

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
CARRERA DE QUÍMICA INDUSTRIAL



PROYECTO DE GRADO

**“EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE
(*Cissus Verticillata*) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN
DERIVADOS LÁCTEOS (YOGURT)”**

POSTULANTE: MARIA ANGELICA GONSALEZ ESCOBAR

TUTOR: MSc. ING. RAFAEL ALVARO GARCÍA PADILLA A.

LA PAZ – BOLIVIA

2021

DEDICATORIA

Este Proyecto está dedicado a Dios, porque está conmigo en cada paso que doy, es quien me ha dado la fuerza y perseverancia para culminar una etapa más de mi vida, a mis padres por ser mi ejemplo de trabajo, sacrificio, entrega y amor, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento. También dedico este proyecto a mis hermanos y sobrina por ser mi motivación y a todas las personas que aman la vida, la respetan, aprenden de ella cada día y pelean por un mañana mejor.

Maria Angelica Gonzalez Escobar

AGRADECIMIENTO

Al reflexionar y desandar el camino recorrido para la realización de este Proyecto de Grado, reconozco que el mérito no sólo me corresponde, sino que es el fruto del esfuerzo y de la colaboración de muchas personas. Es por ello que en este momento quiero, desde lo más profundo de mi corazón, expresar mi agradecimiento:

Agradezco a Dios por protegerme durante todo mi camino y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de toda mi vida.

A mis papas Fermín e Hilda quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades.

A mis hermanos Gabriela y José por su cariño y apoyo durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A mi sobrinita Briannita por todas las alegrías que nos da.

A mi enamorado Edwin, por su apoyo incondicional, quien durante estos años de carrera me apoyo para continuar y nunca renunciar, gracias amor por todo.

Doy gracias a mi tutor el Msc. Ing. Rafael Álvaro García Padilla A. que con sus conocimientos supo guiarme durante el desarrollo de mi investigación.

No quería pasar por alto la oportunidad de agradecer a todos los docentes de la carrera de Química Industrial por su esfuerzo y trabajo en formar grandes profesionales, también agradecer a todos mis profesores que tuve en colegio, porque entre todos han formado la base para que hoy pueda ser lo que soy. Pero sobre todo un especial agradecimiento al Lic. Rafael Onofre y al Profesor Enrique Castro.

A todos mis amigos quienes me brindaron su ayuda y apoyo sin importar el tiempo, estuvieron ahí con alegría y demostrando su confianza y cariño.

Muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES	2
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
1.3 OBJETIVOS	5
1.3.1 Objetivo General	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 UVA SILVESTRE	6
2.1.1 Taxonomía.....	6
2.1.1.1 Familia Vitáceae	7
2.1.2 Distribución	8
2.1.3 Descripción botánica.....	8
- Tallo:	8
- Hojas:.....	8
- Inflorescencia:	8
- Flores:	8

- Frutos:.....	8
- Semillas:	8
2.1.4 El fruto	9
2.1.5 Composición química de la uva silvestre	11
2.1.6 Mercado nacional.....	12
2.2 FLAVONOIDES.....	12
2.2.1 Estructura y clasificación de los flavonoides	13
2.3 ANTOCIANINAS	15
2.3.1 Estructura química de las antocianinas	16
2.3.2 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.....	19
2.3.2.1 pH	19
2.3.2.2 Temperatura	21
2.3.2.3 Oxígeno	21
2.3.2.4 Luz	21
2.3.2.5 Iones metálicos	22
2.3.3 Propiedades antioxidantes de las antocianinas.....	22
2.3.3.1 Generalidades de los antioxidantes	23
2.3.4 Antocianinas en frutas.....	24
2.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS.....	25
2.4.1 Cuantificación del total de antocianinas mediante el método de pH diferencial	25
2.5 COLORANTES.....	27
2.5.1 Cromóforos	28
2.5.2 Auxocromos	28
2.5.3 Clasificación de los colorantes	29

