

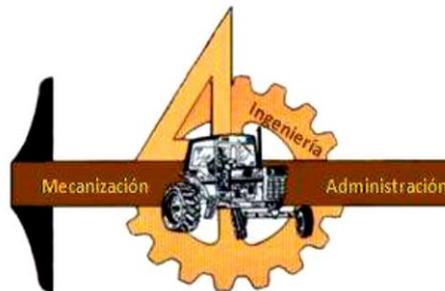


---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**DEPARTAMENTO DE MAQUINARIA AGRÍCOLA**



Extracción y uso potencial de las antocianinas del bagazo de café (*Coffea arábica sp.*) como colorantes en bebidas.

Por:

**BERSAIN VÁZQUEZ LÓPEZ**

**TESIS**

**Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título de:**

**INGENIERO MÉCANICO AGRÍCOLA**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Junio 2014

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE MAQUINARIA AGRÍCOLA

Extracción y uso potencial de las antocianinas del bagazo de café  
(Coffea arábica sp.) como colorantes en bebidas

Por:

**BERSAIN VÁZQUEZ LÓPEZ**

Tesis

Que Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como  
Requisito Parcial para Obtener el Título de:

**INGENIERO MECÁNICO AGRÍCOLA**

Aprobada por el comité de tesis

*EC Narro*

**Dr. Efraín Castro Narro**  
Asesor principal

*H. Serna Fernández*

**M.C. Héctor U. Serna Fernández**  
Sinodal

*J. Jesús Rodríguez Sahagún*

**Dr. José de Jesús R. Sahagún**  
Sinodal  
Universidad Autónoma Agraria  
"ANTONIO NARRO"

*Luis Rodríguez Gutiérrez*

**M.C. Luis Rodríguez Gutiérrez**  
Coordinador de la División de Ingeniería



**Saltillo, Coahuila, México. Junio de 2014**

División de  
Ingeniería

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios:** todo poderoso por haberme dado la oportunidad de vivir esta vida que hoy comparto con muchas personas, por darme el privilegio de terminar una carrera que no fue nada fácil pero con su ayuda no hubo imposibles. Gracias dios por todas la bendiciones.

**A la UAAAN:** por haberme abierto sus puertas para terminar mi formación profesional y permitirme conocer muchas amistades. De la misma manera agradezco a todas aquellas instituciones que aportaron su valioso tiempo y cuidado al transmitirme sus conocimientos.

**A el ing. Antonio Díaz Velázquez.** Por haberme aceptado en el equipo de trabajo de investigación y por haber sido parte de mi formación como profesional.

**A Dr. Efraín Castro Narro:** por haber sido mi asesor principal en éste proyecto y sobre todo por sus sabios consejos y enseñanzas teórico-prácticos en el transcurso de mi formación profesional en esta universidad.

**AL M.C. Héctor Uriel Serna Fernández.** Por su apoyo incondicional tanto dentro como fuera de las aulas, de la misma manera por su valiosa cooperación y asesoría en mi trabajo de tesis, sus críticas y consejos fueron de mucha ayuda en el proceso de mi formación como profesionista en la universidad por su amistad gracias.

**A la Lic. Diana Castro Alvarado:** por sus sabios consejos y apoyo incondicional durante mi estancia en esta universidad, siempre estaré agradecido con dios por haber puesto en mi camino a una gran persona como usted.

**Al M.C. Tomas Gaytán Muñiz:** por ofrecerme su amistad y apoyo incondicional durante mi estancia en la UAAAN.

**Dr. José de Jesús R. Sahagún:** Por su apoyo incondicional en la revisión de mi trabajo de tesis y por sus sabios consejos.

**Al Sr. Mario Amaro:** por sus enseñanzas y por haberme dado la oportunidad de crecimiento en el taller mecánico de la UAAAN.

**A todos los Maestros del Departamento de Maquinaria:** al Dr. Jesús R. Valenzuela García, Dr. Martín Cadena Zapata, Juan A. Guerrero Hernández, M.C. Juan Arredondo Valdez, Ing. Rosendo Gonzales Garza, Ing. Jorge A. Flores Berrueto, M.C. Mario A. Méndez Dorado, por todos sus conocimientos y enseñanzas que me transmitieron durante toda mi carrera.

**A Olibia Rincón Montiel:** quien fue un apoyo constante durante la mayor parte de mi carrera, regalándome su amistad, comprensión y cariño incondicional.

**Al Sr. Nieves Almaguer Medellín.** Por su apoyo incondicional que ha sido de gran ayuda en mi estancia en la universidad y ayudarme a hacer este sueño realidad.

**Al Sr. Víctor Manuel Solís Martínez.** Por su amistad, confianza y su valioso apoyo en la impresión de mi trabajo de tesis.

**A mis compañeros y amigos de generación XVI.** Yamil, César Avendaño, Lili Yaneth, Jairo Estrada, Víctor Ventura, Adoniram Escalante, Liliel Velázquez, Eliel Asael, Hugo Enrique, José Antonio, Isaac Medina, José Alfredo, Fernando Flores, Gerardo González, Milton Vázquez, Tomas Eduardo, Santiago Pérez, Absalón Martínez, por los momentos que pasamos juntos, momentos que hoy solamente permanecen en el espacio los gritos, las risas y las alegrías de todos nosotros que unidos por un sentimiento de hermandad dejamos plasmados en los muros de las aulas, los patios y en las canchas de nuestra universidad.

## **DEDICATORIA**

### ***A mis padres:***

***Sr. Lindoro Vázquez Domínguez. Y Sra. Rafaela Rosalba López Pérez.***

Con todo el amor, cariño y respeto que se merecen. Por ser los seres que me dieron la vida y quienes me enseñaron a comprenderla y valorarla por sus consejos y apoyo que me han brindado, gracias por sus sabios consejos y sobre todo por los valores que me inculcaron; gracias por ser ejemplo de vida para mí y mis hermanos, gracias por sus esfuerzos y sacrificios que me permitieron llegar hasta donde ahora estoy. Nunca defraudaré al sacrificio que han hecho por mí. Gracias por ser las personas que más quiero en la vida.

### **A mis hermanos**

**Ana Vilma, Nehemías, Samuel, Benjamín y Osiel**

Por todo su cariño, apoyo y comprensión durante toda mi carrera, por ser mis hermanos de quien siempre me he sentido orgulloso de tenerlos y por haberme ayudado a hacer este sueño realidad.

### **A mis tías:**

**Celia Roblero Morales**, aun sabiendo que dios te llamó a eterno descanso, desde donde estás tía. Agradezco tus consejos y cuidados que tuviste conmigo siempre viviré muy agradecido.

**Elida López Pérez, Vitalia López Pérez**, de ante mano agradezco su apoyo incondicional que siempre tuvieron para conmigo, quiero que sepan que las quiero mucho y agradezco a dios por haberme dado el privilegio de tener a estos seres tan queridos. Gracias por sus consejos y enseñanzas y hoy me pueden ver culminar un sueño.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIA .....	v
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
<b>I INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Objetivos .....	4
1.1.1 Objetivo general .....	4
1.1.2 Objetivos específicos .....	4
1.1.3 Hipótesis.....	4
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Pigmentos naturales más usados como colorantes .....	5
2.2 Clasificación de los principales colorantes .....	7
2.2.1 Colorantes sintéticos .....	7
2.2.2 Colorantes naturales .....	9
2.2.2.1 Clasificación de los principales pigmentos como colorantes.....	10
2.2.2.2 Uso del pigmento en yogur .....	13
2.2.3 Normatividad de los colorantes.....	14
2.3 Compuestos fenólicos.....	16
2.3.1 Las antocianinas .....	16
2.3.1.1 Extracción de las antocianinas .....	19
2.3.1.2 Propiedades funcionales de las antocianinas .....	20
2.3.1.3 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas .....	23
2.3.1.3.1 Temperatura.....	24
2.3.1.3.2 Iones metálicos.....	25
2.3.1.3.3 Efecto del pH sobre el color de las antocianinas.....	25

2.3.1.4 Detección e identificación de antocianinas.....	26
2.3.1.4.1 Separación y cuantificación de las antocianinas .....	28
2.3.1.4.2 Determinación de antocianinas de forma total .....	29
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Material de estudio .....	30
3.2 Material de laboratorio .....	30
3.3 Reactivos .....	31
3.4 Metodología de extracción .....	31
3.5 Selección y despulpado .....	32
3.6 Extracción y concentración del pigmento.....	32
3.7 Filtración del extracto .....	33
3.8 Aplicación y evaluación del pigmento en yogur .....	34
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>35</b>
5.1 Diagrama del rendimiento del bagazo y cantidad de colorante .....	35
5.2 Diagrama de coloración de yogur.....	36
5.3 Viabilidad.....	37
<b>V.CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>39</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Estructura del flavilio y la antocianina .....	16
Figura 2.2 Estructura de las antocianidinas más importantes .....	17
Figura 2.3 Degradación de antocianinas del jugo de uva en función de la temperatura a) jugo no tratado; b) 99 °C/h; c) 99 °C/2 h; d) jugo comercial.....	24
Figura 2.4 Reacciones de la transformación estructural de las..... antocianidinas en el intervalo de pH 1 a 7 .....	26
Figura 3.1 Frutos de café bourbon en estado de máxima madurez .....	30
Figura 3.2 Proceso de obtención del pigmento .....	31
Figura 3.3 Selección manual de frutos .....	32
Figura 3.4 Extracción del color de la pulpa de café .....	33
Figura 3.5 Filtrado del extracto .....	33
Figura 3.6 Concentración del pigmento mediante destilación a presión reducida.	33
Figura 3.7 Aplicación del pigmento en yogur .....	34

## I. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo fue realizado en el plantel Cecytech No 17, ubicado en el Municipio de Bella Vista Chiapas. Un Municipio característico en la zona Sierra del Estado de Chiapas ya que los terrenos son de pendientes muy pronunciadas mayores de 5°, lo que no permite el acceso de maquinaria agrícola para labrar las tierras. Por lo anterior el cultivo predominante en el Municipio es el cultivo de café de la especie *coffea arábica*; con diferentes variedades tales como: café árabe, Typica, Mundo novo, Catuai y garnica.

