ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción

"Obtención De Colorante Para Su Uso En Yogurt A Partir De La Flor De Jamaica (Hibiscus sabdariffa) y Del Mortiño (Vaccinium myttillus L.)"

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO DE ALIMENTOS

Presentada por:

Walter Vicente Menéndez Govea

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2008

A G R A D E C I M I E N T O

Al Ing. Francisco Torres, Director de Tesis, al Ing. Luís Miranda, a la M.B.A. Mariela Reyes, a la Ing. Maria Isabel Jiménez, profesores, amigos y al trip team. Esto no hubiera sido posible sin ninguno de ustedes. Gracias Totales.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

_____	_____
Ing. Luís Miranda S. PRESIDENTE – VOCAL	Ing. Francisco Torres A. DIRECTOR DE TESIS

_____

Ing. Karin Coello O.
VOCAL

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponden exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL"

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

_____

Walter Menéndez Govea

ABREVIATURAS

°C	Grados Centígrados
cm.	Centímetros
gr.	Gramos
atm.	Atmósfera
RPM	Revoluciones por minuto
mm. Hg.	Milímetros de Mercurio
mBar.	Milibar
ml.	Mililitro
mg/L	Miligramos por Litro
A	Absorbancia
PM	Peso Molecular
FD	Factor de dilución
nm.	Nanometro
ul	Microlitro
M^{-1} cm^{-1}	moles $^{-1}$ centímetros $^{-1}$

RESUMEN

El uso de colorantes sinteticos en alimentos ha sido cuestionado ya que todo indica que su consumo indiscriminado podria tener efectos cancerígenos. Debido a esto los colorantes naturales extraidos de plantas pueden ser utilizados con fines alimenticios.

En este trabajo investigativo, se utilizo como materia prima al mortino y a la flor de la jamaica, frutos que poseen antocianinas y que son subutilizados en nuestro país, se muestran aspectos generales sobre los colorantes antocianicos. Ademas se describen los métodos de extracción utilizados tomando como solvente una solución alcoholica acidificada (etanol – acido cítrico) en diferentes concentraciones. Luego se analizo la posibilidad del uso del colorante en yogurt.

La materia prima fue sometida al proceso de liofilización disminuyendo en un 30% el tiempo de extracción del colorante en comparación con la fruta al natural.

Una vez obtenido el colorante se determino la concentración de los extractos (mg/L) mediante el método del pH diferencial y con estos valores obtenidos estudiamos las posibilidades de tinción en yogurt.

Las muestras fueron sometidas a un análisis sensorial por medio de una prueba triangular utilizando panelistas semientrenados. Se realizaron 3 muestreos con 20 panelistas cada uno.

Se pudo establecer la efectivdad de la tinción del colorante extaido utilizando 0.5 gr del extracto del mortino y 1.75 gr del extracto de la flor de la jamaica al

comparar por medio de colorimetría con una muestra de yogurt de mora industrial que fue tomado como referencia.

INTRODUCCIÓN

El uso de colorantes naturales que son extraídos de plantas no producen daños a la salud y no requieren de certificación para su empleo, entre estos pigmentos naturales se encuentran las antocianinas.

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos que se hallan principalmente en flores y frutos y están incluidas en la lista de compuestos naturales conocidos por su mecanismo de poderosos antioxidantes y tienen un potencial considerable en la rama alimentaria como aditivo por su carácter inocuo.

En este estudio se determinan los parámetros para el proceso de extracción del colorante antocianico, para posteriormente determinar la funcionabilidad del colorante en yogurt.

CAPITULO 1

1. GENERALIDADES

1.1. Pigmentos naturales

El color es una característica de gran importancia. Cada alimento tiene un color característico y definido.

Los colores se deben a diferentes compuestos orgánicos, generalmente de origen vegetal.

Los pigmentos se pueden clasificar en 7 grupos:

1. Carotenoides
2. Clorofilas
3. Antocianinas
4. Flavonoides

5. Taninos

6. Betalaninas

7. Mioglobina y hemoglobina (origen animal)

La mayoría de los colorantes naturales de frutos están en el protoplasma de las células vegetales, en los plástidos.

* **Generalidades, tipos y estabilidad de las antocianinas**

El nombre *antocianina* se deriva de dos palabras griegas (*antos*, flor y *ciano*, azul oscuro) que significan *planta azul*.

Son hidrosolubles, originan los colores rojo, azul, rosa y violeta de flores, frutas y verduras.

Tienen características de glucósidos y están formados por una molécula de ANTOCIANIDINA (AGLICONA) unida a una fracción de carbohidrato.

La estructura de las antocianidinas consiste en un grupo FLAVILIO que a su vez está formado por una molécula de BENZOPIRANO unida a un anillo FENILICO.

Los monosacáridos comúnmente encontrados son D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa. También disacáridos como gentobiosa, rutinosa y soforosa.

Las antocianinas contienen grupos hidroxilos, la porción azúcar es la responsable de la solubilidad.

Las antocianidinas pueden “acilarse”, es decir el azúcar puede esterificarse con una o más moléculas de acido p-cumárico, ferúlico, cafeico o acético.

El color de cada antocianina depende de su estructura química, del pH al que se encuentre y de la presencia de sales con las que interacciona.

Las antocianinas más importantes son:

- **PELARGONIDINA**

Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1- benzopirilo

- **CIANIDINA**

Cloruro de 3,3',4',5,7-pentahidroxiflavilio

- **DELFINIDINA**

Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5,trihidroxifenil)-1-benzopirilo

- **PEONIDINA**

Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavilio

- **PETUNIDINA**

Cloruro de 3,3'4',5,7-pentahidroxi-5'-metoxiflavilio

- **MALVIDINA**

Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3',5'-dimetoxiflavilio

Las antocianinas cambian de color por los cambios de pH. Son más estables a pH bajo y son destruidos en la presencia de oxígeno a un pH más alto.

En medio ácido es de color rojo y muy intenso a pH muy bajos. La molécula a pH neutro es color violeta.

Los recipientes de aluminio inducen también a cambios en coloraciones.

Debido a su solubilidad se pierden por lixiviación.

Microorganismos pueden presentar actividad enzimática de antocianasa.

Varios factores influyen en la velocidad a la que se descompone el pigmento: alta temperatura de almacenamiento, pH elevado, oxígeno en espacio de cabeza, presencia de ácido ascórbico.

Su conservación a temperatura de refrigeración (4 ºC) aumenta la vida de almacenamiento 6 veces en comparación con el almacenamiento a temperatura ambiente y 60 veces con respecto al almacenamiento en un lugar caliente (38 ºC).

1.2. Materia prima: Flor de Jamaica, Mortiño

A continuación se describe la materia prima utilizada para la extracción:

- **Flor de jamaica (Hibiscus sabdariffa L.)**

  La rosa de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), también conocida como rosa de Abisinia o flor de Jamaica, es un hibisco de la familia de las Malváceas, originario de África tropical, desde Egipto y Sudán hasta Senegal, aunque, debido a sus propiedades medicinales, se cultiva con éxito en América Central y del Sur y en el sudeste asiático, incluido el sur de China.

  Se trata de una planta herbácea anual que puede alcanzar de 3 a 5 metros de altura. Es propia de climas secos subtropicales, montanos, de matorral espinoso. Las hojas, tri o pentalobuladas, tienen unos 15 cm de longitud, alternas en el tallo, y las flores, de color rojo en la base y más pálido en los extremos, tienen de 8 a 10 cm de diámetro, aunque lo más destacable de la planta es el cáliz, carnoso y de un color rojo intenso, que se recoge en el momento en que alcanza un tono vinoso.

La parte que más se aprovecha de la planta de jamaica es el cáliz o flor, que en México se utiliza en bebidas refrescantes, gelatinas e infusiones, así como para la preparación de mermeladas, ates, jalea, cremas y otros derivados.

El análisis fitoquímico de la jamaica ha revelado la presencia en ella de ciertas sustancias naturales que se encuentran en las plantas llamadas antocianinas que tienen propiedades antioxidantes y que no presentan actividad tóxica ni mutagénica.

Las propiedades alimenticias y medicinales de la flor de jamaica la hacen aceptable en muchos lugares del mundo sin importar su clima, se toma como agua fresca o como té.

La flor de la jamaica es antiparasitaria, diurética y ligeramente laxante. Ayuda al proceso digestivo y renal, es útil para bajar de peso y para controlar el grado de colesterol.

La jamaica contiene sustancias llamadas antocianinas que son antioxidantes similares a los que se encuentran en el mortiño, arándano, mirtilo.

- **Mortiño (Vaccinium myttillus L.)**

El mortiño conocido como el blueberry andino, es un producto natural de los páramos ecuatorianos, no se conoce que existan cultivos comerciales sino únicamente pequeñísimas parcelas y/o chaparros de montaña donde la fruta crece en forma silvestre. Su hábito de crecimiento produce una sola cosecha extendida entre octubre y diciembre de cada año. El consumo en el Ecuador es básicamente en fresco y algo procesado en mermeladas, se consume en fresco en la época de Día de los Difuntos para preparar la tradicional colada morada.

Internacionalmente, Estados Unidos es el principal productor y consumidor de *blueberries* en el mundo, siendo también el principal importador. Estados Unidos produce *blueberry* entre Abril y Octubre, y Canadá desde Julio a Octubre, estos países importan la fruta a lo largo de todo el año, con volúmenes crecientes al principio del otoño (entre Julio y Septiembre) cuando la demanda crece entre Diciembre y Marzo, cuando no tienen producción propia. Chile exporta su fruta a Estados Unidos entre Noviembre y Abril; Nueva Zelanda desde Diciembre hasta Marzo. Argentina y México también figuran como proveedores importantes.

Existen diferentes variedades de mortiño que crecen en el Ecuador: Mortiño negro, Mortiño rojo, mortiño rosado, mortiño americano gigante, Jersey, Tifblue, Climax, Elliot.

Las zonas de cultivo del mortiño en el Ecuador son las partes altas de la Cordillera, zonas de páramos desde el Angel en el Carchi hasta Tambo en Cañar.