2.5.3.1 Colorantes Naturales	29
2.5.3.1.1 Clasificación de colorantes naturales de acuerdo a sus características químicas	30
2.5.3.1.2 Clasificación de colorantes naturales según sus propiedades físicas	31
2.5.3.2 Colorantes Artificiales	32
2.5.4 Factores que afectan la Estabilidad de los Colorantes	33
2.6 EXTRACCIÓN.....	34
2.6.1 Descripción del equipo de extracción.....	34
2.6.2 Características para la extracción con el equipo SOXHLET	36
2.6.2.1 Selección del solvente	36
2.6.2.1.1 Características del solvente etanol.....	36
2.6.2.2 Características de la matriz	36
2.6.2.3 Condiciones de operación.....	37
2.6.3 Ventajas y desventajas de la extracción SOXHLET	37
2.6.4 Extracción sólido – líquido	38
2.6.4.1 Método de cálculo	42
2.6.4.1.1 Diagrama rectangular.....	42
2.6.4.2 Curva de retención.....	44
2.6.4.3 Tipos de contacto.....	45
2.6.4.3.1 Extracción múltiple en contracorriente.....	45
2.7 YOGURT.....	46
2.7.1 Valor nutricional del yogurt.....	46
2.7.2 Calidad de Yogurt	46
2.7.2.1 Requisitos Organolépticos	47
2.7.2.2 Requisitos Físico-Químicos.....	48

2.7.2.2.1 Parámetros de Control de calidad para la Elaboración del Yogurt....	49
- pH	49
- Acidez Titulable.....	50
- Grados Brix (°Brix)	51
2.7.2.3 Características Microbiológicas.....	51
- Escherichia coli	52
- Coliformes Totales	52
- Mohos y Levaduras	53
2.8 ADITIVOS ALIMENTARIOS	54
2.8.1 Definición de Aditivo Alimentario	54
2.8.1.1 Efectos adversos en la salud	54
2.8.2 Los colorantes ¿aditivos modernos?.....	55
2.8.3 Legislación actual	55
2.8.3.1 Los números E	55
2.8.4 Dosis de colorantes permitidos en la industria láctea (yogurt).....	56

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS	58
3.1 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	58
3.2 METODOLOGÍA.....	59
3.2.1 Tipo de estudio	61
3.3 FASES DE ESTUDIO.....	61
3.3.1 FASE I: Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos para la extracción del colorante (Antocianina)	61

3.3.2 FASE II: Examen preliminar de la uva silvestre	62
3.3.3 FASE III: Análisis Bromatológico de la uva silvestre	64
3.3.3.1 Evaluación organoléptica	64
3.3.3.2 Análisis químico	65
3.3.3.2.1 Humedad	65
3.3.3.2.2 Ceniza.....	66
3.3.3.2.3 Materia Orgánica.....	69
3.3.4 FASE IV: Extracción del colorante (Antocianinas).....	69
3.3.5 FASE V: Análisis cualitativo de los extractos obtenidos no concentrados	73
3.3.5.1 Prueba de Shinoda	74
3.3.5.2 Prueba con Zn/HCl.....	74
3.3.5.3 Prueba con NaOH 1N	74
3.3.5.4 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido.....	74
3.3.5.5 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH alcalino	75
3.3.6 FASE VI: Cuantificación de antocianinas totales en el extracto obtenidos no concentrados	75
3.3.7 FASE VII: Concentración del extracto seleccionado	78
3.3.7.1 Determinación de Solidos totales en el extracto concentrado (colorante) de uva silvestre.....	79
3.3.8 FASE VIII: Aplicación del colorante natural (antocianina) en el Yogurt Natural	81
3.3.8.1 Factores de estudio.....	82
3.3.8.2 Variables a evaluar	82
3.3.8.2.1 Variables Cuantitativas.....	83
- Determinación del pH en el yogurt	83
- Determinación de la Acidez Titulable en el yogurt	83
- Determinación de los Grados Brix en el yogurt.....	85