La reciente prohibición en la industria alimenticia, la unión europea y la actual controversia del colorante sintético rojo 40 y amarillo 5, abre una gama de oportunidades de búsqueda de nuevas alternativas. Badui (1993). Manifiesta que el color de los alimentos como de las bebidas viene a ser un atributo que tiene mucho peso dentro del juicio del consumidor; este puede llegar a ser determinante para que un producto comestible sea aceptado o rechazado.

Por lo mencionado anteriormente las nuevas tendencias para colorear alimentos y/o bebidas han provocado según Badui, (1993) que en los últimos años se eliminan de los mercados los colorantes rojos sintéticos por considerarlos tóxicos; ocasionando que se incremente la demanda de pigmentos naturales principalmente en los países desarrollados.

Las antocianinas son los pigmentos naturales más abundantes responsables de los colores rojos en los frutos con una gama de tonos que va desde el púrpura hasta el predominante color naranja.

Los alimentos ricos en antocianinas tienen el poder de trabajar contra el cáncer, la diabetes, infecciones bacterianas, inflamación, el proceso de envejecimiento, así como enfermedades neurológicas (botánica-online).

Estos pigmentos son también responsables de mucho más, incluyendo servir de pantalla de “protección solar” para las plantas y hacer que las frutas sean más atractivas para su consumo.

Los extractos de antocianinas de otros cultivos como el maíz morado, la uva y el betabel no han sido satisfactorios debido a que el color se degrada fácilmente antes del término de vida de anaquel de los productos alimenticios (Astrid, 2008).

El descubrimiento de las antocianinas de tipo acilado, que son más estables a cambios de temperatura y pH que las de estructura típica, ha venido a reactivar nuevamente la búsqueda de fuentes naturales (Anderson, 2006).

En café (*Coffea Arabica* sp.) no existen estudios sobre la composición de antocianinas en el bagazo sin embargo, la resistencia del color a temperaturas de hasta 60 °C alcanzados en el cajón de acopio durante la cosecha y su prolongada exposición al sol, supone la presencia de este tipo de antocianinas.

La duración observada del color rojo de la pulpa de café en condiciones adversas de luz y temperatura supone la presencia de antocianinas de estructura resistente por lo que se espera que éste dure lo suficiente para ser explotado en la industria de aditivos alimentarios.

México cuenta con una gran cantidad de variedades de café que presentan frutos de colores rojo brillante, rojo cereza, azulados y amarillos. De éstas destacan las variedades de café bourbon de color rojo brillante por ser las más adaptadas a diversas altitudes. Bellavista, Chiapas, no es la excepción y también encontramos esta variedad ocupando la mayor superficie cultivada.

De resultar viable el uso de pigmentos de éste subproducto como colorantes de alimentos se daría un valor agregado al fruto del café que resultaría en una mayor rentabilidad del cultivo y mejoraría la economía de más de 282,000 familias dedicadas a este cultivo, cuyo alcance promedio no rebasa los \$1,400.00 mensuales (INEGI, 2013) y que dependen directamente de este cultivo.

**Palabras claves:** antocianinas, pigmentos del bagazo de café.

## **I.1 OBJETIVOS:**

### **I.1.1 Objetivo general:**

Extraer el color del bagazo del café (*Coffea arábica* sp.). Para su aplicación como colorante en alimentos.

### **I.1.2 Objetivos específicos**

- Determinar el nivel óptimo de extracción del pigmento natural a partir del bagazo de café (*Coffea arábica* sp.), por medio de la concentración obtenida de antocianinas (color rojo) mediante una solución de ácido láctico en condiciones de laboratorio.
- Establecer la mejor proporción de adición de pigmento frutal en reemplazo de la fuente de coloración química en bebidas mediante una sustitución parcial o total.
- Establecer los costos marginales de producción de colorantes obtenidos.

### **I.1.3 Hipótesis**

Es posible adecuar un método de obtención de pigmentos naturales, para la extracción del color rojo a partir del bagazo de café (*Coffea Arábica* sp).

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Pigmentos naturales más usados como colorantes en alimentos.

En la actualidad el uso de colorantes sintéticos en la industria alimentaria es cada vez más estricto, esto debido a la regulación para su uso, ya que algunos presentan problemas de toxicidad, reacciones de intolerancia y alérgicas. En base a lo anterior ha resultado viable el interés para colorantes de fuentes naturales, como posibles sustitutos de los colorantes sintéticos, ya que hasta la fecha no existen evidencias de toxicidad en los humanos por consumir productos coloreados con colorantes naturales (Alejandro, 2012).

Por lo general los alimentos naturales tienen su propio color ideal y lo que se esperaría es que se mantuviera a lo largo del proceso de manipulación e industrialización, pero la mayoría de las veces no es así. Sin embargo, los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe en los diferentes procesos de fabricación de un producto y esto solo se puede obtener modificándolo de forma artificial (Luciano, 2004).

Badui (1993), sostiene que el color de los alimentos es definitivamente muy importante para el consumidor, ya que siendo el primer contacto visual que tiene con ellos, es muy determinante para que un producto alimenticio industrializado sea aceptado o rechazado. En tanto la homogeneidad del color de los productos durante el tiempo de vida útil es fundamental. Lo que el público desea siempre al adquirir un producto alimenticio es que sea apetitoso a partir del color; ya que este le brinda seguridad y apetito. De lo contrario el color es también el responsable de que el público se descontrole y genere inseguridad por adquirir el producto ofertado.

Por lo anterior existen en el mercado diversos agentes químicos que sirven para colorear; básicamente hay dos tipos: los naturales y los sintéticos. Entre los primeros destacan los carotenoides, betalaina, clorofila y ácido carminico, así como el caramelo.

Por la parte de los colorantes sintéticos, encontramos los que se obtienen mediante un proceso químico industrial y existe una gran cantidad de ellos; sin embargo, solo algunos están aprobados para uso en la industria alimenticia. Esta situación es muy común con estos colorantes, ya que las legislaciones Europeas, Estados Unidos y de Japón, por mencionar solo algunas, no siempre están de acuerdo en relación con la toxicidad o inocuidad de cada uno de estos colorantes sintéticos (Badui,1993).

## **2.2 Clasificación de los principales colorantes**

### **2.2.1 Colorantes sintéticos**

Según la NOM-038-SSA1-1993 un colorante sintético es un compuesto derivado del carbono, obtenido por síntesis química y que se emplea como aditivo de color tanto en alimentos como en productos de perfumería y belleza.

Los colorantes sintéticos han sido muy utilizados por las ventajas que estos presentan sobre los colorantes naturales en relación a su producción. Debido a los problemas ocasionados a la salud por los colorantes sintéticos, se examinó una lista de 80 colorantes y después de una larga serie de selecciones y estudios actualmente, solo se aceptan 9 colorantes sintéticos con severas restricciones en uso y de acuerdo con la FDA (U. S. Food and Drug Administration) sólo 8 son comercialmente viables (Garcia,1999).

El azul No 1, también llamado azul brillante (FD&C Blue No. 1), es un derivado del ácido trifenilmetano, clasificado como CI42090; es polvo purpura-café, con brillo metálico, DL<sub>50</sub> subcutánea para ratón 4.6 g/kg, es giroscópico y estable en ácidos y a la luz; tiene una máxima absorción a 360 nm, inestable con agentes reductores anhídrido sulfuroso, muy soluble en agua (20 g en 100 ml) y etanol e insoluble en grasas.

El rojo cítrico número 2 es el 1-(2.5-dimetoxifenilazo)-2-naftol, clasificado como CI12156, y se presenta como cristales rojos de punto de fusión 156 °C , algo soluble en agua y en etanol; se usa principalmente para colorear algunos cítricos (Badui, 1993).

El rojo número 4 (FD&C No. 4) es una sal disódica del ácido 3-[(2.4-dimetil-5-sulfonil) azo]-4-hidroxil-1-naftalensulfónico y está clasificado como CI14700; comercialmente son cristales rojos, DL<sub>50</sub> oral para ratas >2g/kg, máxima absorción a 500 nm, soluble en agua (22 g/100ml) y muy poco en etanol; algunos países prohíben su uso como colorante sintético (Badui, 1993).

El rojo 40 se clasifica como CI 16035, es un polvo rojo oscuro, estable a pH ácido, soluble en agua (22 g/100ml) y en etanol al 50%.