El clima templado o frío (8 – 16 °C) y con una humedad entre el 60 – 80 % son las características ambientales adecuadas para su desarrollo.

El terreno seleccionado para su plantación debe ser fértil, plano, poco influenciado de sistemas acuíferos, evitando sitios expuestos a la ventosidad.

La madurez fisiológica se identifica cuando el fruto empieza a tornarse blando, de coloraciones claras por lo menos en un 40%, se debe considerar la rapidez de maduración de acuerdo a la variedad.

La fruta luego de la cosecha debe almacenarse a una temperatura de 1 a 5 °C con una humedad relativa del 80 - 90%.

Los tipos de antocianinas que tiene el mortiño son delphinidinas, antocianina, cyanidina, petunidina, peonidina y

malvidina, que son las responsables de la capacidad antioxidante del arándano.

CAPITULO 2

2. PRUEBAS EXPERIMENTALES

2.1. Materiales

Los equipos utilizados para las pruebas experimentales fueron: Rotavaporador, Espectrofotómetro, Liofilizador, Colorímetro.

2.2. Métodos de extracción

Las antocianinas se obtienen mediante extracción con agua, agua acidificada, dióxido de carbono, metanol o etanol a partir de las cepas naturales de hortalizas y frutas comestibles.

La metodología utilizada para la extracción de pigmentos antocianicos es la descrita por Wrolstad (2001).

Este método consiste en extraer el colorante antocianico por medio de una solución alcohólica en un medio acidificado para luego eliminar dicha porción alcohólica de la solución concentrando en un rotavapor a presión de vacío.

El resultado es una solución concentrada de colorante antocianico, polvo o pasta de color rojo púrpura, con olor ligero característico, destinado a usarse en la industria alimentaria.

Para la extracción de colorante antociano investigadores han utilizado las siguientes soluciones:

a) Metanol, HCl

b) Etanol, HCl

c) Cloroformo, Acetona

d) Etanol, Acido Acético

e) Metanol, Acido Acético

f) Etanol, Acido Cítrico

La mezcla alcohol - acido escogida para este trabajo investigativo fue Etanol – Acido Cítrico, tomando en cuenta que el concentrado final será de grado alimenticio, debido a que las demás soluciones como el Metanol y el cloroformo podrían provocar daños irreversibles para la salud o podría dejar un olor residual como el caso del Acido Acético y Acetona.

2.2.1. Fruta natural

Se utilizó el mortiño y la flor de la jamaica de forma natural, se realizó una selección separando la fruta dañada físicamente y con ataque de microorganismos. La fruta seleccionada fue sometida a un proceso de molido.

La extracción de las antocianinas a partir del mortiño y la flor de la jamaica se efectuaron usando como disolvente Etanol - Acido Cítrico en diferentes concentraciones. Se utilizaron 3 diferentes grados de pureza de Etanol (40°, 70°, 90°) y dos diferentes concentraciones de Acido Cítrico en relación peso / volumen (0.01%, 0.03%).

El grado de pureza del Etanol influye en la extracción del concentrado, mientras mayor sea el grado de pureza del Etanol mayor será la concentración del extracto. Sin embargo,

la extracción se realizó con 3 grados diferentes de pureza de Etanol para poder así, comparar los perfiles de antocianinas obtenidos cuando se emplean diferentes concentraciones.

El extracto se obtuvo a partir de 10 gr. de mortiño y de la flor de la jamaica en estado natural respectivamente con 100 ml. de solvente (Etanol – Acido Cítrico), se mantuvieron las muestras a temperatura de refrigeración (10 °C) por 24 horas.

Se filtró al vacío las muestras tres veces (0.66 – 0.79 atm) utilizando Papel Filtro Whatman No.1. Posterior al filtrado se concentró en un Rotavapor LABOROTA 4001 HEIDOLPH (Figura 2.1) a 50 ° C a 150 RPM y con un vacío de 25 mm Hg. hasta eliminar la porción alcohólica.

FIGURA 2.1. ROTAVAPORADOR LABOROTA 4001 HEIDOLPH Y BOMBA DE VACIO WELCH 1.0 VACUUM PUMP

Se obtuvieron 6 extractos diferentes con cada una de las materias primas utilizadas y estos fueron colocados en tubos de ensayo envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se guardó a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.

2.2.2. Fruta liofilizada

Luego de haber realizado extracciones sucesivas con la fruta natural, se logró determinar que el agua que contenía la fruta cedía al medio que la rodeaba luego de las 24 horas que se mantenía en refrigeración, provocando así demora en la etapa de extracción de la porción alcohólica en el rotavapor, debido a esto se implementó un sistema alternativo, que consistió en liofilizar la fruta al natural usando un Liofilizador LABCONCO FREEZE DRY SYSTEM / FREEZONE 4.5 (Figura 2.2).

Se aplicó el proceso de liofilización con el fin de remover el agua que pudiera contener la fruta, para luego someterla al proceso de extracción de la porción alcohólica reduciendo así el tiempo de exposición al calor y evitar la degradación de la antocianina.

FIGURA 2.2. LIOFILIZADOR LABCONCO FREEZE DRY SYSTEM / FREEZONE 4.5

Se requiere que el liofilizador se mantenga a una presión de vacío de 133 x 10^{-3} mBar. La temperatura alcanza hasta – 40 °C y es en este momento en que el modo automático del liofilizador empieza a funcionar.

A continuación se describe la relación del porcentaje de humedad de la fruta natural con la fruta liofilizada:

Jamaica

Se tomaron 100 gr. de la flor de la jamaica molida y se llevó a 100 ml. de agua destilada colocando 50 ml. en cada recipiente del liofilizador (PROPER FLASK).

Luego de someterla al proceso automatizado de liofilización se obtuvo como resultado 20.2 gr. de flor de jamaica liofilizada a partir de 100 gr. de flor de jamaica al natural.

Mortiño

Se tomaron 100 gr. del mortiño molida y se llevó a 100 ml. de agua destilada colocando 50 ml. en cada recipiente del liofilizador (PROPER FLASK).

Igualmente como se realizó con la flor de la jamaica se sometió al proceso automatizado de liofilización y se obtuvo como resultado 17.8 gr. de mortiño liofilizado a partir de 100 gr. de mortiño al natural.

El total de fruta natural que fue sometida al proceso de liofilización fue de 800 gr. de mortiño y de la flor de la jamaica demorando por cada producto 5 horas.

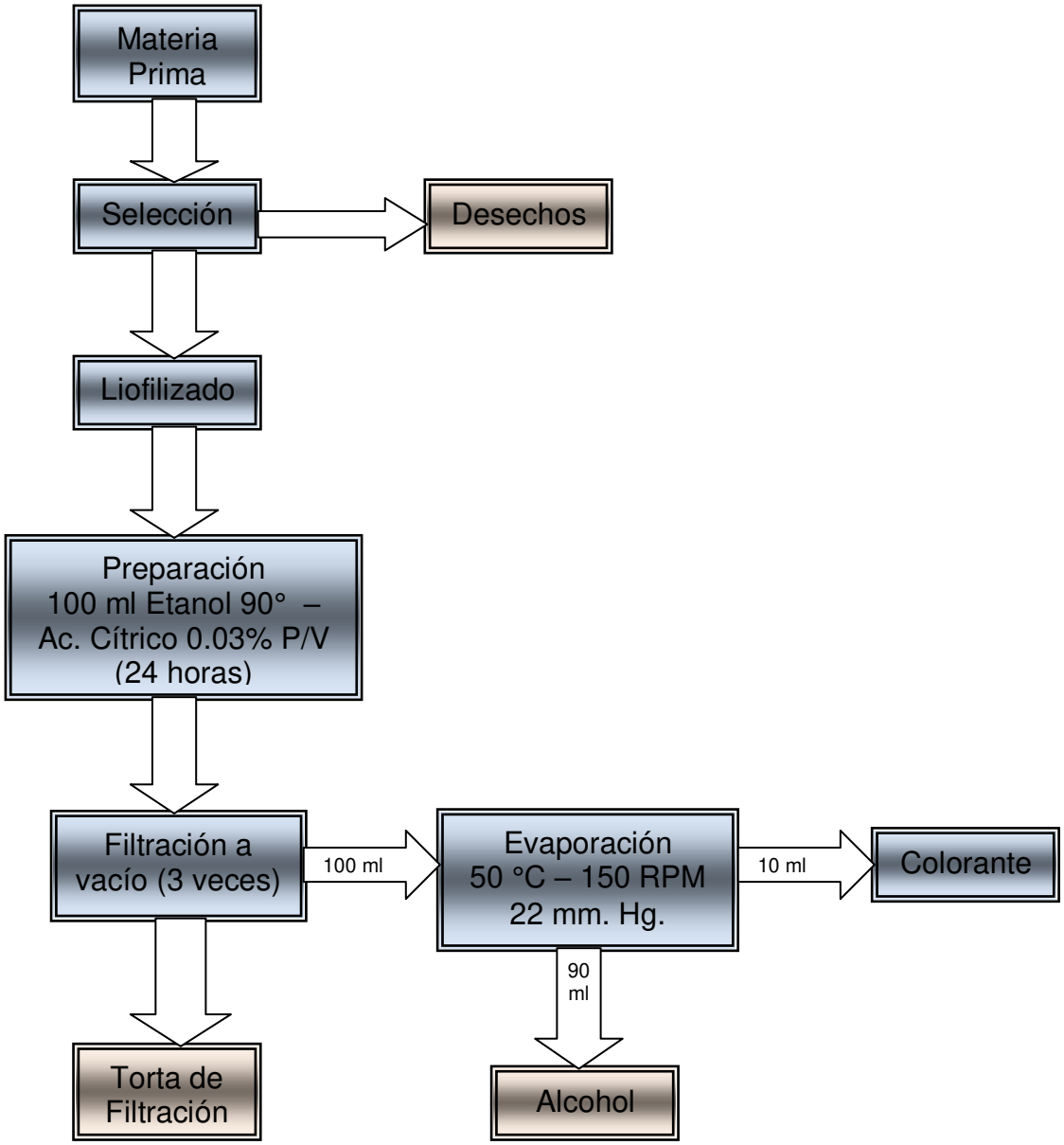
La extracción de las antocianinas a partir del mortiño y la flor de la jamaica liofilizadas se efectuó de igual manera como se extrajo de la fruta natural utilizando como disolvente Etanol - Acido Cítrico en diferentes concentraciones. Se utilizaron 3 diferentes grados de pureza de Etanol (40°, 70°, 90°) y dos diferentes concentraciones de Acido Cítrico en relación peso / volumen (0.01%, 0.03%).