3.3.9 FASE IX: Análisis y comparación con muestras referentes de un colorante natural comercial y otro artificial.....	85
3.3.9.1 Consideración y análisis de todas las muestras	86
3.3.10 FASE X: Pruebas Microbiológicas en el yogurt.	87
3.3.10.1 Recuento de Escherichia coli, Coliformes totales, Mohos y Levaduras	87
3.3.11 FASE XI: Análisis sensorial.....	89

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y RESULTADOS

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS	90
4.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA UVA SILVESTRE.....	90
4.1.1 Evaluación organoléptica	90
4.1.2 Análisis químico	91
4.2 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LOS EXTRACTO NO CONCENTRADOS DE UVA SILVESTRE	92
4.3 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LOS EXTRACTOS NO CONCENTRADO DE UVA SILVESTRE.....	95
4.4 EXTRACCIÓN DEL COLORANTE (ANTOCIANINA).....	99
4.4.1 Determinación del rendimiento del colorante extraído.....	100
4.4.1.1 Rendimiento práctico	101
4.4.1.2 Rendimiento teórico	101
4.5 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DEL COLORANTE OBTENIDO APLICADO AL YOGURT NATURAL CON MUESTRAS REFERENTES A UN COLORANTE COMERCIAL Y OTRO ARTIFICIAL	108
4.5.1 Determinación de pH en el yogurt.....	108
4.5.2 Determinación de Acidez Titulable en el yogurt	110

4.5.3 Determinación de los grados brix (°Brix) en el yogurt.....	112
4.6 Análisis microbiológico en el yogurt.....	114
4.6.1 Recuento de Coliformes totales, Escherichia coli, Mohos y Levaduras	114
4.7 ANÁLISIS SENSORIAL DEL YOGURT	116

CAPÍTULO V

ANÁLISIS ECONOMICO

5. ANÁLISIS ECONÓMICO.....	128
5.1 ANÁLISIS PRELIMINAR DE COSTOS.....	128
5.2 CONSIDERACIONES PREVIAS	129
5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE COSTOS.....	133

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES.....	134
-----------------------------	------------

CAPÍTULO VII

7. RECOMENDACIONES.....	136
--------------------------------	------------

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA.....	137
--------------------------	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica	6
Tabla 2. Composición química de la uva silvestre	11
Tabla 3. Contenido de antocianinas totales en algunas frutas	24
Tabla 4. Grupos y Ejemplos de Cromóforo	28
Tabla 5. Colorantes naturales	29
Tabla 6. Clasificación de colorantes por sus características químicas	30
Tabla 7. Clasificación de colorantes según su origen	31
Tabla 8. Colorantes artificiales	32
Tabla 9. Requisitos Físico-Químicos para el yogurt, (IBNORCA ,2006 NB-33016)	48
Tabla 10. Características microbiológicas del yogurt, (IBNORCA, 2006 NB-33016)	51
Tabla 11. Dosis (mg/kg) de tipos de colorantes permitidos en el yogurt	57
Tabla 12. Dosis del colorante de uva silvestre para cada tratamiento. ml de colorante/100 ml de yogurt natural	81
Tabla 13. Factores de estudio	82
Tabla 14. Muestras para análisis y comparación frente al colorante natural obtenido	86
Tabla 15. Análisis de todas las muestras almacenados en refrigeración (5 °C)	86
Tabla 16. Resultados del análisis bromatológico de la uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>)	92
Tabla 17. Prueba shinoda de identificación para Flavonoides	93
Tabla 18. Prueba con Zn/HCl para identificación de Flavonoides	94
Tabla 19. Prueba con Hidróxido de Sodio 1N para identificación de Flavonoides	95
Tabla 20. Prueba a un pH ácido para identificación de Antocianinas	95
Tabla 21. Prueba a un pH alcalino para identificación de Antocianinas	96