El amaranto, también conocido como el rojo número 2, es la sal trisódica del ácido azonaftalensulfónico-2-naftol-3.6 disulfó, clasificado como CI16185; es un polvo rojo-café, de máxima absorción a 525 nm, soluble en agua (1g/15ml) y poco en etanol, sus soluciones son estables a la luz y su coloración se incrementa en presencia de hidróxido de sodio; algunos países prohíben su uso por considerarlo carcinógeno y teratogénico (Badui, 1993).

El amarillo número 6 (FD&C Yellow No. 6), es una sal disódica del ácido 1-sulfonilizado-2-naftol-6-sulfónico, clasificado como CI15985; es un polvo naranja, inodoro, higroscópico, de máxima absorción 480 nm, (en acetato de amonio), DL<sub>50</sub> oral para ratas >10 g/kg, muy soluble en agua (19 g/100 ml), estables en ácidos, sensible a los agentes reductores (Badui, 1993).

La eritrosina o rojo número 3 (FD&C No. 3), puede ser una sal sódica o potásica de la tetroyodofluoresceína; es un polvo rojo-café, DL<sub>50</sub> oral para ratas de 2.89 g/kg, máxima absorción a 524 nm y es inestable en presencia de ácidos, luz y cobre, pero resistente a las altas temperaturas; es insoluble en grasas, pero soluble en agua (9 g/100 ml) y poco en etanol, se clasifica como CI45430 (Badui, 1993).

El verde número 3 (FD&C No. 3) está clasificado como CI42053, es un polvo verde oscuro o gránulos con lustre metálico, DL<sub>50</sub> oral para ratas 2 g/kg, de máxima absorbancia a 628 nm, estable en ácidos y soluble en agua (20 g/100ml), (Badui, 1993).

### **2.2.2 Colorantes naturales**

Según García (1999), estos presentan tres categorías, los colorantes extraídos sin cambio a partir de materiales naturales normales o mediante procesos puramente físicos, los colorantes que cambian durante su extracción a partir de materiales o colorantes extraídos de fuentes naturales pero que no son alimentos (por ejemplo, ácido carmínico), también pueden ser químicos sintetizados normalmente idénticos a los colorantes encontrados en fuentes naturales. La mayoría de estos productos (de los cuales el  $\beta$ -caroteno es un ejemplo) han sido probados en términos de pureza. Para su uso en alimentos, tienen una serie de restricciones como el contenido de colorante, pigmentos secundarios, impurezas químicas y metales pesados. Los más comunes son los siguientes: curcumina (amarillo), riboflavina (amarillo), carmín cochinilla (rojo, rosa, violeta), clorofila y clorofilinas (verde), caramelo (morrón), bixina (anaranjado), extracto de pimentón (rojo), rojo remolacha (rojo), uno de los colorantes naturales de mayor importancia son los carotenoides.

### 2.2.2.1 Clasificaciones de los principales pigmentos como colorantes

**Cuadro 2.1 Principales colorantes naturales.**

<b>FUENTE</b>	<b>AGENTE ACTIVO</b>
Achiote, <i>Bixa orellana</i>	Bixa (carotenoide)
Azafrán, <i>Crocus sativas</i>	Crocetina (carotenoide)
Betabel, <i>Beta vulgaris</i>	Betalainas
Cúcuta, <i>Curcuma longa</i>	Curcumina
Cochinilla, <i>Dactylopius coccus</i>	Ácido Carminico
Pimiento rojo, <i>Capsicum annuum</i>	Capsantina (carotenoide)
Enocianina	Polímeros de antocianinas
Zanahoria, <i>Daucus carota</i>	$\beta$ -caroteno (carotenoide)
Cempasúchil, <i>Tapetes erecta</i>	Luteina (carotenoide)
Plantas Verdes	Clorofila

Curcumina (E100). Se obtiene a partir de las raíces y los tallos de la cúrcuma. Es de color amarillo y da este tono al polvo de curry. Su ingesta máxima es de 1mg/kg (Badui, 1993).

Riboflavina (E101). Es amarillo y se utiliza en una gran variedad de alimentos: leche, huevos y vegetales. Puede elaborarse también de manera artificial, es poco soluble en agua y su ingesta máxima diaria es de 0.5 mg/kg de peso corporal (Badui, 1993).

La cubierta de las semillas de achiote (*Bixa orellana*) contiene un colorante rojo que se usa en todo el Ecuador para la preparación de distintos tipos de comidas. Los responsables del color son los elementos bixin y norbixin, que son carotenoides solubles en aceites. Una forma típica de preparar un aliño es machacar las semillas de achiote en aceite o manteca y después mezclar con otros condimentos.

En la industria alimenticia, Bixa orellana se usa como colorante de margarina, mantequilla, queso, helado y cereales y se denomina aditivo E-160b o annatto (Smith y HongShum, citado por De la Torre et al., 2008).

El betabel, el pimiento rojo y la zanahoria, que contiene betalaínas, capsantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente, se deshidratan y se muelen, y el polvo resultante se usa para colorear. También se pueden someter a un proceso extractivo y concentración del pigmento. Esto mismo ocurre con el azafrán, la cúrcuma y el achiote o anato; en estos dos últimos es más fácil dicha extracción (Badui, 1993).

En la actualidad el carmín tiene una gran importancia comercial; este compuesto se extrae de los insectos *Dactylopius coccus* (también conocidos como *Coccus cacto*), *D. indicus* y otros, que reciben el nombre genérico de cochinilla o grama (Badui, 1993).

El producto conocido como cochinilla está integrado por los cuerpos secos de las hembras adultas de estos insectos, y contienen aproximadamente 10% de ácidos carmínicos, 40% de proteína, 12% de cenizas y diversos polímeros estructurales propios del animal. Se requieren alrededor de 130,000 insectos para lograr un kilogramo de cochinilla; cuando los cuerpos se muelen se obtiene una masa de color rojo muy intenso, de la cual se pueden elaborar diversos derivados comerciales a base de ácido carmínico; un extracto acuoso-alcohólico, con una concentración mínima de 1.8% ácido carmínico; el carmín, que es una laca de aluminio o de aluminio-calcio y que generalmente contienen más del 50% de ácido carmínico, que representa la forma más purificada de este pigmento (Badui, 1993). Como dato adicional el ácido carmínico (E120), de color rojo, es muy soluble en agua. Su ingesta máxima diaria es de 5 mg/kg de peso corporal.

Finalmente, cabe mencionar que algunos carotenoides se sintetizan químicamente y se emplean como colorantes; tal es el caso del 3-caroteno, el 3-apo-8'-carotenal, el éster etílico del ácido 3-apo-8'-carotenoico y la cantaxantina, que van desde el amarillo hasta el rojo muy intenso. En el mercado se encuentran como suspensiones, geles, deshidratados, etc., para emplearse en la manufactura de margarina, mantequilla, quesos, helados, jugos, sopas, postres, etc. (Badui, 1993).

Las inflorescencias de sankurachi o bleado se agregan a las preparaciones dulces o a la col morada para darles color. Las especies de *Amaranthus* contienen betacianinos que le dan color rojo (Cai et al., citado por De la Torre et al., 2008). Las antocianinas representan un factor importante en la industria alimentaria, debido a las restricciones sanitarias hacia el uso de colorantes sintéticos (Marcano De y Hasegawa, citado por Ramirez, Gonzales y Correa., 2007).

La obtención de un colorante a partir de estos compuestos presentes en los frutos maduros de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) mejora las características físicas (color) de muchos productos; además de poseer propiedades antioxidantes (Nagem y Toledo de Oliviera, citado por Ramirez, Gonzales y Correa., 2007).

Rojo de remolacha (E162). Se elabora a partir de la remolacha. No hay peligro en su consumo porque el ser humano lo excreta por la orina. Se obtiene a partir de una mezcla muy compleja, en la que se desconocen todos sus componentes, y se utiliza en productos de repostería, helados, derivados lácteos, conservas vegetales o mermeladas. No se han detectado efectos nocivos en su consumo, por lo que tampoco se ha fijado una ingesta diaria admisible.

Carbonato de calcio (E170), es un mineral blanco de origen natural que se utiliza para recubrir superficies, como agente antiapelmazante y como estabilizador en frutas enlatadas.

### **2.2.2.2 Uso del pigmento en yogur**

El yogur es un producto obtenido mediante la coagulación de las caseínas por fermentación de la leche entera, total o parcialmente descremada, que provocan una serie de bacterias como el *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricum*, entre otras del mismo grupo que cumplen la misma función fermentativa. Al igual que otras leches fermentadas, constituye uno de los ejemplos más conocidos de alimentos prebióticos, es decir productos que contienen microorganismos vivos (bacterias lácticas y bifidobacterias) que al ser ingeridos en cantidad suficiente ejercen un efecto positivo para la salud (Tamime y Robinson, 1991). La estructura del yogur, se conforma de una matriz tridimensional formada por granulos de caseína unidos en forma de largas cadenas que inmovilizan la fase líquida atrapando moléculas de agua, granulos de grasa y minerales como el calcio. Esta estructura da lugar a la característica textura de este producto lácteo (Gomez, 1991).