A diferencia de la extracción del colorante antociano utilizando fruta al natural, el extracto obtenido a partir de la fruta liofilizada se extrajo a partir de 1.78 gr. de mortiño y de 2.02 gr. de la flor de la jamaica respectivamente con 100 ml. de solvente (Etanol – Acido Cítrico), debido a que en el proceso de liofilización el mortiño perdió el 98.22% de humedad y la jamaica el 97.9 %.

De igual manera se mantuvieron las muestras a temperatura de refrigeración (10 °C) por 24 horas.

Se filtró al vacío las muestras tres veces (0.66 – 0.79 atm) utilizando Papel Filtro Whatman No.1. Posterior al filtrado se concentró en un Rotavapor LABOROTA 4001 HEIDOLPH a 50 ° C a 150 RPM y con un vacío de 25 mm Hg. hasta eliminar la porción alcohólica (Figura 2.3).

Se obtuvieron 6 extractos diferentes con cada una de las frutas liofilizadas las cuales fueron colocadas en tubos de ensayo envueltos en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se guardó a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis.



Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 2.3. DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COLORANTE ANTOCIANICO A PARTIR DE LA FRUTA LIOFILIZADA UTILIZANDO ALCOHOL 90 – AC. CÍTRICO 0.03% (P/V)

2.3. Metodología para determinar la concentración del colorante

Para la obtención de la concentración de la antocianina se utilizó el método del pH diferencial (Wrolstad 2001). La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia y permite una rápida y exacta medida de la antocianina total incluso en presencia de otros compuestos interferentes.

La concentración de antocianinas se calculó de la siguiente manera:

$$\textbf{Concentración (mg/L)} = (A * PM * FD * 1000) / (\varepsilon * 1) \qquad (1)$$

Donde:

$$A = (A_{\lambda vismax} - A_{\lambda 700nm})_{pH1} - (A_{\lambda vismax} - A_{\lambda 700nm})_{pH4.5} \qquad (2)$$

Siendo $A_{\lambda vismax}$ la absorbancia máxima de la antocianina, $A_{\lambda 700nm}$ es la lectura de la absorbancia en 700 nm, ε es la absortividad molar de la antocianina mayoritaria, PM es el peso molecular de la antocianina mayoritaria y FD es el factor de dilución.

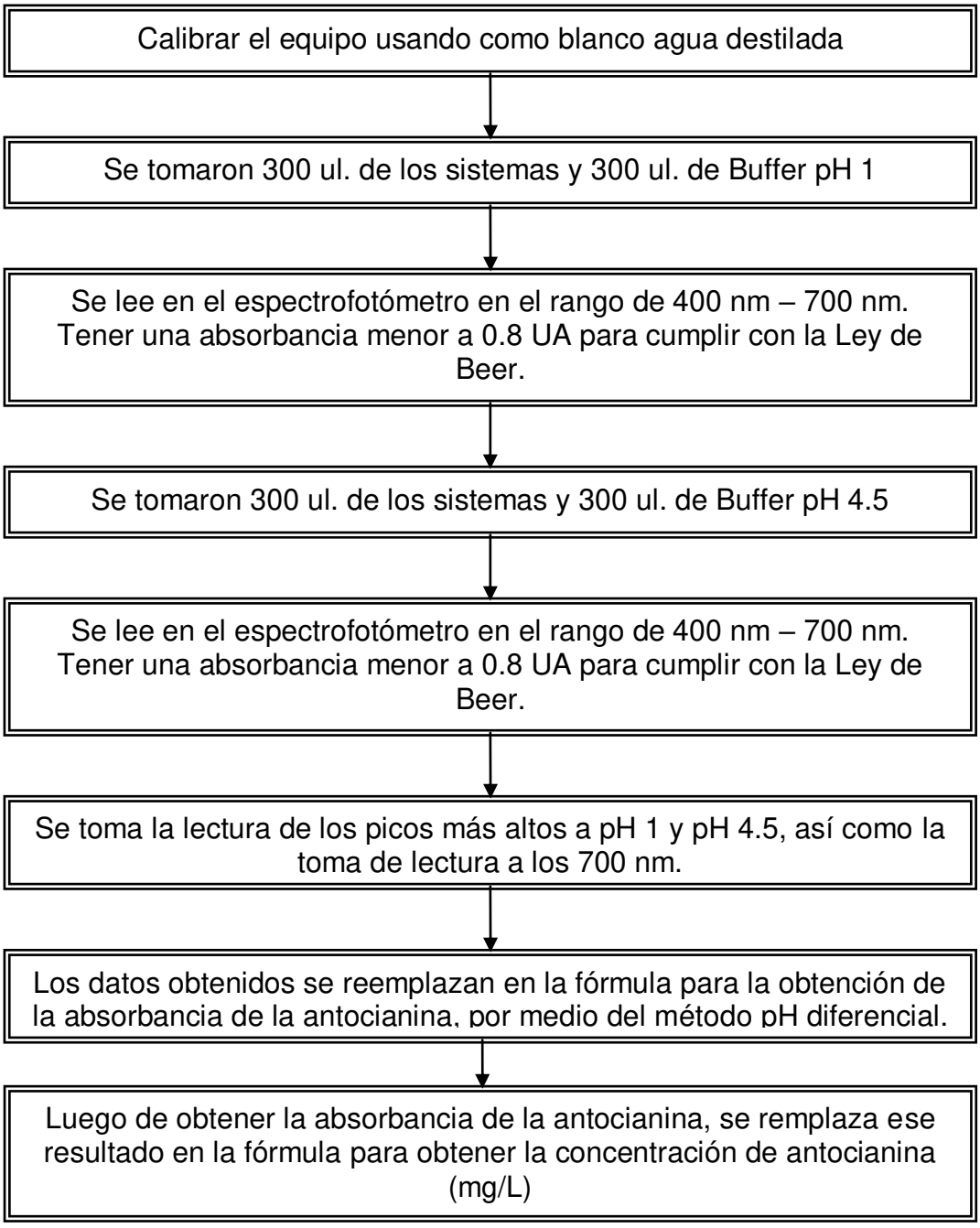
Se adicionaron 300 µl del concentrado en 300 µl de buffer pH 1 de KCl 0.025 M y se hizo un barrido espectroscópico en un Espectrofotómetro SPECTRONIC GENESYS 5 (Figura 2.4) desde

400 nm hasta 700 nm. Así mismo, se realizó este procedimiento para la muestra con el buffer de pH. 4.5 de Acetato de Sodio 0.4 M.

Se debe tener en cuenta que al realizar la lectura en el espectrofotómetro en el rango de 400 nm – 700 nm se debe obtener una absorbancia menor a 0.8 UA para así cumplir con la Ley de Beer.

Luego se tomó el valor de $A_{\lambda vismax}$ para la muestra a los dos pH's y el valor de $A_{\lambda 700nm}$ también. Para los cálculos se tomó en consideración que la antocianina mayoritaria es cianidina-3-glucósido (Van Buren, 1970), cuya ε es de 29600 M^{-1} cm^{-1}, de peso molecular 44902 gr / mol (Figura 2.5).

FIGURA 2.4. ESPECTROFOTOMETRO SPECTRONIC GENESYS 5



Fuente:http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/quintero_h_cm/capitulo6.pdf

FIGURA 2.5. METODOLOGÍA PARA OBTENER LA CONCENTRACIÓN DE LA ANTOCIANINA (mg/L) POR EL MÉTODO pH DIFERENCIAL.

2.4 Posibilidades de uso en yogurt

Se tomó como base para la experimentación 100 gr. de yogur natural al cual se le añadió mediante agitación el extracto obtenido de la flor de la jamaica y del mortiño.

Se prepararon 8 muestras por cada extracto. Los sistemas analizados fueron los siguientes: 0.25 gr., 0.5 gr., 0.75 gr., 1 gr., 1.25 gr., 1.5 gr., 1.75 gr., 2 gr. Para la evaluación se utilizó un colorímetro Nippon Denshoku Model ND-7B (Figura 2.6) y se midió el color en términos de Y, X, Z. Estos valores triestímulo sirven para obtener la Longitud de la Onda, Pureza y la Luminosidad por medio del Sistema CIE 1931 XYZ, en el cual el color es especificado en dos maneras, una de las cuales usa los valores triestímulo de X, Y, Z, y la otra, las coordenadas de cromaticidad *x, y*. La luminosidad es dada por el valor Y

La relación de X, Y, Z con *x, y*, se da por las siguientes ecuaciones:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

Los valores de *x, y* se trazan sobre el Diagrama de Cromaticidad (Figura 2.7) para obtener la Longitud de la Onda (nm) y la pureza (%), los cuales juntos especifican a un color.

Se midió el color del yogurt de mora industrial que sirvió como referencia y se obtuvieron los siguientes valores en el colorímetro:

Y = 55.6 X = 57.4 Z = 56.9

Aplicando el Sistema CIE 1931 XYZ, para determinar la Longitud de la Onda y la Pureza del color, se hallaron los valores *x, y* de la muestra.

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

$$\mathrm{x} = \frac{57.4}{57.4+55.6+56.9} \qquad \mathrm{y} = \frac{55.6}{57.4+55.6+56.9}$$

$$\mathrm{x} = 0.337 \qquad \mathrm{y} = 0.327$$

Con los valores *x, y* obtenidos se trazaron en el Diagrama de Cromaticidad y se obtuvieron los siguientes valores: Longitud de la Onda = 592 nm, Pureza del color = 11 %, Luminosidad = 55.6

Este mismo proceso se realizó para las 16 muestras de yogurt natural que fueron coloreadas con sus respectivos extractos y se eligió la que permitía obtener los valores de Longitud de Onda, Pureza y Luminosidad más parecidos a la muestra de yogurt industrial que se tomó como referencia.