Tabla 22. Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente alcohol etílico	97
Tabla 23. Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente alcohol etílico acidificado	97
Tabla 24. Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente agua destilada	98
Tabla 25. Resultados de las concentraciones de antocianinas (mg/L) en el extracto liquido de uva silvestre a partir de 250 gramos	99
Tabla 26. Comparación de resultados de rendimiento práctico y teórico	109
Tabla 27. Resultados de la variación de pH en él yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C	109
Tabla 28. Resultados de la variación del porcentaje de acidez titulable en él yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C	112
Tabla 29. Resultados de la variación de los grados brix (° Brix) en él yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C	113
Tabla 30. Resultados del análisis microbiológico en él yogurt en los distintos tratamientos	115
Tabla 31. Costos variables (expresado en Bs)	131
Tabla 32. Costos fijos (expresado en Bs)	132
Tabla 33. Costo total de producción del colorante natural de uva silvestre (expresado en Bs)	132
Tabla 34. Preparación de Reactivos	Anexo 1
Tabla 35. Identificación para Flavonoides	Anexo 2
Tabla 36. Identificación para Flavonoides	Anexo 2
Tabla 37. Identificación para Flavonoides	Anexo 2
Tabla 38. Identificación para Antocianinas.....	Anexo 2
Tabla 39. Datos experimentales para la determinación de la humedad	Anexo 3
Tabla 40. Datos experimentales para la determinación de cenizas	Anexo 3
Tabla 41. Datos experimentales para la determinación de la materia orgánica	Anexo 3

Tabla 42. Datos experimentales para la determinación de sólidos totales en el colorante natural	Anexo 4
Tabla 43. Resultados de la cantidad de soluto presente en la uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>)	Anexo 4
Tabla 44. Resultados de pruebas experimentales en distintas cantidades de muestras para la construcción de la curva de retención	Anexo 4
Tabla 45. Datos experimentales para la construcción de la curva de retención	Anexo 4
Tabla 46. Volumen gastado de NaOH para su estandarización	Anexo 5
Tabla 48. Análisis de la cantidad total de colorante natural concentrado de uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>). Utilizado en la práctica	Anexo 6
Tabla 49. Variación de pH, datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos	Anexo 7
Tabla 50. Variación del porcentaje de acidez titulable, datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos	Anexo 7
Tabla 51. Variación de los sólidos disueltos (°Brix), datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos	Anexo 7
Tabla 52. Datos experimentales del pH en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana)	Anexo 8
Tabla 53. Datos experimentales del porcentaje de acidez titulable en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana)	Anexo 8
Tabla 54. Datos experimentales de los sólidos disueltos (°Brix) en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana)	Anexo 8
Tabla 55. Análisis de costos	Anexo 9

ÍNDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Resultado del análisis bromatológico de la uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>)	92
Gráfica 2. Representación gráfica en diagrama rectangular sólido-líquido	108
Gráfica 3. Comparación de la cantidad de Antocianinas mg/L en el extracto líquido con diferentes solventes	100
Gráfica 4. Comparación de valores de pH en el yogurt de los distintos tratamientos	110
Gráfica 5. Comparación de valores del porcentaje de acidez titulable en el yogurt de los distintos tratamientos	112
Gráfica 6. Comparación de valores de los grados brix (° Brix) en el yogurt de los distintos tratamientos	114
Gráfica 7. Comparación de valores de Mohos y Levaduras en el yogurt de los distintos tratamientos	116
Gráfica 8. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T1	117
Gráfica 9. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T1	118
Gráfica 10. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T2	118
Gráfica 11. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T2	119
Gráfica 12. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T3	119
Gráfica 13. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T3	120
Gráfica 14. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación TCN	120

Gráfica 15. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación TCN	121
Gráfica 16. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación TCA	121
Gráfica 17. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación TCA	122
Gráfica 18. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T1	122
Gráfica 19. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T1	123
Gráfica 20. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T2	123
Gráfica 21. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T2	124
Gráfica 22. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T3	124
Gráfica 23. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T3	125
Gráfica 24. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación TCN	125
Gráfica 25. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación TCN	126
Gráfica 26. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación TCA	126
Gráfica 27. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación TCA	127
Gráfica 28. Determinación del punto de equilibrio	133
Gráfica 29. Variación semanal de pH en el yogurt, en los distintos tratamientos	Anexo 7
Gráfica 30. Variación semanal del porcentaje de acidez titulable en el yogurt, en los distintos tratamientos	Anexo 7