La norma oficial NOM-185-SSA1-2002 de productos y servicios para mantequillas, cremas, productos lácteos condensados azucarados y productos lácteos fermentados o acidificados, considera los siguientes pigmentos como uso permitido en la elaboración de estos productos: rojo cochinilla (E-120), caramelo (E-150), clorofilas (E-140), riboflavina (E-101), curcumina (E-100), antocianinas (E-163). De igual forma establece las concentraciones permitidas de cada uno de estos pigmentos en la fabricación de productos lácteos. Para antocianinas, se permite un máximo de 50 mg/kg para un producto lácteo fermentado como lo sería el yogur. Sin embargo, estas concentraciones permitidas varían con la legislación. En la unión Europea se permite un máximo de 200 mg/kg para un producto lácteo fermentado (Dowham y Collins, 2000).

Dentro de los productos estudiados recientemente como fuentes de pigmentos naturales usados en la coloración de yogur y de productos lácteos, se encuentran los hongos *Monascus purpureus* y *Monascus anka* ampliamente usados en Japon y el medio Oriente como aditivos y los Estados Unidos debido a su particular contenido de cumarinas; subproductos del metabolismo secundario de carácter tóxico (Downham and Collins, 200). Por otra parte, estudios recientes realizados por la universidad de Georgia, Atenas, sugieren que los pigmentos de este hongo podrían ser un sustituto aceptable para los colorantes tradicionales usados en yogur de fresa y aquellos que usan como aditivo el FD&C rojo # 40, ya que los cambios que se producen durante las diferentes etapas de procesamiento de estos alimentos son mínimos en comparación con los observados con el jugo de carmín y de remolacha o betabel, y las concentraciones de camarinas no son significativas para la salud (IFT, 2001).

### **2.2.3 Normatividad de los colorantes**

Cada país se puede regir por su propia normatividad, de acuerdo a su legislación, lo que conlleva a que algunos aditivos estén permitidos en ciertos países y en otros no. Con el objetivo de reglamentar las características de seguridad de los alimentos en el comercio internacional, la comisión del CODEX ALIMENTARIUS ha creado un cuerpo de normas que son aceptadas internacionalmente. La colección de normas se encuentra publicada en un documento titulado CODEX ALIMENTARIUS. En dicho documento se incluyen las disposiciones sobre los aditivos en la industria alimentaria (FAO/OMS, 1995).

Otro organismo regulador y que tiene un gran peso a nivel internacional, dado el gran mercado que representa, es el Food and Drugs Administration (FDA) de los Estados Unidos.

Las regulaciones de la FDA distinguen dos tipos de aditivos colorantes (Wong, 1989, Fennema, 2000):

1. Colorantes exentos de certificación, son aquellos obtenidos a partir de fuentes naturales o bien, son duplicados sintéticos de los colorantes naturales.
2. Los colorantes certificados no se encuentran en la naturaleza como tal, por lo que se obtienen por síntesis químicas, entre estos se pueden mencionar los tintes y las lacas, de amplia aplicación en la industria alimentaria. Comparados con los colorantes naturales, los colorantes artificiales tienen una mayor capacidad colorante, una mayor estabilidad y es más fácil normalizar el matiz de color y la intensidad.

Las lacas son sales de aluminio de los colorantes artificiales y son de una forma no soluble del colorante, por lo que no se utilizan en sistemas acuosos (Wong, 1989). En México, la utilización de colorantes dentro de la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética es regulada por las siguientes normas (García et al., 1989).

- NOM-038-SSA1-1993
- NOM-118-SSA1-1994
- NOM-119-SSA1-1994

El 22 de octubre del 2004, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios determinó que las normas oficiales mexicanas anteriormente citadas son obsoletas.

Estas normas han sido superadas por la normatividad internacional, así también por diversos ordenamientos legales vigentes en México, por lo anterior no se permite la creación de nuevos productos con una base sanitaria específica que contribuya a reducir riesgos en su caso (DOF, 2004).

## 2.3 Compuestos fenólicos

La materia viva contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, aunque muy difundidos y de considerable importancia, no forman más que una fracción mínima de la sustancia orgánica del reino vegetal y animal. Pero los fenoles vegetales poseen especial interés. Un grupo de compuestos fenólicos naturales son las antocianinas, estas son pigmentos hidrosolubles muy difundidos en el reino vegetal y responsables de los vistosos colores de muchas flores, frutas y verduras. (Bawerman, 1980).

### 2.3.1 Las antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fennema, 1993). Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Badui, 1993), también llamado 2-fenil-benzopirilio (Wong, 1995), 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 2.1 (Badui, 1993).

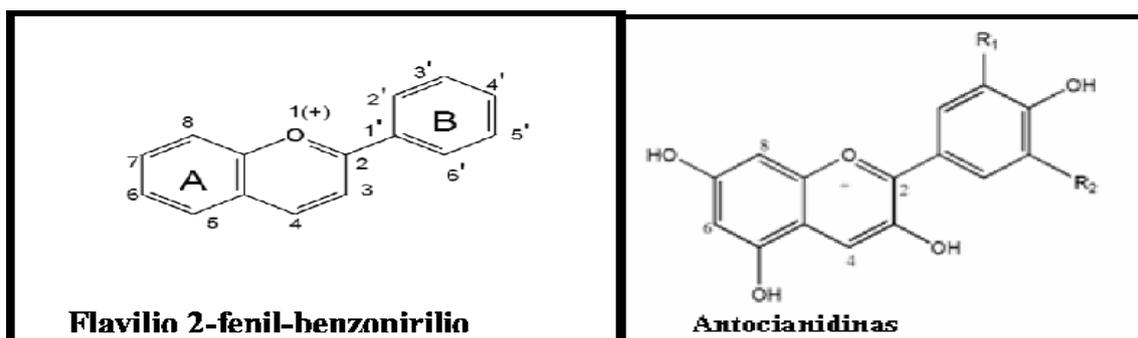
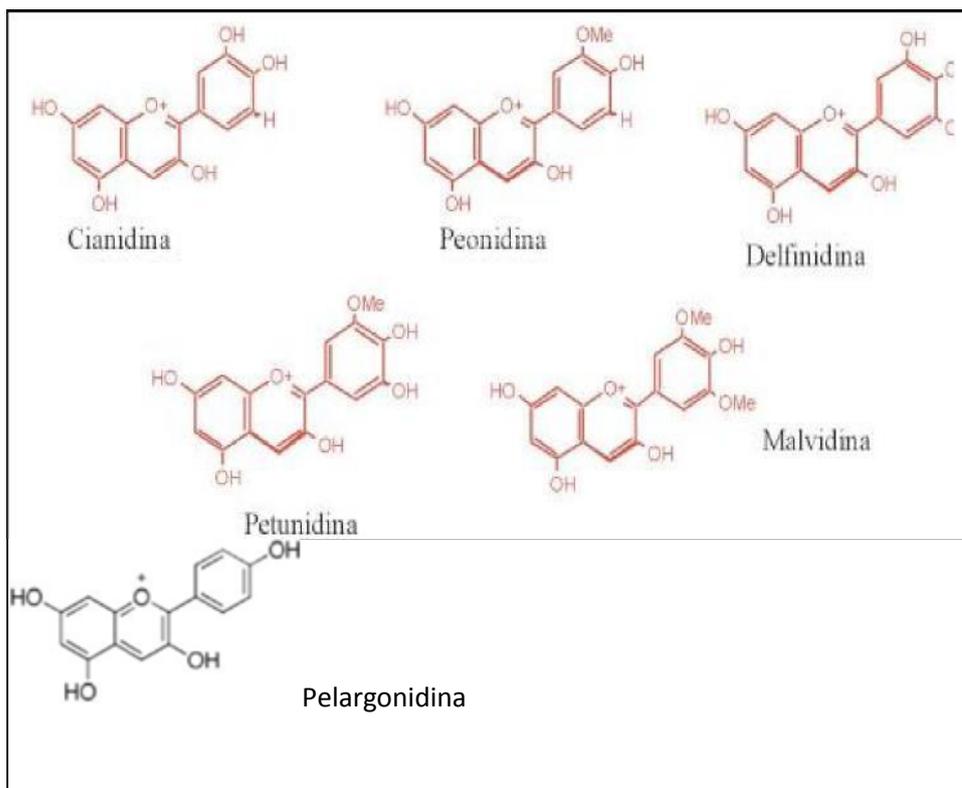


Figura. 2.1. Estructura del flavilio y la antocianina, Wong, 2005.

Las agliconas libres raramente existen en los alimentos, excepto posiblemente como componentes traza de las reacciones de degradación (Fennema, 1993). De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina como se observa en la figura 2.2. Nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los carbohidratos que comúnmente se encuentran combinados son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y la arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa. El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Badui, 1993).



**Figura 2.2 Estructura de las antocianidinas más importantes, Wong, 2005.**

Las antocianinas son interesantes por dos razones. La primera por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, las cuales pueden influenciar su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos, y la segunda, por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008).

Las antocianinas son de interés particular para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad de impartir colores atractivos (Konczack y Zhang, 2004). Recientemente, diversos materiales conteniendo antocianinas están siendo incorporados a productos alimenticios, donde tales productos requieren investigación a futuro para demostrar sus efectos fisiológicos.

Actualmente, las antocianinas de maíz morado y azul están siendo usadas para la producción de tortillas azules coloreadas naturalmente. La incorporación de antocianinas como colorantes alimenticios, además de mejorar la apariencia total, son muy benéficas para nuestra salud. Diversos estudios presentan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores.

Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores (Shipp y Abdel-Aal, 2010). Las propiedades funcionales de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano.

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua visible al ojo humano. Pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos.

Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (Brouillard, 1982). Estos pigmentos son normalmente encontrados disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Peck et al., 1980). La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, principalmente bayas y uvas rojas, cereales, principalmente maíz morado, vegetales y vino rojo entre las bebidas (Harbone, 1993).

### **2.3.1.1 Extracción de las antocianinas**

La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido (15%, HCl 1M) con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido, (Abdel-Aal y Hucl, 1999).

Es preferible usar etanol ya que es menos tóxico, particularmente en usos alimenticios y ensayos clínicos. Adicionalmente, si los extractos contienen materiales lipídicos, la adición de un solvente orgánico tal como hexano al extracto puede eliminar algunas sustancias que contengan dichos materiales.

El ácido puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acil en antocianinas aciladas, especialmente en aquellas con ácidos dicarboxílicos tales como ácido malónico, por lo que el uso de ácidos débiles es deseable, tal como ácido tartárico o cítrico para mantener los sustituyentes dicarboxílicos intactos (Castaneda-Ovando, 2009; Escribano-Bailon, 2004).

El pH también ha mostrado que tiene una influencia significativa sobre el color de los extractos de antocianinas, las lecturas de absorbancia y la recuperación del extracto.

### **2.3.1.2 Propiedades funcionales de las antocianinas**

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (Astrid, 2008). Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa, 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli, 1998). Estos resultados sugieren que las antocianinas son la explicación de la conocida "Paradoja Francesa". Existen varias hipótesis, se propone que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto (St. Leger, 1979; Xia, 1998). De igual manera, Wang y Jiao (2000), así como Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra la presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y contra los peróxidos ( $ROOR$ ), superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $-OH$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ).

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Otros investigadores (Koide, 1997) reportan efectos antitumorales al usar extractos de frijoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa.

De igual manera, Hagiwara, (2002) demostró que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. En cuanto a la actividad anticancerígena, (Kamei, 1998) reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto. Así también, (Tristan, 2005) realizó bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Referente a la actividad antiinflamatoria, Wang y Mazza (2002) encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados. Por otra parte, Vuorela, (2005) encontraron un efecto supresor de prostaglandina EG2, sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas de frambuesa.

Con respecto a la actividad antidiabética de las antocianinas, la cual fue reportada por Perossini, (1987), estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. De acuerdo con Tristán et al. (2008) antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginian* y *Shepherdia argétea*, muestran propiedades hipoglucémicas.

Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidos tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes.

Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas ha sido reportado por Joseph et al. (1999) y Shukitt-Hale et al. (2005) donde han demostrado que el comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio pueden ser mejoradas a través de suplementación nutricional con extractos de arándanos y fresas. Ohgami, (2005) suministró extractos de frutas ricas en antocianinas a ratas con deficiencia ocular, resultando en una reducción de la inflamación y aumento de la agudeza visual. Otro ejemplo de frutas con estas propiedades, es la uva y sus principales componentes como las antocianinas, flavonoides y el resveratrol tienen una variedad de bioactividades, tales como antioxidante, cardioprotectivo, anticancerígeno, antiinflamatorio, antienvjecimiento y antimicrobiano, las cuales están estrechamente ligadas a favor de la prevención de enfermedades y promoción de la salud, haciendo más grande el potencial de la uva en el campo de los alimentos y la aplicación farmacéutica (En-Qin, 2010).

Hoy en día se ha acumulado gran cantidad de información concerniente a la actividad biológica de las antocianinas, sin embargo, debemos profundizar sobre esta funcionalidad. De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta (2008) concluyen que la literatura existente sobre actividades biológicas provee suficiente evidencia para pensar que los productos ricos en antocianinas, tales como bayas o vino tinto, pueden tener un efecto protector sobre la salud humana, especialmente para la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer las implicaciones reales de las antocianinas en estas propiedades promotoras de la salud, donde muchos estudios han sido realizados usando extractos de frutas o vino y así, otras sustancias pueden ser totalmente o parcialmente responsables de las actividades biológicas mencionadas.

### **2.3.1.3 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas**

Parra, 2007, señala en referencia a este tema, que las antocianinas son solubles en medio acuoso, inestables frente a la luz y se degradan durante el almacenamiento, cambiando el color en cuanto más elevada sea la temperatura y en cambio, presentan buena estabilidad en medio ácido.

Este tipo de pigmento es relativamente poco usado, teniendo uso en algunos lácteos, helados, caramelos, productos de pastelería y conservas vegetales. El conocimiento de la química de las antocianinas se puede utilizar para minimizar su degradación mediante la adecuada selección de los procesos a los que se someterá y por selección de los pigmentos antocianicos que sean más adecuadas para la aplicación que se desea.

Las antocianinas presentan serios inconvenientes relacionados a su estabilidad, ya que en solución ellas son afectadas por la luz, cambios en pH, temperatura, oxidación, presencia de otros flavonoles y metales (Peguero,2007).

Debido a la deficiencia electrónica del núcleo flavilio las antocianidinas tienden a reacciones que alteran su estructura (Peguero, 2007). Su estabilidad se incrementa a mayor número de grupos metóxilos en el anillo B y decrece a mayor cantidad de grupos hidroxilos en la molécula.

### 2.3.1.3.1 Temperatura

Los tratamientos térmicos influyen significativamente en la destrucción de las antocianinas; es así como se ha visto que en las fresas se presenta una relación logarítmica entre la pérdida de color y temperatura (Badui, 1993).

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 pueden llegar a obtener productos prácticamente incoloros (Badui, 1993).

La estabilidad de las antocianinas en los alimentos se ve notablemente afectada por la temperatura, como se observa en la Figura 2.3. En general, las características estructurales que conducen a un aumento en la estabilidad al pH, también llevan a la estabilidad térmica. Las antocianidinas altamente hidrolizadas son menos estables que las metiladas, glucosiladas o acetiladas (Fennema, 2000).

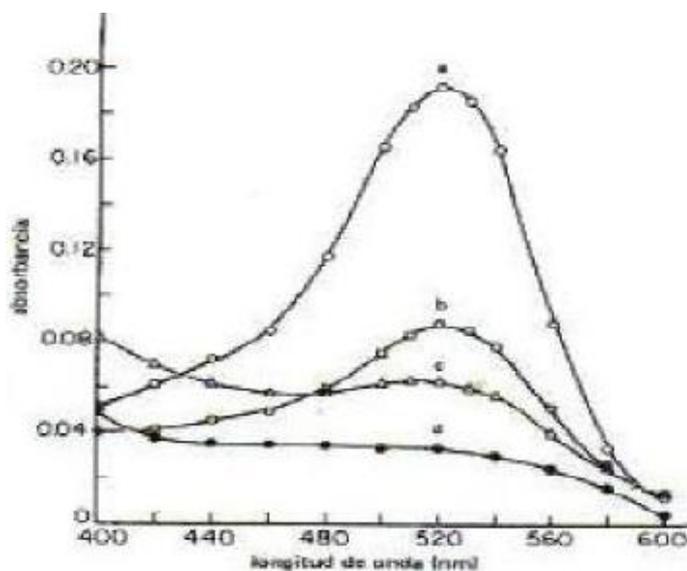


Figura 2.3. Degradación de antocianos del jugo de uva en función de la temperatura (a: jugo no tratado; b: 99 °C/1 h; c: 99 °C/ 2 h, d: jugo comercial).

Las antocianinas también cambian de color cuando forman complejos con otros compuestos fenólicos (proantocianidinas, catequinas, taninos y flavonoides) o con algunos polisacáridos, ya que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores (Badui, 1993).

#### **2.3.1.3.2 Iones metálicos**

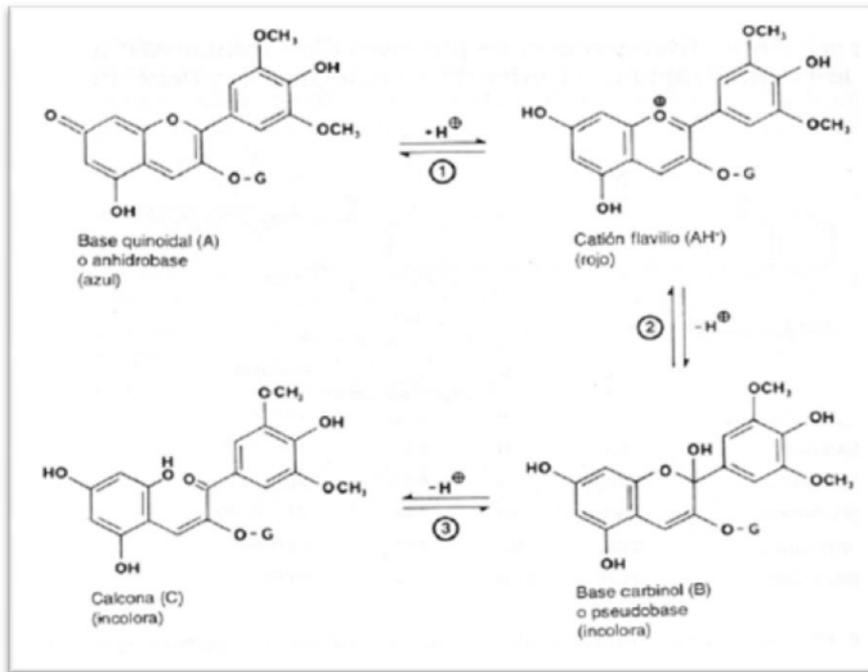
Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables (Badui, 1993).