FIGURA 2.6. COLORÍMETRO NIPPON DENSHOKU MODEL ND-7B

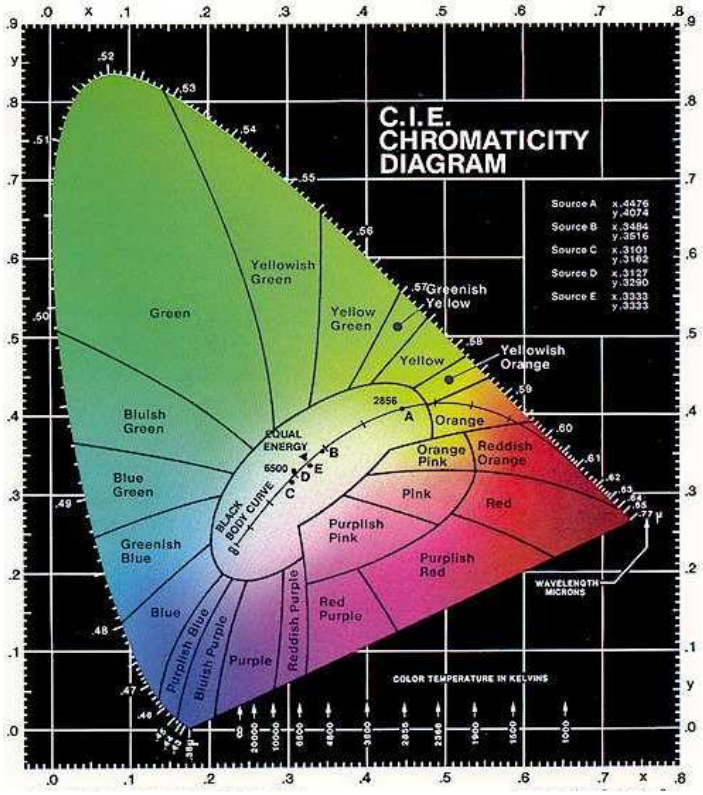


FIGURA 2.7. DIAGRAMA DE CROMATICIDAD CIE 1931 XYZ PARA LA OBTENCION DE LA LONGITUD DE ONDA Y PUREZA DEL COLOR.

2.5 Análisis sensorial

Se aplicó para el análisis sensorial la Prueba Triangular que es una prueba discriminativa en la que no se requiere conocer la sensación subjetiva que produce el alimento en el analista, debido a que solo se deseaba establecer si existía o no diferencia en color entre el yogurt con el extracto y el yogurt industrial.

Se utilizaron para las pruebas sensoriales las dos muestras de yogurt que obtuvieron los valores de colorimetría más aproximados a los de la muestra de referencia.

Para las pruebas discriminativas pueden usarse jueces semientrenados, debido a esto, se utilizó como jueces a estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos de la ESPOL que cursan niveles intermedios y que están familiarizados con el análisis sensorial.

A cada juez semientrenado se le presentó 3 muestras codificadas, de las cuales dos eran las muestras de yogurt natural al que se le añadió el extracto de mortiño en la misma concentración, la otra era la muestra de yogurt de mora que sirvió de referencia, y se le pidió que identifique la muestra diferente. Este mismo análisis se realizó con la

muestra de yogurt natural que se le añadió el extracto de la flor de jamaica.

Para la prueba triangular que tenga validez estadística, se realizaron 20 encuestas por triplicado con cada una de las muestras.

CAPITULO 3

3. ANALISIS DE RESULTADOS

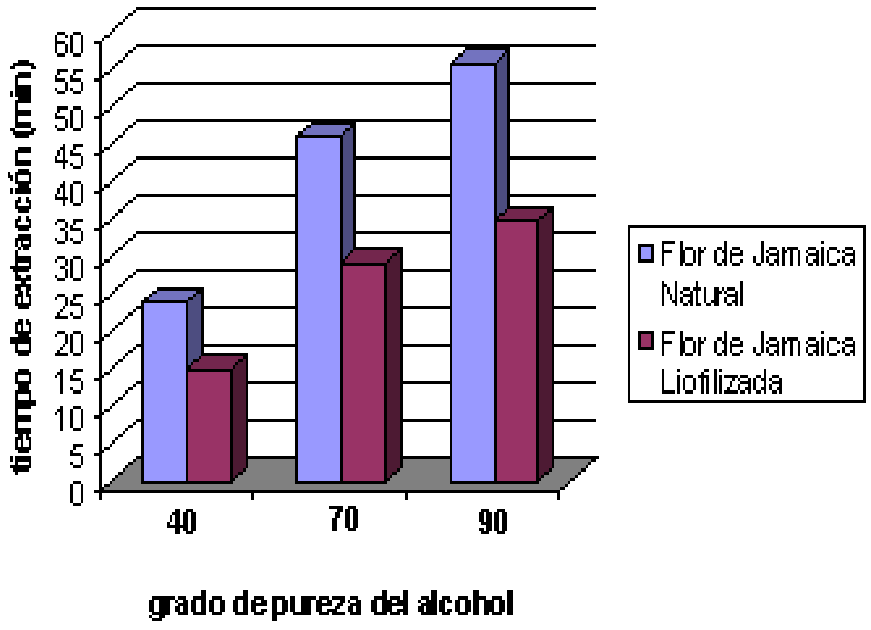
3.1 Selección del método de extracción

El análisis de la selección del método de extracción se basó en el tiempo que se tomaba en extraer la porción alcohólica de los extractos analizados.

Los diferentes grados de pureza del alcohol influyeron sobre el tiempo de residencia de las soluciones Alcohol – Acido en el rotavaporador debido que a mayor pureza de este mayor tiempo se necesitó para evaporar la porción alcohólica de la solución.

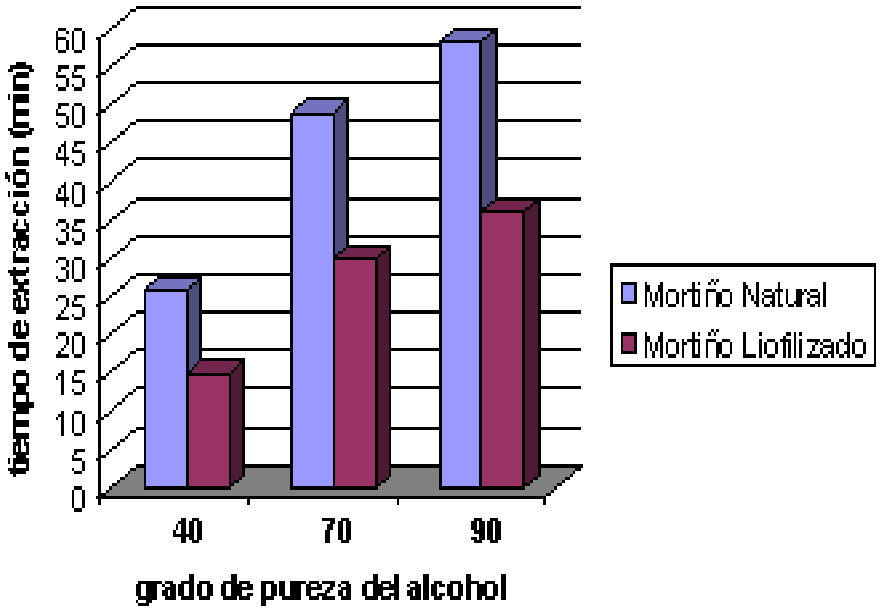
El porcentaje de Acido Cítrico utilizado no influyó en el tiempo de extracción del alcohol debido a esto el análisis se realizó sobre las soluciones alcohólicas que contenían 0.03% de Acido Cítrico que proporcionaron mayor concentración de antocianinas por extracto.

Como se observa en la Figura 3.1 y en la Figura 3.2 el tiempo de extracción en la fruta natural es mayor que en la fruta liofilizada, tanto en la flor de la jamaica como en el mortiño.



Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.1. TIEMPO DE EXTRACCION DE LOS DIFERENTES GRADOS DE PUREZA DEL ALCOHOL EN LOS EXTRACTOS DE LA FLOR DE LA JAMAICA LIOFILIZADA Y NATURAL



Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.2. TIEMPO DE EXTRACCION DE LOS DIFERENTES GRADOS DE PUREZA DEL ALCOHOL EN LOS EXTRACTOS DEL MORTIÑO LIOFILIZADO Y NATURAL

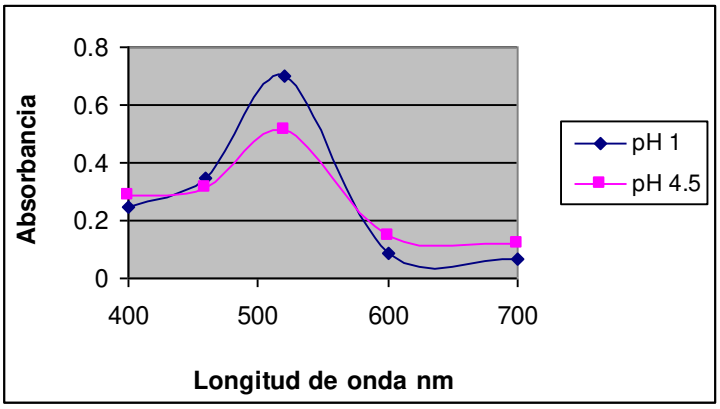
3.2 Determinación de la concentración de los extractos

Las curvas de los espectros de absorción de los extractos del mortiño y de la flor de la jamaica natural y liofilizada se encuentran en las figuras 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17, 3.18, 3.19, 3.20, 3.21, 3.22, 3.23, 3.24, 3.25, 3.26.