Gráfica 31. Variación semanal de los grados brix (°Brix) en el yogurt, en los distintos tratamientos Anexo 7

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>)	7
Figura 2. <i>Cissus verticillata</i> . A. rama con hojas e inflorescencias; B. inflorescencia; C. flor; D. botón floral; E. flor desprovista de pétalos, a. disco, b. ovario; F. corte longitudinal de fruto tierno, c. óvulo atrofiado, d. semilla	9
Figura 3. Bayas de uva silvestre maduras	10
Figura 4. Bayas de uva silvestre inmaduras	10
Figura 5. Estructura Básica de los Flavonoides	13
Figura 6. Principales grupos estructurales de Flavonoides	14
Figura 7. a. Estructura de las antocianidina más el monosacárido; b. Estructura básica de las antocianidinas.....	17
Figura 8. a. Estructuras de las antocianidinas; b. Perfil de sustitución y colores de antocianidinas en el espectro visible.....	18
Figura 9. Estructura de las antocianinas a diferentes pH	20
Figura 10. Longitudes de onda del Espectro.....	26
Figura 11. Equipo Soxhlet	35
Figura 12. Difusión del soluto en el disolvente	40
Figura 13. Diagrama Rectangular	43
Figura 14. Extracción múltiple en contracorriente	45
Figura 15. Mapa político de la 3ra sección de la provincia murillo (municipio de Achocalla)	58

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Selección de muestra	63
Fotografía 2. Muestra seleccionada	64
Fotografía 3. Determinación de humedad	66
Fotografía 4. Determinación de cenizas	67
Fotografía 5. Identificación de elementos minerales en las cenizas	68
Fotografía 6. Extractor Soxhlet	70
Fotografía 7. Pesado de la muestra	71
Fotografía 8. Cartucho armado	71
Fotografía 9. Extracción del colorante	72
Fotografía 10. Extracto de colorante envasado	73
Fotografía 11. Análisis cualitativo de antocianinas	75
Fotografía 12. Espectrofotómetro UV-Visible	76
Fotografía 13. Lectura de antocianinas en espectrofotómetro	78
Fotografía 14. Rotavapor	79
Fotografía 15. Determinación de sólidos totales del colorante concentrado	81
Fotografía 16. Medición de acidez en yogurt	84
Fotografía 17. Refractómetro manual	85
Fotografía 18. Recuento de Escherichia coli, Coliformes totales, Mohos y Levaduras	89
Fotografía 19. Muestras para la determinación de Humedad	Anexo12
Fotografía 20. Muestras para la determinación de cenizas	Anexo12
Fotografía 21. Bayas frescas de uva silvestre	Anexo12
Fotografía 22. Preparación de las muestras después del pesado	Anexo12
Fotografía 23. Ácido cítrico, alcohol etílico al 96° y agua destilada empleados para la extracción del colorante de uva silvestre	Anexo12
Fotografía 24. Armado del equipo Soxhlet	Anexo12
Fotografía 25. Extracción del colorante de uva silvestre por el Método Soxhlet	Anexo12