En adición, la electroforesis capilar (EC) ha sido usada para separar los compuestos iónicos de antocianinas por su carga (Castaneda-Ovando et al., 2009). El uso de la EC en la separación de antocianinas es bastante nueva, pero promisorio debido a la alta hidrosolubilidad de estos compuestos.

La EC ha sido empleada para la determinación cuantitativa de antocianinas en vino como una alternativa de la RP-HPLC (Saenz-Lopez et al., 2003).

#### **2.3.1.3.3 Efecto del pH sobre el color de las antocianinas**

Debido a una deficiencia del núcleo del flavilio, estos pigmentos funcionan como verdaderos indicadores de pH; es decir, su color depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran: a pH ácido adquiere una estructura estable del catión flavilio de color rojo, representado por la fórmula (AH<sup>+</sup>); cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la forma quinoidea azul (A) o base anhidra; tanto la sal del flavilio como la base anhidra pueden convertirse a la base del carbinol incolora (B), que predomina en el intervalo de pH de 4 a 5 (Badui, 1993). Figura 2.4.



**Figura 2.4. Reacciones de la transformación estructural de las antocianidinas en el intervalo de pH de 1 a 7.**

### 2.3.1.4 Detección e identificación de antocianinas

Las propiedades espectrales son a menudo usadas para la caracterización de antocianinas, especialmente para identificar el tipo de antocianina. El análisis espectrométrico UV es la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas. Como se describió anteriormente, el espectro de absorción de las antocianinas depende del pH.

La absorción máxima a 520-540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas (Horbowicz et al., 2008). La espectrometría de masas (MS) es una técnica usada comúnmente que permite la identificación de antocianinas determinando la masa de los iones moleculares en la muestra y los fragmentos de la separación de estos compuestos a través de la aplicación de energías ionizantes más altas (Escribano-Bailon et al., 2004).

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) es usada para confirmar la identidad de los compuestos de antocianinas en plantas y fluidos biológicos. La LC-MS combina la separación sobre el sistema LC con la selectividad y sensibilidad del detector MS permitiendo la identificación de componentes individuales de una mezcla de compuestos tales como extractos de plantas o fluidos biológicos (Costa et al., 2000). Otras técnicas que han sido usadas para la identificación de antocianinas incluyen la técnica de espectrometría de masas de ionización por electrospray (ESI-MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) (Escribano-Bailon et al., 2004).

La ESI-MS es usada para la caracterización de antocianinas en matrices alimenticias complejas y es especialmente útil para la detección de metabolitos de antocianinas de nivel bajo en plasma humano (Horbowicz et al., 2008).

La espectroscopia de RMN es un método poderoso usado para la elucidación estructural de antocianinas tales como las antocianinas aciladas con derivados ramnósidos encontrados en algunas frutas como bayas negras y compuestos menores en análisis de vinos (Castaneda-Ovando et al., 2009; Kosir y Kidric, 2002).

El uso de la espectroscopia de RMN unidimensional y bidimensional  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con métodos de supresión de señal larga permite una identificación segura para las señales de resonancia de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de antocianinas individuales en metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (Kosir y Kidric, 2002). La espectroscopía de RMN es también más simple y menos consumidora de tiempo que la LC-MS. Estas técnicas pueden servir como un complemento para los métodos más comúnmente usados.

#### **2.3.1.4.1 Separación y cuantificación de las antocianinas**

La técnica empleada más comúnmente hoy en día es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que esta permite la separación simultánea, la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailon et al., 2004). Las columnas (diámetro interno 4.6 mm y largo 100-300 mm) son usualmente mantenidas a temperatura ambiente, y los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo (Zhang et al., 2004; Horbowicz et al., 2008).

Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm y la identificación de antocianinas está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioleta-visibles (UV-Vis) comparados con los de los estándares auténticos puros tales como delphinidina-3-glucósido, delphinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles.

El contenido total de antocianinas es calculado en  $\mu\text{g/g}$  usando una curva estándar para cianidina-3-glucósido o delphinidina-3-glucósido (las antocianinas más comunes en granos) (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina pueden proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación (Costa, 2000). Las antocianinas tienen un rango de absorción amplio al final del azul del espectro visible con una absorción máxima observada en las regiones de 500-535 nm (Abdel-Aal, 2006).

#### **2.3.1.4.2 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 susstractivos para cuantificar antocianinas y su producto de degradación (Rebolledo 2007).

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Material de estudio

Se emplearon frutos de maduración temprana de la variedad nativa de café “bourbon” (Figura 3.1). Dicha variedad se caracteriza por presentar frutos ovalados de tamaño mediano de aproximadamente 1 cm de largo, de color rojo brillante a rojo cereza.



Figura 3.1. Frutos de café bourbon en estado de máxima madurez.

#### 3.2 Material de laboratorio

- Baño maría con agitación.
- Termómetros.
- Refrigerador.
- Balanza analítica.
- Pipetas.
- Papel filtro Whatman No. 1.
- Matraz fondo plano.
- Mecheros

- Material de vidrio uso común en laboratorio.
- Centrifuga.

### 3.3 Reactivos

- Ácido láctico.
- Alcohol etílico.

### 3.4 Metodología de extracción

La metodología empleada para la extracción del pigmento a partir del bagazo de café (*Coffea arábica* sp.) consistió en varias etapas las cuales puede apreciarse en la (figura 3.2).

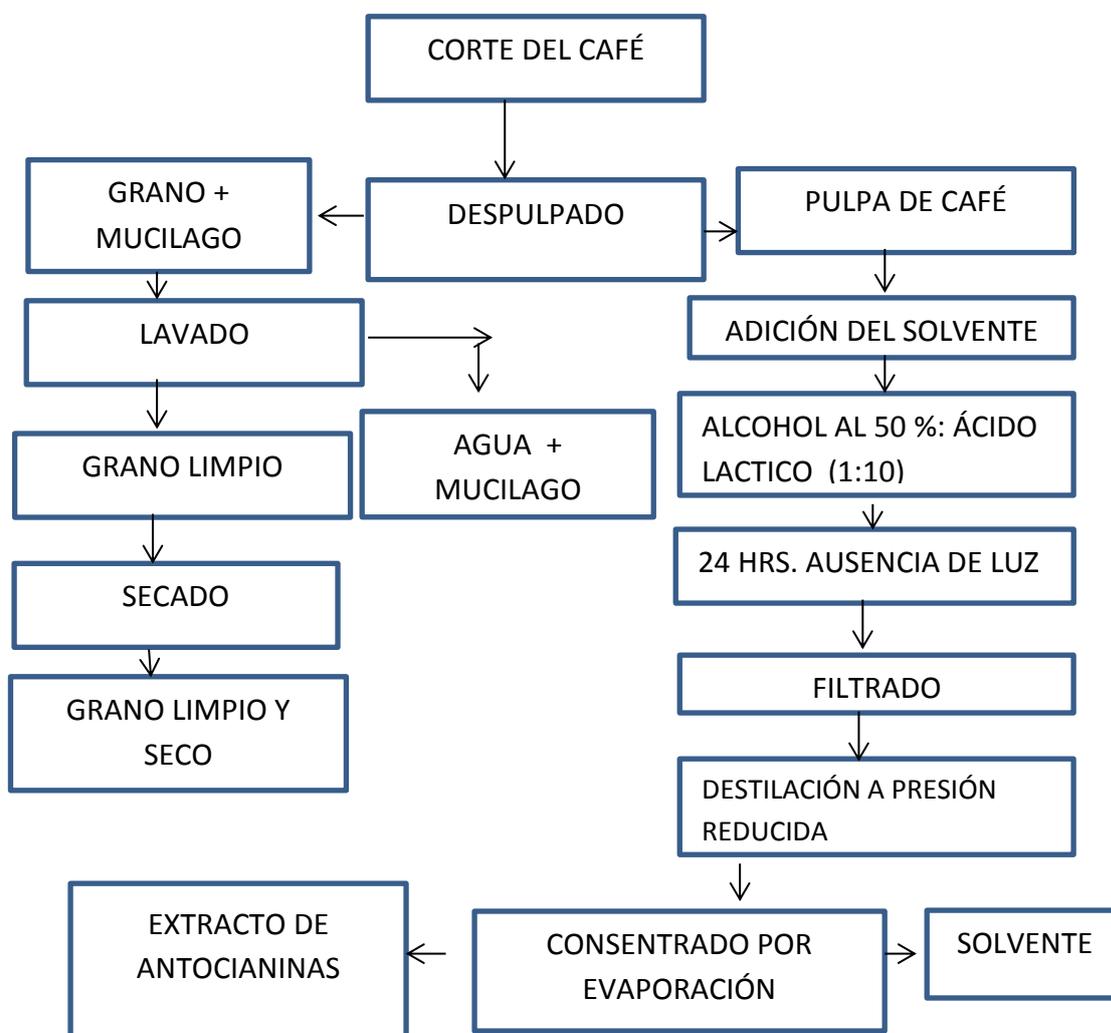


Figura 3.2 proceso de obtención del pigmento.

### 3.5. Selección y despulpado

Se lavó el fruto y se separó manualmente el bagazo del grano. Se pesó el total de la muestra al inicio y se pesaron las fracciones durante el proceso esto referente a la cantidad de pulpa que se necesita para obtener cierta cantidad de pigmento.

