los valores en la ecuación, la granulometría es la que representa mayor importancia esto debido a que a menor tamaño de la partícula se obtendrá una mayor extracción, seguido de la temperatura y la relación soluto/disolvente, de igual manera se puede observar que la que representa menor importancia en el proceso es la variable pH.

#### 4.8.3 Diagrama de Pareto

Un diagrama de Pareto es una gráfica de barras en la cual las barras se ordenan de la frecuencia de ocurrencias más alta a la frecuencia de ocurrencias más baja, el diagrama de Pareto se utiliza para jerarquizar los efectos de mayor a menor, de forma que pueda priorizar los esfuerzos en cuanto a mejorar la calidad. (Minitab, 2018)

**Figura 4- 2 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados**



**Fuente:** Elaboración Propia Minitab 18

En la figura 4-2. Muestra los factores influyentes en los experimentos, estos factores son significativos en el diseño cuando las barras sobrepasan la línea crítica (línea segmentada en el gráfico), tomando en cuenta los factores principales, se puede observar en la gráfica que el factor D y A son los más significativos en el proceso mas no así el factor C.

#### 4.9 Costos

Para poder determinar el costo de la investigación se procede a evaluar los costos en materia prima, materiales de laboratorio, reactivos, análisis y material de escritorio

**Tabla IV- 11 Costos Principales**

ÍTEM	DESCRIPCIÓN	Q	VALOR UNITARIO (BS)	TOTAL (BS)
Materia Prima	Moras (Kg)	2	40	80
Solvente	Etanol (L)	24	9	216
	Metanol (L)	0,5	540	270
Reactivos	Ácido clorhídrico (0,1 N) (ml)	200	0,3	60
	Ácido cítrico(Kg)	0,5	10	5
	Solución buffer KCl PH1 (L)	1	200	200
	Solución buffer PH4,5 (L)	1	140	140
	Agua destilada	4	7	28
	<b>SUBTOTAL (A)</b>			<b>999</b>

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 12 Costo de materiales

ÍTEM	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	VALOR UNITARIO (BS)	TOTAL(BS)
Botellas de vidrio ámbar	100 ml	32	8	256
papel filtro	Whatman 42	70	2,8	196
pipetas	1 ml	1	20	20
	10 ml	1	15	15
vaso de precipitado	250 ml	2	20	40
Papel aluminio		5	15	75
<b>Subtotal (B)</b>				<b>602</b>

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 13 Costo de análisis

ÍTEM	DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	VALOR UNITARIO (BS)	TOTAL(BS)
MATERIA PRIMA	Acidez	1	30	30
	Materia grasa	1	90	90
	Humedad	1	40	40
	Azucares totales	1	100	100
	Ceniza	1	70	70
	Densidad		40	40
	Solidos solubles	1	20	20
	pH	1	20	20
ETRACTO	acidez	1	30	30
	materia grasa	1	90	90
	azucares totales	1	100	100
	Solidos solubles	1	50	50
	densidad	1	40	40
	proteína	1	100	100
	pH	1	20	20
<b>Subtotal (C)</b>				<b>840</b>

Fuente: Elaboración Propia 2021

**Tabla IV- 14 Otros costos**

<b>DESCRIPCIÓN</b>	<b>UNIDAD</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>VALOR UNITARIO (BS)</b>	<b>TOTAL(BS)</b>
Internet	Meses	6	35	210
Mano de obra	Meses	6	1500	9000
Impresión		6	65	390
Anillado		3	8	24
Empastado		3	50	150
Subtotal (D)				9774

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

**Tabla IV- 15 Resumen -Costos total**

<b>DESCRIPCION</b>	<b>TOTAL(BS)</b>
Detalles de costos de principales	999
Detalle de costos de materiales	602
Detalle de costos de análisis	840
Detalles de costos de material de apoyo	9774
<b>TOTAL</b>	12.215

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

#### **4.10. Costo de producción**

A partir de los balances de materia y energía puede estimarse el costo de producción de antocianinas.

De los 50 g de Mora se extraen aproximadamente 20 g de extracto concentrado.

**Tabla IV- 16 Costo de funcionamiento de equipos**

Proceso	Requerimiento energético				
	potencia (kw)	Tiempo (hr)	Energía (Kw/h)	costo unitario (Bs)	Costo Total (Bs)
Agitación	0,055	3,000	0,165	0,920	0,152
Filtración	0,570	0,500	0,285	0,920	0,262
Concentración	1,320	1,300	1,716	0,920	1,579
Total					1,993

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

**Tabla IV- 17 Costos de insumos**

Insumos	cantidad	unidad	costo unitario (Bs)	costo total (Bs)
Agua lavado	0,2	litro	0,07	0,014
Agua rota vapor	3,8	litro	0,07	0,266
Agua refrigerante	18	litro	0,07	1,26
Papel filtro	2	unidad	1	2
Botella de vidrio ámbar	1	unidad	5	5
<b>Total</b>				<b>8,54</b>

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

**Tabla IV-18 Costos de Materia prima**

Materia prima	Cantidad	Unidad	Costo unitario	Costo total (Bs)
Mora	0,05	Kilogramo	40	2
Etanol	1	litro	9	9
Ácido cítrico	0,00055	litro	10	0,0055
<b>TOTAL</b>				<b>11,0055</b>

**Fuente:** Elaboración Propia 2021

$$CP = MP + MO + CI$$

Dónde:

CP= Costo de producción

MP=Materia prima

MO=Mano de obra

CI= Costos indirectos de fabricación

Considerando que el proceso tiene un tiempo de duración de 6 horas y tomando en cuenta el sueldo mínimo se calcula el salario de las 6 horas de trabajo, que es de 17,16 Bs.