Fotografía 26. Extracto del colorante en soluciones de alcohol etílico, agua destilada y alcohol etílico acidificado (alcohol etílico-ácido cítrico)	Anexo12
Fotografía 27. Análisis de absorbancia de las distintas muestras de uva silvestre	Anexo12
Fotografía 28. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente alcohol etílico	Anexo12
Fotografía 29. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente alcohol etílico acidificado	Anexo12
Fotografía 30. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente agua destilada	Anexo12
Fotografía 31. Realización de Pruebas de Identificación para Flavonoides y Antocianinas	Anexo12
Fotografía 32. Rotavapor eliminando la parte alcohólica del colorante de uva silvestre	Anexo12
Fotografía 33. Concentrado del colorante obtenido de uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>)	Anexo12
Fotografía 34. Yogurt con diferentes dosis de colorante de uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>) al día 1	Anexo12
Fotografía 35. Yogurt con las diferentes dosis de colorante uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>), almacenado a 5°C	Anexo12
Fotografía 36. Titulación del yogurt con las diferentes dosis de colorante uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>), para la determinación de la acidez	Anexo12
Fotografía 37. Yogurt con diferentes dosis de colorante de uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>), al día 30	Anexo12
Fotografía 38. Colorante artificial rojo arrulla	Anexo12
Fotografía 39. Yogurt con colorante rojo arrulla (colorante artificial) al día 1	Anexo12
Fotografía 40. Yogurt con colorante rojo arrulla (colorante artificial), al día 30	Anexo12
Fotografía 41. Yogurt de frutilla con colorante carmín de cochinilla (colorante natural), al día 1 y 30	Anexo12

Fotografía 42. Extractos de uva silvestre por el método soxhlet en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) (B) y Agua destilada (C)	Anexo13
Fotografía 43. Prueba de Shinoda en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet	Anexo13
Fotografía 44. Prueba con Zn/HCl en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet	Anexo13
Fotografía 45. Prueba con NaOH 1N en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet	Anexo13
Fotografía 46. Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet	Anexo13
Fotografía 47. Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet	Anexo13
Fotografía 48. Yogurt natural PIL, empleado para la adición del colorante natural de uva silvestre a diferentes dosis	Anexo14
Fotografía 49. Yogurt de frutilla PIL que contiene colorante carmín de cochinilla, empleado para la comparación frente al yogurt con colorante natural de uva silvestre obtenido	Anexo14

RESUMEN

El presente trabajo titulado “Extracción de antocianinas a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) para su aplicación como colorante natural en derivados lácteos (yogurt)”, tuvo como objetivo principal el desarrollo de un colorante natural utilizando la uva silvestre como materia prima, esto para dar una alternativa más de colorante natural para uso en la industria de derivados lácteos. Estas bayas poseen antocianinas, pigmentos naturales de interés que dicha tonalidad fue apreciada por los matices morado y rojo, todos los procedimientos experimentales se desarrollaron en el Laboratorio de la carrera de Química Industrial de la Universidad Mayor de San Andrés.

En este trabajo se describe el método de extracción del colorante natural mediante extracción Soxhlet con diferentes solventes, llegando a la conclusión de que el mejor solvente para extraer este tipo de colorantes es el alcohol etílico, ya que se observa una mayor extracción de colorante (antocianinas). Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto.

Se realizaron pruebas cualitativas de identificación para Flavonoides y Antocianinas los cuales presentaron resultado positivo, es decir que en los extractos obtenidos si estaban presentes dichas moléculas, posteriormente se evaluó la concentración de antocianinas en los extractos de uva silvestre mediante espectroscopía UV-Visible, observando la presencia de la antocianina cianidina-3-glucósido. Finalmente, las muestras fueron sometidas a un análisis sensorial por medio de una prueba de degustación utilizando 10 panelistas. Se pudo establecer la efectividad de la tinción del colorante extraído, utilizando diferentes dosis de colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*), determinando así cuál de ellos tiene mejor estabilidad de color en el yogurt natural, las muestras con diferentes dosis del colorante obtenido fueron comparadas con una muestra de yogurt de frutilla comercial que contiene colorante natural carmín de

cochinilla, que fue tomado como referencia y otro con adición de colorante artificial; aclarar que la referencia es solo para la comparación de color ya que este proyecto no está orientado en la elaboración de un nuevo producto con todas las características propias. Se midió el pH, °Brix y acidez del yogurt natural con adición del colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*) como también a las muestras de yogurt con colorante natural y colorante artificial habiendo dejado las muestras almacenadas a una temperatura de 5°C por el lapso de 30 días. Las pruebas microbiológicas para verificar la presencia de Coliformes Totales, *Escherichia coli*, Mohos y Levaduras fueron negativas.