La selección de frutos se realizó de forma manual eliminando frutos verdes y con daño mecánico (Figura 3.3). Se evaluó el rendimiento de pulpa de 1kg de grano entero.



Figura 3.3. Selección manual de frutos.

### 3.6. Extracción y concentración del pigmento

La extracción de las antocianinas a partir del bagazo limpio de café se efectuó usando alcohol etílico al 50% en agua acidificado con ácido láctico al 85% de pureza para alcanzar un valor de pH de 2. El metanol es más efectivo que el etanol para la extracción de antocianinas pero su toxicidad impide que se pueda emplear cuando las sustancias extraídas se usarán para consumo humano. El extracto de antocianinas que se empleó en el yogur se extrajo a partir de 500 g de bagazo de café con 1000 mL de solvente (mezcla de alcohol etílico: ácido láctico). Se realizó una sola extracción con el bagazo entero para evitar el daño mecánico que pudiera liberar óxidos fenólicos al contacto con el oxígeno y agregar tonos cafés al colorante (figura 3.4).



**Figura 3.4. Extracción del color de la pulpa de café.**

### **3.7 Filtración del extracto**

El extracto obtenido de la muestra, fue filtrado para eliminar restos de pulpa de café con papel filtro Whatman No. 1 (Figura 3.5), después fue concentrado hasta cerca de la sequedad con un montaje de destilación (Figura 3.6) controlando la temperatura mediante baño maría a 55 °C con un tiempo de 2 hrs. Se colocó en tubos ámbar y se guardó bajo refrigeración para evitar degradación del color hasta su aplicación al yogur.



**Figura 3.5. Filtrado del extracto.**



**Figura 3.6. Concentración del pigmento mediante destilación a presión reducida.**

### 3.8 Aplicación y evaluación del pigmento en yogur

Se probaron distintas cantidades del colorante obtenido (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 ml/100g yogur). Hasta igualar el color de un yogur comercial de fresa.

Se definió como unidad experimental 100 g de yogur natural de marca LALA, a los cuales se adicionó el extracto de antocianinas. El pigmento se incorporó mediante agitación manual. Se establecieron cuatro repeticiones para evitar errores de apreciación (Figura 3.7). Se eligió un panel de 5 observadores para registrar cambios en el color durante la evaluación, se evaluó durante 3 semanas cada tercer día que es la vida de anaquel del yogur cada tercer día, comparando el yogur comercial de sabor fresa con el coloreado con el extracto, tomando en cuenta las diferencias en el color respecto al testigo observadas al inicio del tratamiento. El yogur se almacenó bajo refrigeración a 4 °C de temperatura. Se midió el pH del yogur antes de la aplicación, al principio y al final de la evaluación.

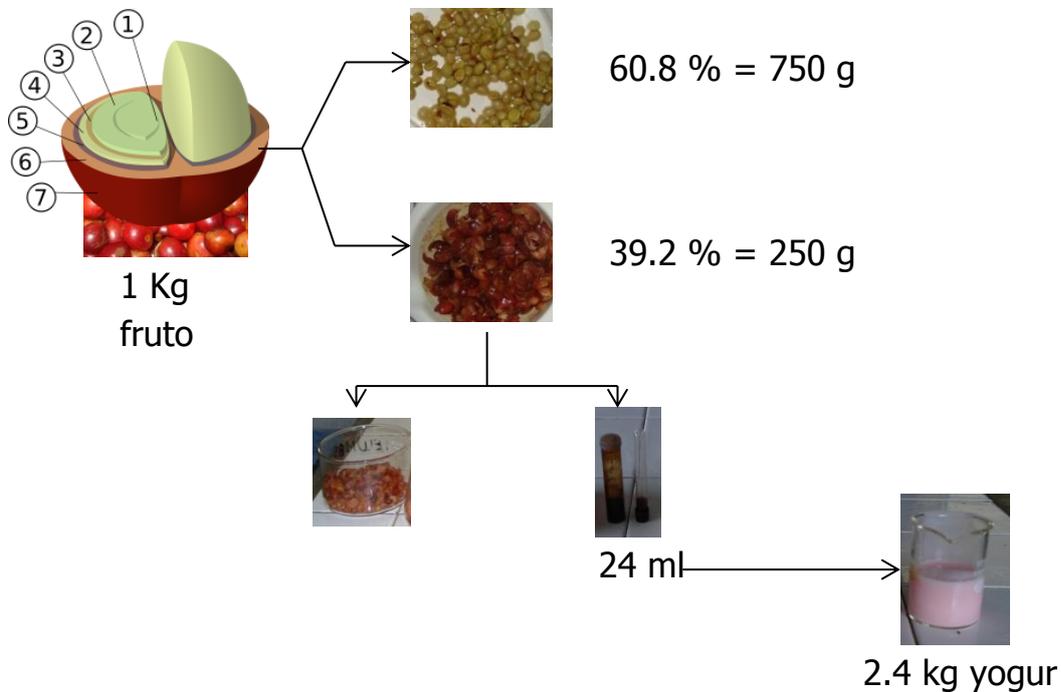


Figura 3.7. Aplicación del pigmento en yogur natural

## IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

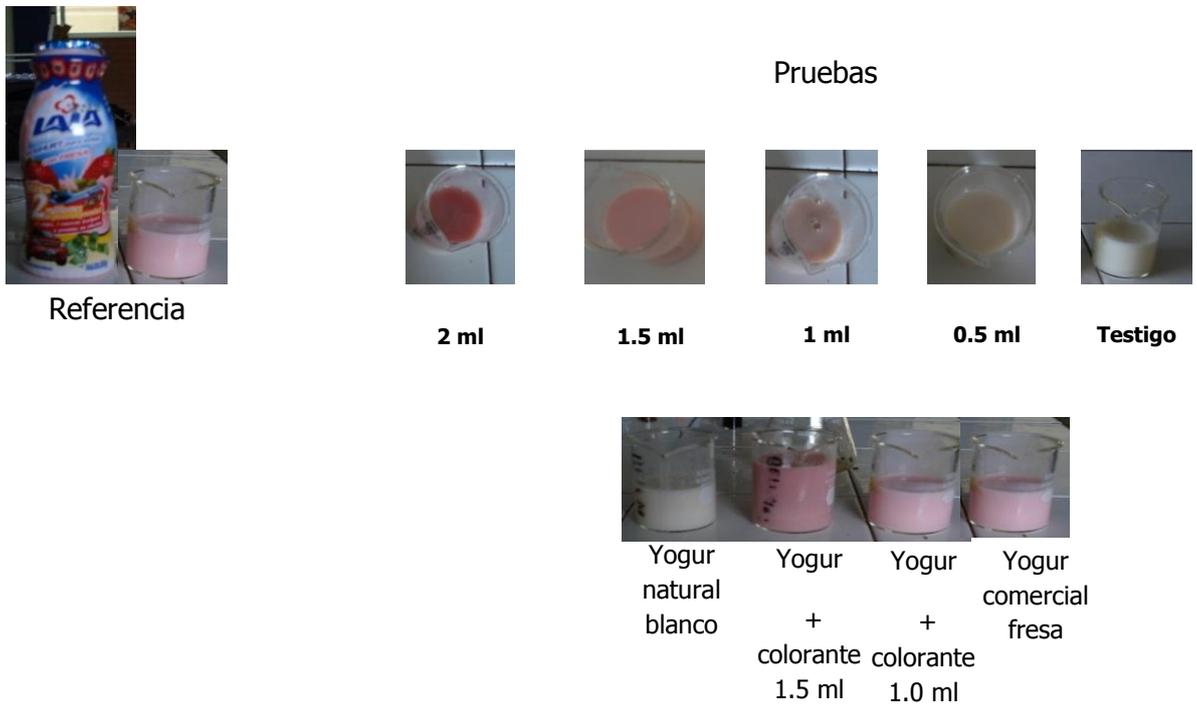
El proceso de extracción propuesto resultó efectivo ya que se separó exitosamente la antocianina con el debido control de la acidez en la extracción y controlando también la temperatura durante la concentración del pigmento, no perdió sus características de color resultando un producto de tonalidad rojo brillante muy atractivo para la industria alimentaria.

### 5.1 Diagrama del rendimiento del bagazo y cantidad de colorante



En el esquema se representa la cantidad de colorante líquido que es posible obtener de un kilogramo de café. Como se observa, es posible obtener hasta 24 ml del pigmento que alcanzan para igualar el color rojo de 2.4 kg de yogur comercial de fresa.

## 5.2 Diagrama de coloración de yogur



Una vez extraído y concentrado el colorante se aplicaron diferentes cantidades en yogur natural de marca comercial “LALA” mostrando un mejor resultado la proporción 1 ml en 100 ml de producto. La tonalidad obtenida fue muy similar al testigo misma que se mantuvo durante las tres semanas de evaluación que corresponden al tiempo de vida de anaquel del producto.

### 5.3 Viabilidad

**Técnica.** Las características físico-químicas de las antocianinas permitieron la extracción exitosa del colorante, al controlar todos los factores a que son susceptibles estos compuestos se asegura la repetición a una escala comercial del proceso que puede iniciar una explotación a nivel industrial proponiéndose un nuevo colorante natural en el mercado que sustituya los recientemente prohibidos rojos Num. 40, y que además ofrecen la garantía de ser derivados de un producto orgánico como lo es el café de altura del municipio de Bellavista que desde décadas se encuentra exento de productos químicos residuales. Además los resultados muestran un color rojo brillante muy atractivo en la industria alimentaria.