Reemplazando datos en la fórmula se tiene:

$$CP= 11,0055 + 17,17 + (1,993+8,54) =38,70$$

El costo total de producción aproximado es de 38,70 Bs para la producción de 19 g de Extracto de Antocianinas de Mora partiendo de 50,006 g de mora, con 1 litro de etanol al 96°GL.

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**



## 5.1 Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente proyecto, se concluye de la siguiente manera:

- Se realizó la determinación de parámetros fisicoquímicos del fruto de mora, en el Centro de Análisis Investigación y Desarrollo (CEANID) dando los siguientes resultados:

Acidez: 1,11%

Azúcares totales: 4,36 %

Ceniza: 0,47 %

Densidad: 0,98 g/ml

Fibra: 1,33%

Proteína total: 1,85 %

Grasa: 0,06 %

Humedad: 88,55%

Sólidos solubles: 7,9 °Brix;

pH= 2,77

- Se realiza la selección del método de extracción de colorante natural (Antocianinas) de mora mediante una matriz de decisión, de igual manera se realiza para el solvente de extracción, buscando un mayor rendimiento, de esta manera se concluye que el método de extracción es, extracción con agitación magnética y el mejor solvente es etanol de 96°GL siguiendo el diseño del modelo factorial de  $2^K$ , donde K es el número de variables en el proceso experimental.
- Se realizó el balance de materia y energía en el cual se determina que se obtuvo 19 g de extracto concentrado de antocianinas de los cuales 15,31 mg corresponden a antocianinas pura, de igual manera se determina una pérdida de 96 g en la etapa de concentración, recuperando así 590 ml de etanol, con un rendimiento del proceso de 49,62%. En el balance de energía se determina que el calor necesario es de

759,528 KJ, mientras que el agua necesaria para para condensar el etanol es de 18,15 kg.

- Las antocianinas al igual que otros colorantes naturales tienden a ser demasiado inestables frente a diferentes factores como; temperatura, pH, luz, agua, entre otros. Para el presente trabajo de investigación se tomó en cuenta cuatro factores: temperatura entre 25-50°C; relación soluto-solvente: 1:5 y 1:10, pH: 3,1 y 4; y Tamaño de la partícula: moras licuadas y moras cortadas por la mitad, donde se determinó que las mejores condiciones para la extracción de colorante natural (antocianinas) de mora se dan a una temperatura de 25°C (ya que a elevadas temperaturas el extracto sufre degradación), Relación soluto-solvente 1:10 g/ml, pH 4, y moras licuadas, porque a menor tamaño de la partícula existe mayor superficie de contacto y menor distancia con el solvente y se logra una mayor extracción con un rendimiento de 49,62%
- Se realizó la determinación de parámetros fisicoquímicos del extracto de antocianinas, en el Centro de Análisis Investigación y Desarrollo (CEANID) dando los siguientes resultados:
  - Acidez: 1,09%
  - Azúcares totales: 3,07 %
  - Densidad: 0,8724 g/ml
  - Proteína total: 0,22%
  - Grasa: 0,12 %
  - Humedad: 74,35%
  - pH= 4,38
  - sólidos solubles= 21, 1° Brix
- Realizando un análisis de costos del proceso se pudo determinar que el costo total de producción aproximado es de 38,70 Bs para la producción de 19 g de Extracto de Antocianinas de Mora partiendo de 50,006 g de mora, con 1 litro de etanol al 96°GL.

- Realizando el análisis estadístico se pudo determinar que las variables que más influyen en el proceso es la granulometría porque a menor tamaño de la partícula se obtendrá una mayor extracción, seguido de la temperatura ya que es otra variable importante en el proceso ya que se pudo determinar que a menor temperatura se logra una mayor extracción de antocianinas, de igual manera se pudo determinar que la variable pH es la que muestra menor importancia ya que se demostró estadísticamente que esta variable no refleja significancia en el proceso de extracción.

## 5.2 Recomendaciones

- Utilizar este mismo ensayo para evaluar otros rangos de temperatura que pueden ser interesantes para encontrar la temperatura adecuada para la extracción de antocianinas.
- Se recomienda el uso de solventes no tóxicos en la etapa de extracción, debido a que, si se desea utilizar este tipo de extractos en industrias alimenticias es vital que el mismo no sea tóxico, porque puede afectar la calidad de vida del ser humano.
- Las Antocianinas como colorante natural, al ser liposoluble tiene ventaja de formar parte de productos como jugos, dulces, para enriquecer y dar valores agregados a dichos productos. Así también se recomienda estudiar la calidad y uso apropiado en los alimentos.
- Se recomienda estudiar la estabilidad térmica del extracto de antocianinas (colorante) en bebidas, empleando métodos de pasteurización.
- De igual manera se recomienda obtener el producto en polvo incluyendo al proceso una etapa de secado, para prolongar el tiempo de vida útil, ya que en estado líquido es muy inestable.
- Para futuras investigaciones se recomienda realizar la investigación a diferentes rangos de pH, con niveles más altos y bajos, de los trabajados, debido que a pH (3,1 y 4) no se encontró significancia para el proceso.
- Se recomienda realizar investigaciones relacionados al uso de colorantes naturales en la industria alimentaria en especial para embutidos ya que el interés de consumir alimentos más sanos está en auge.