Por medio de los espectros se establece que la antocianina que se encuentra en mayor concentración en las muestras extraídas es la

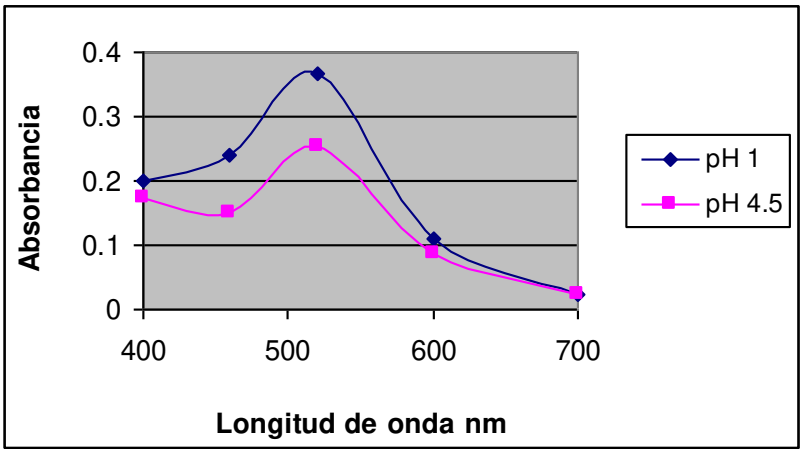
cianidina debido a que el mayor pico se localiza en todas las graficas es a 520 nm de longitud de onda.

Por medio de los cálculos realizados utilizando el método de pH diferencial se determinó la concentración de la antocianina presente (mg/L). Los resultados se encuentran en las tablas 1, 2, 3 y 4. Estos resultados se pueden comparar con las tablas 5 y 6 de trabajos investigativos relacionados.



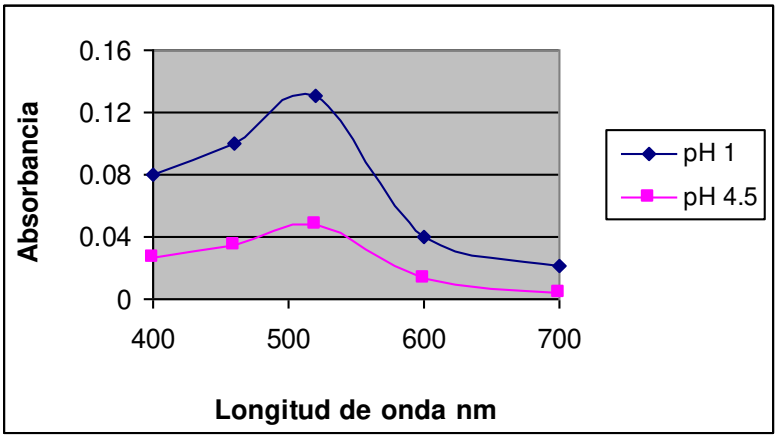
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.3. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



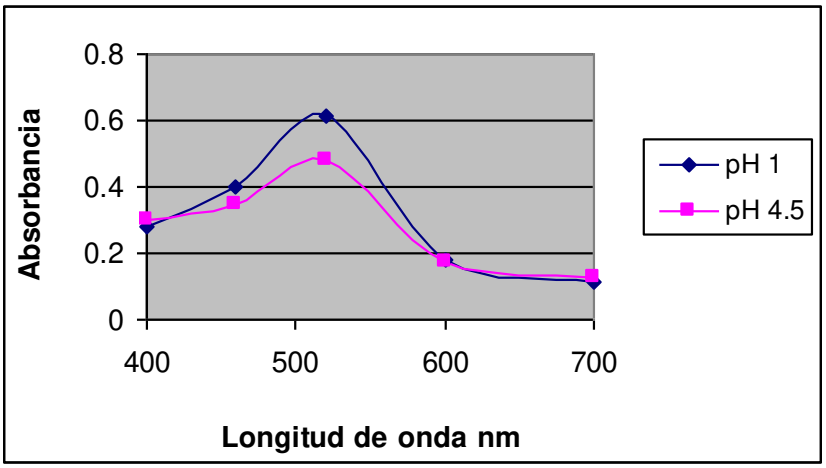
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.4. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



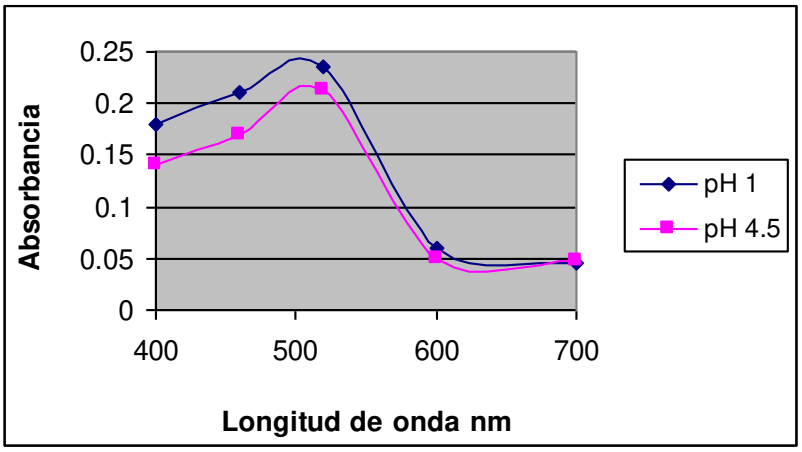
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.5. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



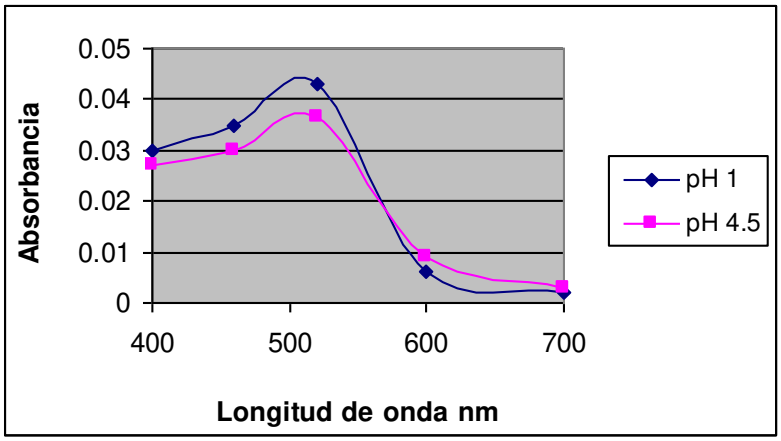
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.6. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



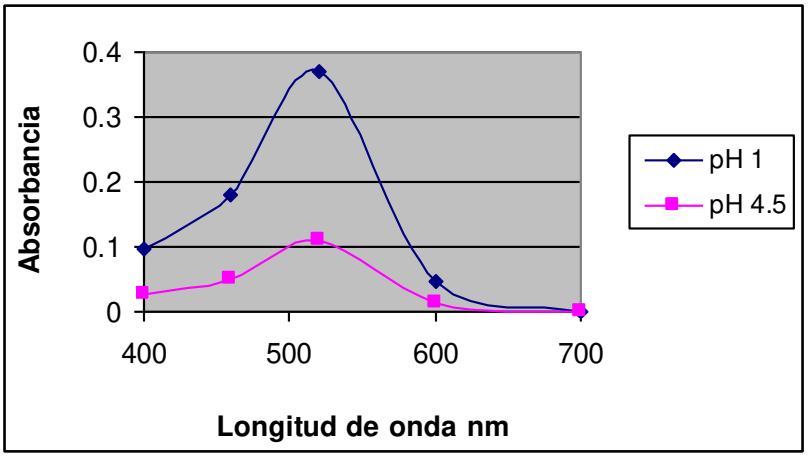
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.7. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



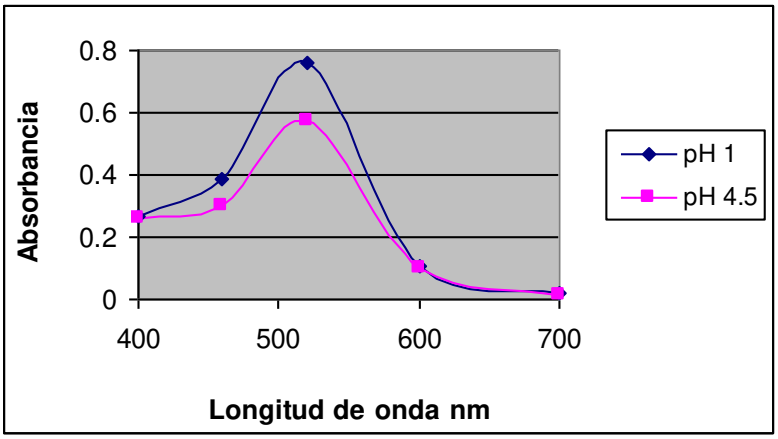
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.8. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO LIOFILIZADO EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



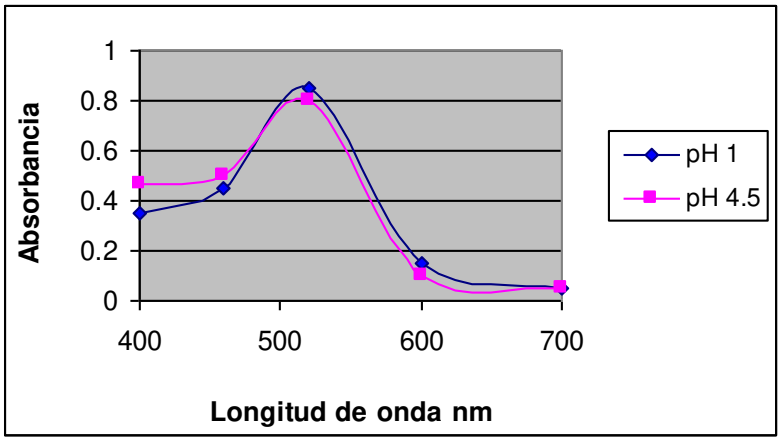
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.9. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