**Financiera.** Al ser el bagazo del fruto del café un subproducto del beneficio del grano que continúa siendo el producto principal, los costos correspondientes a la materia prima se reducen considerablemente ya que aún después de extraído el colorante, el residuo orgánico es útil para la elaboración de abonos orgánicos que se utilizan para nutrir el mismo u otros cultivos. El costo inicial del proceso de extracción en una micro agroindustria sería mínimo ya que el alcohol etílico es de bajo costo y accesible a cualquier productor interesado en producir colorante. Incluso sería posible crear una asociación rural de productores que mediante este proyecto y otro más específico que desarrolle tecnología para este fin, soliciten créditos ante el gobierno del estado e inicien una producción a mayor escala.

**Social.** El impacto social se ve reflejado directamente en la situación económica de las familias de la región pues este otorga un valor agregado al producto obtenido del cultivo de café que por mucho el cultivo que sostiene la economía del municipio, por lo que se esperaría la aceptación sin objeciones

## V CONCLUSIONES

- Es viable extraer las antocianinas presentes en la pulpa del grano de café usando alcohol etílico al 50% en agua acidificado con ácido láctico al 85% de pureza y emplearlas como colorantes en alimentos, constituyéndose como un sustituto potencial del reciente prohibido Rojo No. 40.
- El colorante además de su tono rojo brillante atractivo para la industria alimentaria, es de origen natural y posee propiedades antioxidantes propias de las antocianinas, confiriéndole el carácter de aditivo funcional.
- De 1 kg de pulpa de café es posible obtener 24 ml de colorante líquido concentrado, cantidad que está a la altura de otras fuentes de obtención como la cáscara de uva (30 a 75 ml).
- Se requiere 1.0 ml para lograr un color similar al del yogur comercial de fresa.
- Es posible reproducir el proceso de obtención de antocianinas del café generado en el laboratorio para adecuarlo a un proceso de alcance industrial con un mínimo de inversión económica y con ello beneficiar a miles de familias que dependen de este cultivo.

## VI BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal** E-S. y **Hucl** P. 1999. A Rapid Method for Quantifying Total Anthocyanins in Blue Aleurone and Purple Pericarp Wheats. *Cereal Chemistry*, 76:350-354.
- Andersen**, O. M. 2006. The anthocyanins. In *Flavonoids Chemistry Biochemistry and Applications* . Andersen O. M. and K. R. Markham (eds.). CRC Press. 452- 471.
- Astrid**, G. G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
- Badui**, D.S 1993. *Química de los alimentos*. Addison Wesley Longman de México, S.A DE C.V. México D.F, México.
- Bawerman**, J.B.S. 1980. *Introducción a la bioquímica de los alimentos*. Editorial El manual moderno, S.A DE C.V. México D.F, México.
- BROUILLAR** R. 1982. Chemical Structure of Anthocyanins. En *Anthocyanins as Food colors*. P. markakis (Ed.), pp 1-38. Academic press.
- Castaneda-Ovando** A., Pacheco-Hernández L., Paez-Hernández E., Rodríguez J. A. y Galán-Vidal C. A. 2009. Chemical Studies of Anthocyanins: a review. *Food Chemistry*, 113:859-871.**De Pascual**- Teresa s. y Sánchez M.T. 2008. Anthocyanins: from plant to health . *Phytochemical Review* 7:281-299.
- Downhan**. A. and Collins, P. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. In *International Journal of Food Science and Technology*. 35: 5-22.
- En-Qin X.**, Gui-Fang D., Ya-Jun G. y Hua-Bin L. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal Molecular Science*, 11,622-646.

- Escribano-Bailon** M. T., Beulga-Santos C. y Rivas-Gonzalo J. C. 2004. Anthocyanins in Cereals. *Journal Chromatography*, 1054:129-141.
- FAO/OMS**. 1995. CODEX ALIMENTARIUS. Segunda edición. FAO. Pp.3-10.
- Fennema**, R.O 200. Química de los alimentos. Edición Acribia. Zaragoza, España.
- García** M. Quintero y López Munguía. 1999. Biotecnología alimentaria. Ed. Limusa. México D.F. México.
- Ghiselli** A., Nardini M., Baldi A. y Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46(2),361-367.
- Gomez**, H- 1991. Métodos de control de acidez en yogur. Tesis profesional Universidad Autónoma de Chapingo. Pp 76.
- Hagiwara** A., Yoshino H., Ichiharam T., Kawabe M., Tamanos S. y Aoki H. 2002. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-B]pyridine (phip)-associated colorectal carcinogenesis in rats. *Journal of Toxicology Science*, 27:57-68.
- Harbone** J. B. 1993. The Flavonoids: advances in research since 1986. Chapman and Hall, London.
- IFT** (Institute of food technologists) -2001. Annual Meeting Food Expo Highlights – Broad ingredient focus adds variety.
- Kamei** H., Hashimoto Y., Koide T., Kojima T. y Hasegawa M. 1998. Effect of metanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 13(6):447-52.
- Koide** T., Kamei H., Hashimoto Y., Kojima T. y Hasegawa M. 1997. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans

in vitro and in vivo. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals*, 12(4), 277-280.

**Joseph** J. A., Shukitt-Hale B., Denisova N. A., Bielinski D. B., Martin A. y McEwen. 1999. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*, 19:8114-21.

**Konczack** I. y Zhang W. 2004. Anthocyanins-more than Nature's Colours. *Journal Biomedical and Biotechnology*, 5:239-240.

**López**, R. Quiñones, W y Echeverri, F. 2007. Perfil cromatografico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos.

**Miyazawa**, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K. & Someya, K. (1999). Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into tracts and humans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1083-1091.

**Ohgami** K., Ilieva I., Shiratori K., Koyama Y., Jin X. H. y Yoshida K. 2005. Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 275-281.

**Pecket** R. C. y Small C. J. 1980. Occurrence, Location and Development of Anthocyanoplasts. *Phytochemistry*, 19:2571- 2576.

**Perossini** M., Guidi G., Chiellini S. y Siravo D. 1987. Studio clinic sull'impeigo degli antocianisidi del mirtillo (Tegens) nel trattamento delle microangiopathi retiniche di tipo diabético ed. ipertensivo, *Ottal clinical ocular*, 113, 1173-90.

**Shipp** J. y Abdel-Aal S. M. 2010. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4:7-22.

- ST.** Leger A. S., Cochrane A. L. y Moore F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wines. *Lancet*, 1, 1017-1020.
- Tamine**, A.Y., y Robinson, R.K 1991. Bioquímica de la fermentación. En *yogur Ciencia y Tecnología* . Editorial Acribia. Zaragoza, España . pp 255-288.
- Tristan** F., Kraft B., Schmidt B. M., Yousef G. G., Knigh C. T. G. y Cuendet M. 2005. Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science*, 70(3), S159-S166.
- Vourela** S., Kreander K., Karonen M., Nieminen R., Hamalainen M. y Galkin A. 2005. Preclinical evaluation of rapessed, raspberry and pine bark phenolics for health related effects. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5922-5931.
- Wang** S. Y. y Jiao H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5677-5684.
- Wang** S. Y. y Lin H. S. 2000. Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry and strawberry is affected by cultivar and maturity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 48, 140-146.
- Wang** J. y Mazza G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 50, 850-857.
- WONG**, w. s. Dominic, 1989. Editorial. *Química de los alimentos, mecanismos y teoría*. Ed. Acribia, Zaragoza, España. pp 171-189.
- Xia** J., Allenbrand B. y Sun G. Y. 1998. Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function. *Life Science*, 63, 383-390.

**Páginas web:**

**Características** de las antocianinas. <http://www.botanical-online.com/medicinalesantocianinas.htm>.

**Erik** Alejandro Mireles Ornelas, 2012. Química de los alimentos <http://www.monografias.com/trabajos90/la-quimica-alimentos/la-quimica-alimentos3.shtml>.

**Francisco** Aguirre Saharrea (1999). Situación de la cafeticultura mundial: <http://www.laneta.apc.org/tosepan/producto/cafemundo.htm>.

**Josefina** Aranda. El sistema campesino-indígena de producción de café: [www.jornada.unam.mx/2004/08/30/eco-c.html](http://www.jornada.unam.mx/2004/08/30/eco-c.html).

**Luciano** Moreno, 2004. Teoría de color: propiedades de los colores, publicado el 18 de mayo del 2004, disponible en: <http://www.desarrolloweb.com/articulos/1503.php>.

**Peguero**, F.2007. Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo (Phaseolus vulgaris L.) cultivadas En Honduras. (En línea). Zamorano, Honduras. Zamorano carrera de Agroindustria Alimentaria. [http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis\\_infolib/2007/T2467.pdf](http://zamo-oti-02.zamorano.edu/tesis_infolib/2007/T2467.pdf).

**Rebolledo**, F. 2007. Determinación del potencial de coloración en Alimentos de un concentrado de Jugo de Cranberry (Vaccinium macrocarpon). Obtenido por Nanofiltración. (En línea). Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/far292d/doc/far292d.pdf>.