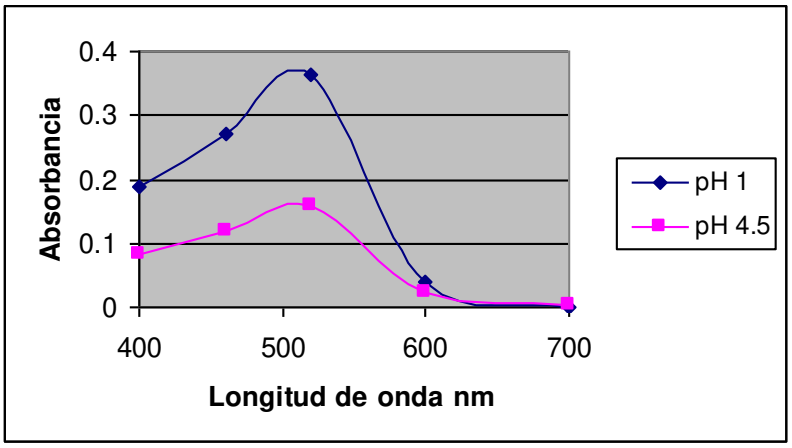
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.10. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



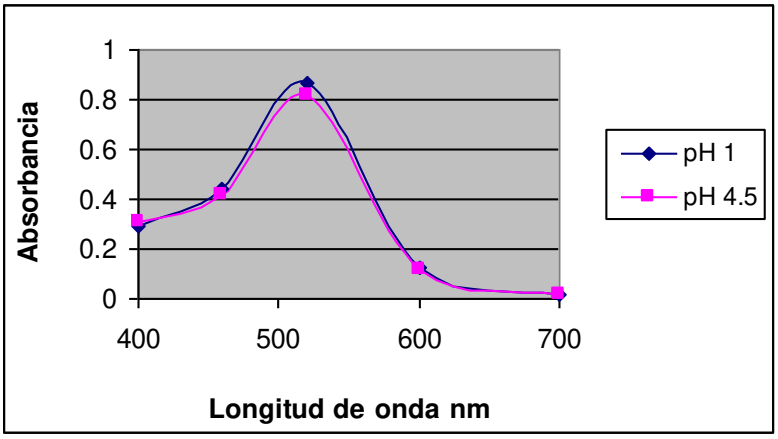
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.11. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



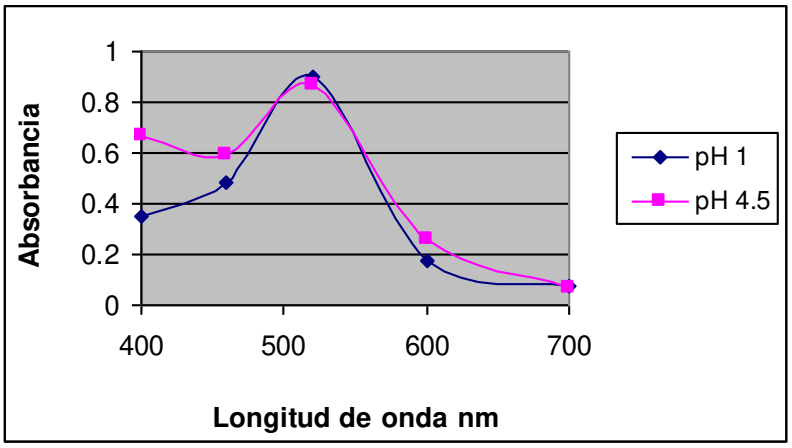
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.12. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



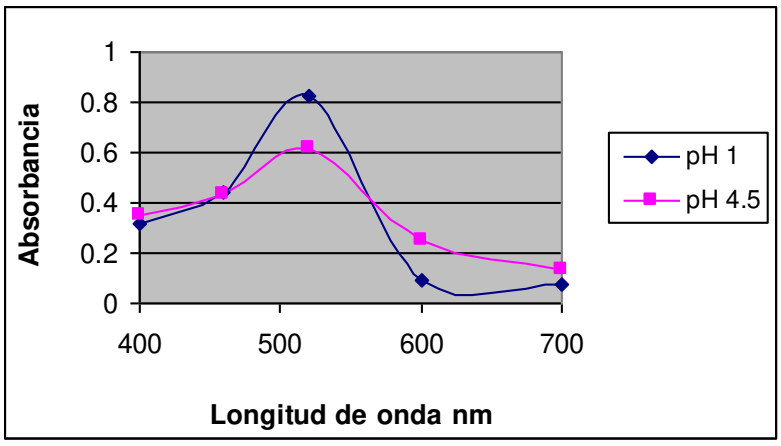
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.13. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



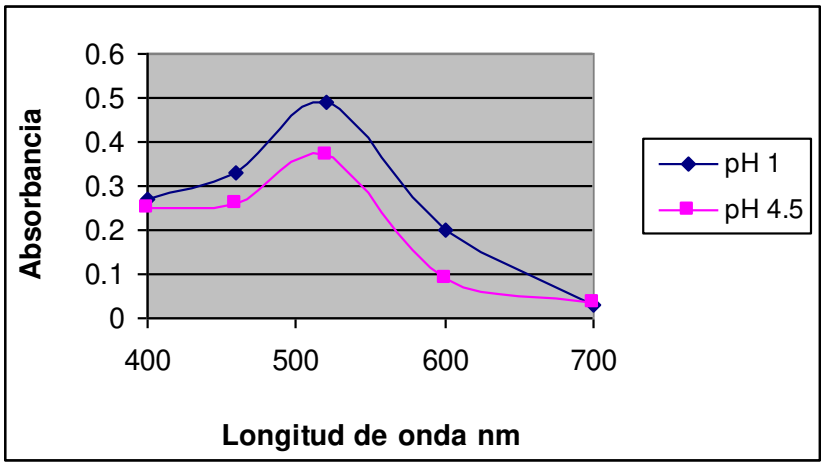
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.14. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA LIOFILIZADA EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



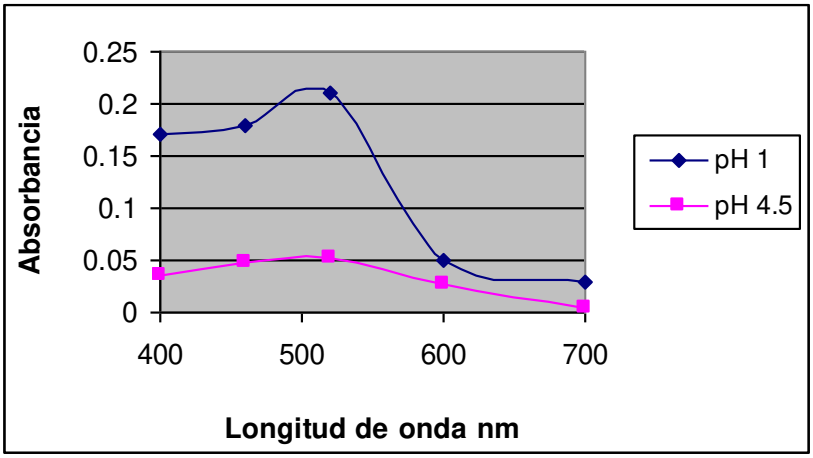
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.15. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 90 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



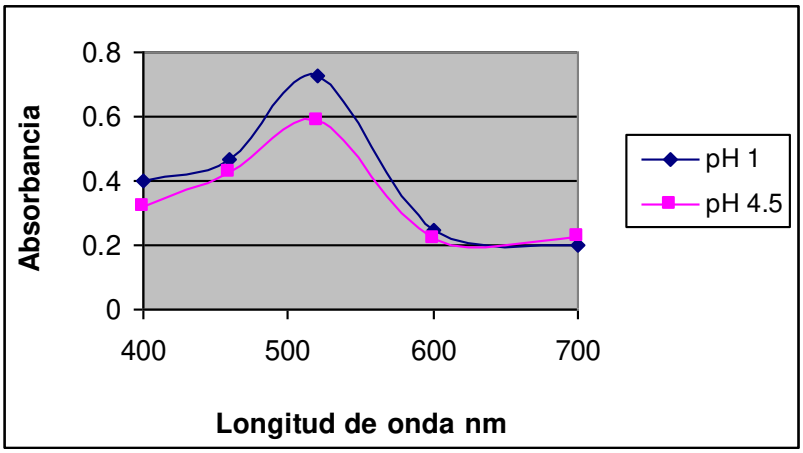
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.16. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 70 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



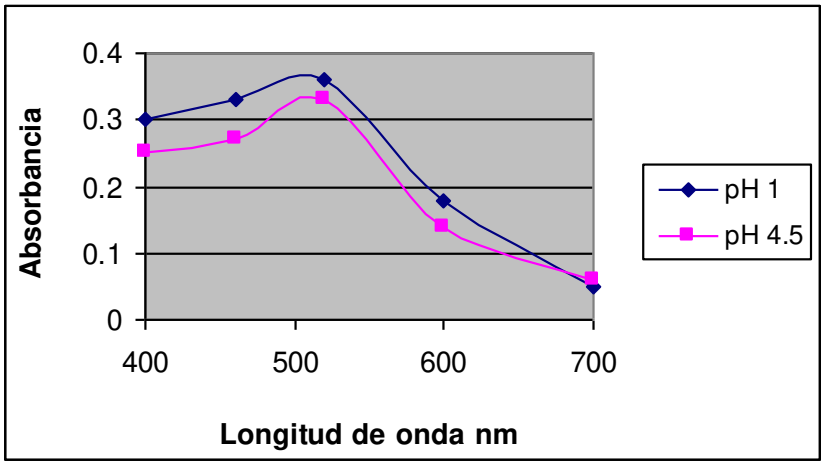
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.17. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 40 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



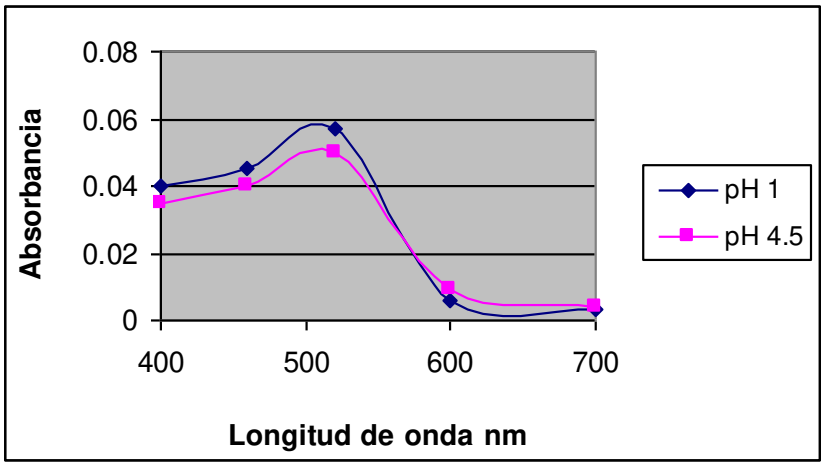
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.18. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 90 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



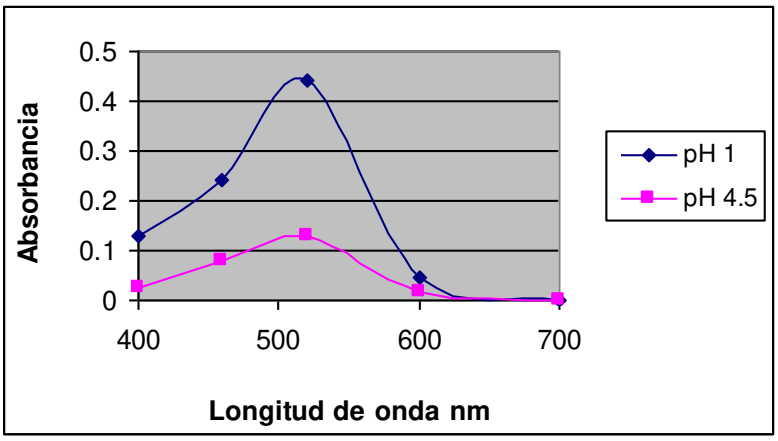
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.19. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 70 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



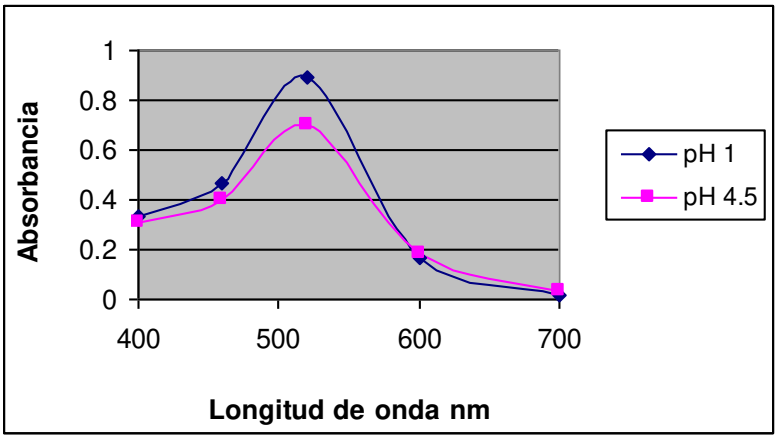
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.20. ESPECTRO DE ABSORCION DEL MORTIÑO NATURAL EXTRAIDO CON ETANOL 40 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



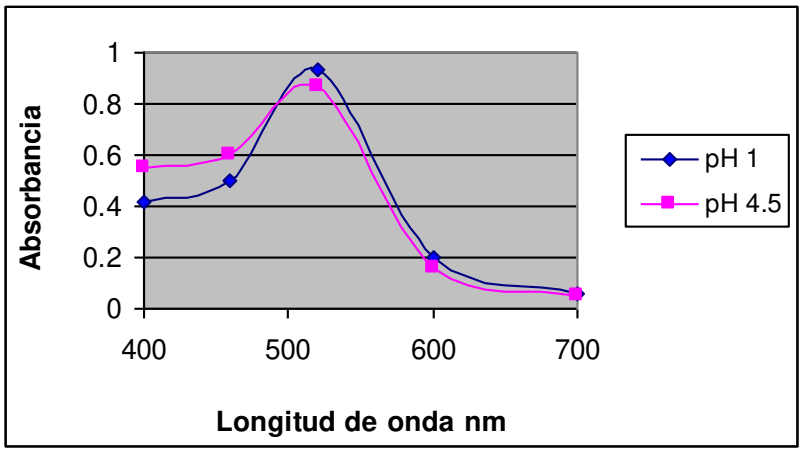
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.21. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



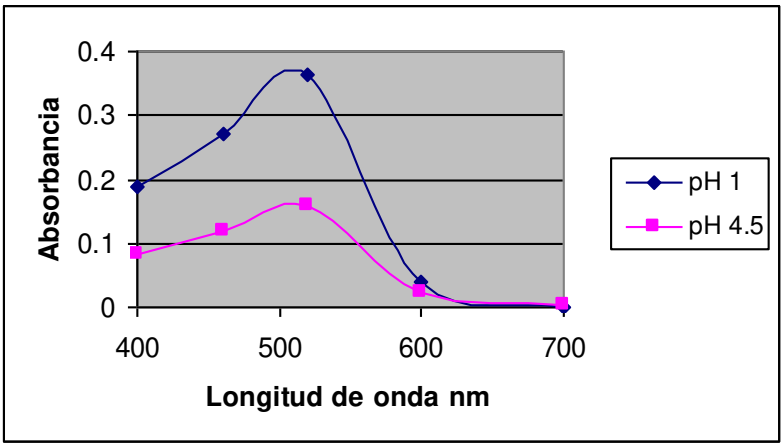
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.22. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



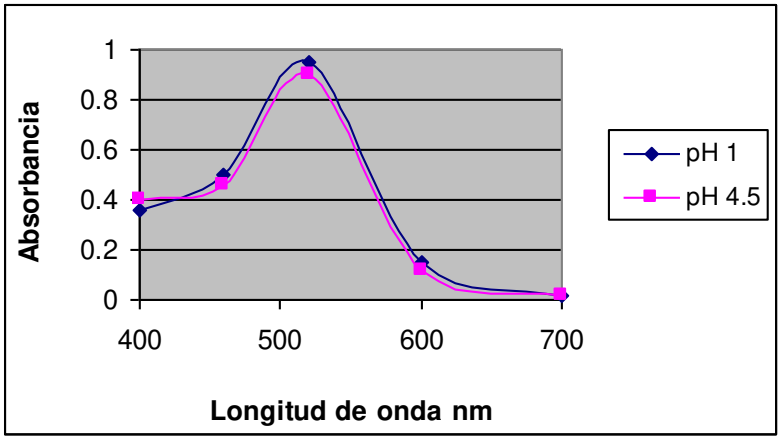
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.23. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.03 % ACIDO CITRICO



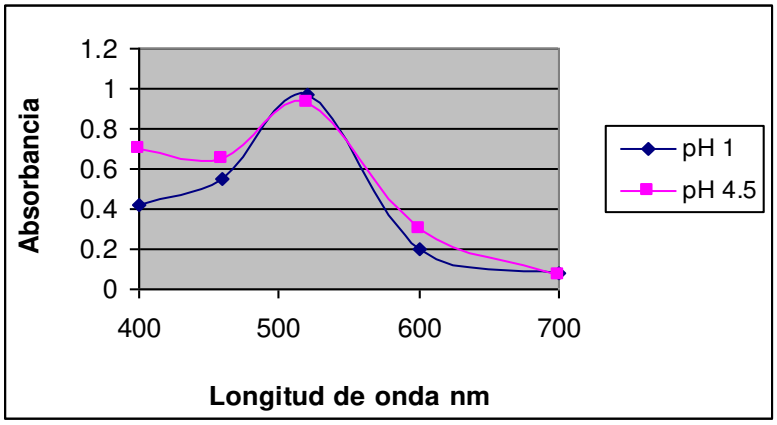
Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.24. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 90 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.25. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 70 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO



Fuente: Walter Menéndez / 2008

FIGURA 3.26. ESPECTRO DE ABSORCION DE LA FLOR DE JAMAICA NATURAL EXTRAIDA CON ETANOL 40 ° - 0.01 % ACIDO CITRICO

TABLA 1.

CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS (mg/L) DEL MORTIÑO LIOFILIZADO SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS

MUESTRA (MORTIÑO)	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg/L)
40° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	3.673
40° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	0.25
70° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	3.85
70° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	1.57
90° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	15.59
90° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	10.19

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 2.

CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS (mg/L) DE LA FLOR DE LA JAMAICA LIOFILIZADA SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS

MUESTRA (FLOR DE JAMAICA)	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg/L)
40° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	1.62
40° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	0.66
70° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	6.06
70° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	1.536
90° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	17.36
90° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	13.79

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 3.

CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS (mg/L) DEL MORTIÑO NATURAL SOMETIDO A DIFERENTES TRATAMIENTOS

MUESTRA (MORTIÑO)	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg/L)
40° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	4.41
40° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	0.3
70° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	4.14
70° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	0.96
90° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	17.9
90° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	11.35

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 4.

CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS (mg/L) DE LA FLOR DE LA JAMAICA NATURAL SOMETIDA A DIFERENTES TRATAMIENTOS

MUESTRA (FLOR DE JAMAICA)	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg/L)
40° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	1.93
40° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	1.00
70° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	6.77
70° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	1.7
90° Etanol – 0.03 % Ac. Cítrico	20.79
90° Etanol – 0.01 % Ac. Cítrico	14.16

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 5.

CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg/10g) EN CUATRO VARIEDADES DE MAÍZ

VARIEDAD (metanol: acido acético: agua)	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (mg / 10g)
Peruano	25.94
Arrocillo	25.08
Purepecha	19.32
Cónico	13.52

FUENTE: Extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (Zea Mays L.) como colorante (Yolanda Salinas Moreno, David Rubio Hernández / 2005)

TABLA 6.

CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINA (mg/L) EN EL CEREZO DULCE A DIFERENTES TRATAMIENTOS

Muestra	Concentración de antocianina (mg / L)
Completa (acetona – cloroformo	4.38
Piel (acetona – cloroformo)	0.12
Piel (acetona – cloroformo - metanol)	0.11
Pulpa (acetona – cloroformo)	0.07
Pulpa (acetona – cloroformo – metanol)	0.08

FUENTE: Identificación de los espectros de antocianinas del fruto del cerezo dulce en diferentes condiciones de extracción (Cedillo-López, Daniel Coatzin)

3.3 Funcionabilidad del extracto

Como se muestra en las tablas 7 y 8, al comparar diferentes concentraciones del extracto de mortiño y de flor de jamaica en yogurt natural con una muestra de yogurt industrial que utiliza colorante artificial, se determinó que la muestra de yogurt natural que contenía 0.5 gr. del extracto del mortiño y la muestra que contenía 1.75 gr. del extracto de flor de jamaica obtuvieron valores de Luminosidad, Longitud de onda y Pureza aproximados a los del yogur industrial utilizado como referencia.

Al momento de incorporar el colorante al yogurt natural no se presentó ningún problema de homogeneidad.

Las muestras de yogurt natural con 0.5 gr. de mortiño y 1.75 gr. de flor de jamaica fueron analizadas por medio de una prueba triangular en la que se estableció que no existió diferencia significativa como se muestra en la tabla 9.

En la tabla 10 se muestran números mínimos de respuestas correctas para establecer una diferencia en varios niveles significativos (5%, 1% y 0.5%) para la prueba triangular.

TABLA 7.

VALORES DE COLORIMETRIA DEL YOGURT NATURAL CON EL EXTRACTO DEL MORTIÑO

MUESTRA	Y	X	Z	x	y	Longitud de onda (nm)	Pureza (%)
Chivería Mora	**55.6**	**57.4**	**56.9**	**0.3378**	**0.327**	**592**	**11**
0.25 gr.	58.3	60.2	60.1	0.3370	0.326	590	10
0.5 gr.	**56.0**	**57.4**	**57.1**	**0.3366**	**0.328**	**591**	**10.5**
0.75 gr.	52.9	54.6	55.1	0.3358	0.325	590	9
1 gr.	46.6	49.4	49.0	0.34	0.321	613	9
1.25 gr.	44.0	46.9	46.7	0.34	0.32	600	10
1.5 gr.	41.3	44.6	44.1	0.343	0.3176	610	9
1.75 gr.	40.1	43.4	43.0	0.343	0.3169	610	9
2 gr.	36.7	40.4	39.2	0.3473	0.315	630	10

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 8.

VALORES DE COLORIMETRIA DEL YOGURT NATURAL CON EL EXTRACTO DE LA FLOR DE LA JAMAICA

MUESTRA	Y	X	Z	x	y	Longitud de onda (nm)	Pureza (%)
Chivería Mora	**55.6**	**57.4**	**56.9**	**0.3378**	**0.327**	**592**	**11**
0.25 gr.	69.2	68.5	69.7	0.33	0.333	580	10
0.5 gr.	65.5	65.3	67.8	0.32	0.33	572	6
0.75 gr.	61.6	62.2	63.8	0.331	0.328	584	8
1 gr.	59.1	60.1	62.0	0.33	0.326	580	8
1.25 gr.	57.9	59.1	60.9	0.332	0.325	591	8
1.5 gr.	57.2	58.6	60.1	0.3331	0.3251	581	8.2
1.75 gr.	**56.8**	**58.4**	**59.9**	**0.3335**	**0.324**	**592**	**9**
2 gr.	55.0	56.7	57.8	0.3345	0.324	591	9

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA 9.

NUMERO DE RESPUESTAS CORRECTAS OBTENIDAS EN EL ANALISIS SENSORIAL

	Respuestas Correctas	Número mínimo de respuestas correctas (5 %)	Número mínimo de respuestas correctas (1 %)	Número mínimo de respuestas correctas (0.1 %)
1 er Muestreo	12	11	13	14
2 do Muestreo	12	11	13	14
3 er Muestreo	13	11	13	14

Fuente: Walter Menéndez / 2008

TABLA10.

NUMEROS MÍNIMOS DE RESPUESTAS CORRECTAS PARA ESTABLECER UNA DIFERENCIA EN VARIOS NIVELES SIGNIFICATIVOS PARA LA PRUEBA TRIANGULAR

Número de respuestas	*Mínimo número de respuestas correctas para un nivel de significancia*			*Número de respuestas*	*Mínimo número de respuestas correctas para un nivel de significancia*			*Número de respuestas*	*Mínimo número de respuestas correctas para un nivel de significancia*		
	5%	*1%*	*0.1%*		*5%*	*1%*	*0.1%*		*5%*	*1%*	*0.1%*
5	*4*	*5*	*-*	***37***	*18*	*20*	*22*	***69***	*31*	*33*	*36*
6	*5*	*6*	*-*	***38***	*19*	*21*	*23*	***70***	*31*	*34*	*37*
7	*5*	*6*	*7*	***39***	*19*	*21*	*23*	***71***	*31*	*34*	*37*
8	*6*	*7*	*8*	***40***	*19*	*21*	*24*	***72***	*32*	*34*	*38*
9	*6*	*7*	*8*	***41***	*20*	*22*	*24*	***73***	*32*	*35*	*39*
10	*7*	*8*	*9*	***42***	*20*	*22*	*25*	***74***	*32*	*35*	*39*
11	*7*	*8*	*10*	***43***	*20*	*23*	*25*	***75***	*33*	*36*	*39*
12	*8*	*9*	*10*	***44***	*21*	*23*	*26*	***76***	*33*	*36*	*39*
13	*8*	*9*	*11*	***45***	*21*	*24*	*26*	***77***	*34*	*36*	*40*
14	*9*	*10*	*11*	***46***	*22*	*24*	*27*	***78***	*34*	*37*	*40*
15	*9*	*10*	*12*	***47***	*22*	*24*	*27*	***79***	*34*	*37*	*41*
16	*9*	*11*	*12*	***48***	*22*	*25*	*27*	***80***	*35*	*38*	*41*
17	*10*	*11*	*13*	***49***	*23*	*25*	*28*	***81***	*35*	*38*	*40*
18	*10*	*12*	*13*	***50***	*23*	*26*	*28*	***82***	*35*	*38*	*42*
19	*11*	*12*	*14*	***51***	*24*	*26*	*29*	***83***	*36*	*39*	*42*
20	*11*	*13*	*14*	***52***	*24*	*26*	*29*	***84***	*36*	*39*	*43*
21	*12*	*13*	*15*	***53***	*24*	*27*	*30*	***85***	*37*	*40*	*43*
22	*12*	*14*	*15*	***54***	*25*	*27*	*30*	***86***	*37*	*40*	*44*
23	*12*	*14*	*16*	***55***	*25*	*28*	*30*	***87***	*37*	*40*	*44*
24	*13*	*15*	*16*	***56***	*26*	*28*	*31*	***88***	*38*	*41*	*44*
25	*13*	*15*	*17*	***57***	*26*	*28*	*31*	***89***	*38*	*41*	*45*
26	*14*	*15*	*17*	***58***	*26*	*29*	*32*	***90***	*38*	*42*	*45*
27	*14*	*16*	*18*	***59***	*27*	*29*	*32*	***91***	*39*	*42*	*46*
28	*15*	*16*	*18*	***60***	*27*	*30*	*33*	***92***	*39*	*42*	*46*
29	*15*	*17*	*19*	***61***	*27*	*30*	*33*	***93***	*40*	*43*	*46*
30	*15*	*17*	*19*	***62***	*28*	*30*	*33*	***94***	*40*	*43*	*47*
31	*16*	*18*	*20*	***63***	*28*	*31*	*34*	***95***	*40*	*44*	*47*
32	*16*	*18*	*20*	***64***	*29*	*31*	*34*	***96***	*41*	*44*	*48*
33	*17*	*18*	*21*	***65***	*29*	*32*	*35*	***97***	*41*	*44*	*48*
34	*17*	*19*	*21*	***66***	*29*	*32*	*35*	***98***	*41*	*45*	*48*
35	*17*	*19*	*22*	***67***	*30*	*33*	*36*	***99***	*42*	*45*	*49*
36	*18*	*20*	*22*	***68***	*30*	*33*	*36*	***100***	*42*	*46*	*49*

FUENTE: Anális sensorial de los alimentos (J. sancho, Ediciones alfaomega / 2002)

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El método de extracción seleccionado para la obtención del colorante antocianico es el de fruta liofilizada, debido a que se reduce en un 30% el tiempo de extracción de la porción alcohólica en el rotovaporador.
- La concentración de ácido cítrico no influyó en el tiempo de extracción de la porción alcohólica en el rotovaporador.
- La pureza del alcohol influye en la concentración final del extracto.

- El extracto obtenido del mortiño tuvo mayor concentración de antocianinas en mg/L que el extracto obtenido a partir de la flor de la jamaica.
- Se determinó que no existe diferencia significativa en el color entre las muestras experimentales respecto a las del yogurt comercial, que utiliza colorantes artificiales.
- Se concluye que se puede utilizar al mortiño y a la flor de la jamaica para extraer el colorante antocianico y poder utilizarlo con fines alimenticios.

Recomendaciones

- Controlar la acidez del concentrado para mantener la estabilidad de la antocianina.
- Utilizar otro método analítico como el HPLC o Cromatografía Liquida de Alta Resolución para poder separar los componentes del concentrado obtenido basándose en diferentes tipos de interacciones químicas.
- Se recomienda el uso de colorantes naturales debido a que el consumo excesivo de colorantes artificiales son agentes procancerígenos.

APENDICES

APENDICE A

ENCUESTAS PRESENTADAS PARA EL ANALISIS SENSORIAL

Nombre:_____

Ante Usted hay 3 muestras. Dos de ellas son iguales entre si.

Observe e indique. **Cuál es la muestra diferente?**

Marque con una X la clave de la muestra diferente

542	121	449
_____	_____	_____

Nombre:_____

Ante Usted hay 3 muestras. Dos de ellas son iguales entre si.

Observe e indique. **Cuál es la muestra diferente?**

Marque con una X la clave de la muestra diferente

746	793	359
_____	_____	_____