Los resultados comprobaron que el colorante obtenido de uva silvestre (*Cissus verticillata*) puede ser utilizado para derivados lácteos (yogurt) siempre que se garanticen unas condiciones adecuadas de almacenamiento.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El empleo de colorantes naturales tiene sus orígenes en la prehistoria, muchas civilizaciones ya empleaban en la antigüedad colorantes naturales en sus alimentos, artesanía y vestimenta. Con procesos rudimentarios extraían pequeñas cantidades de colorantes de una gran variedad de plantas silvestres que poseían características tintóreas, estos colorantes tienen una gran ventaja de ser resistentes al paso de los tiempos ⁽⁷⁷⁾. Las razones de su continuado uso a lo largo de la historia obedecen en buena medida, al potencial de tinción observado en productos naturales que se han venido añadiendo a los alimentos, con el fin de proporcionar una apariencia más apetecible, sin causar daños a la salud ⁽⁴⁰⁾.

Los colorantes naturales son utilizados para aumentar el color de los alimentos, ya sea porque el alimento ha perdido el color en su tratamiento industrial o bien para hacerlo más agradable a la vista. Según su origen, los colorantes naturales son obtenidos de materias primas principalmente de origen animal (cochinilla, moluscos, salmos, etc.) y vegetal (flavonoides, antocianinas, carotenoides, melanoidinas, porfirinas, betalinas, quinoides) y otros varios curcumina, carbón vegetal, índigo; aunque también los hay de tipo mineral. Con la aparición de los colorantes de origen químico, los colorantes naturales fueron perdiendo campo, pero en la actualidad mediante investigaciones científicas se ha podido comprobar los efectos nocivos de dichos colorantes, por tal razón los colorantes naturales han tenido mucho auge debido a su biodegradabilidad y su baja toxicidad; esto ha permitido que su uso en el ámbito mundial se incremente, debido a las exigencias en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas establecidas por las legislaciones de los diferentes países ⁽⁵⁾.

En el presente proyecto se obtuvo el colorante natural llamado Antocianina a partir de uva silvestre (*Cissus verticillata*), utilizando el método de Extracción Soxhlet, con diferentes solventes determinando en cuál de ellos se obtiene una mejor extracción, el proceso de extracción sólido-líquido se llevó a cabo mediante contacto múltiple en contracorriente. Se realizó pruebas cualitativas de identificación verificando la presencia de antocianinas (colorante natural), las pruebas cuantitativas determinaron la concentración de antocianina presente en 250 gramos de uva silvestre (*Cissus verticillata*). Posteriormente se aplicó el colorante obtenido al yogurt natural, se optó por utilizar una solución concentrada de colorante en diferente dosis 5,7%, 6,5% y 7,4% determinando así cuál de ellos tiene mejor estabilidad de color en el yogurt, para tal análisis se tomó como referencia un yogurt comercial de frutilla (PIL) y otro con adición de colorante artificial. Aclarar que la referencia es solo para la comparación de color ya que este proyecto no está orientado en la elaboración de un nuevo producto con todas las características propias. En el transcurso de 30 días de almacenamiento se tomaron datos semanales correspondientes a pH, Acidez y Grados Brix también se procedió a realizar pruebas microbiológicas para verificar la ausencia de Escherichia coli, Coliformes totales, Hongos y Levaduras. Todos estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de la carrera de Química Industrial de la Universidad Mayor de San Andrés.

1.1 ANTECEDENTES

En la revisión bibliográfica y documental realizada, se encontraron diversos estudios que hacen referencias a la obtención de colorantes naturales, los cuales sirven de base para los objetivos de la presente investigación. Entre estos estudios e investigaciones están:

Para (Menéndez, 2008) en su investigación realizada en la Escuela Superior Politécnica del Litoral “Obtención de Colorante para su uso en Yogurt a partir de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y del Mortiño (*Vaccinium myrtillus L.*)” misma que tuvo como objetivo utilizar como materia prima al mortiño 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 antociánicos. Además, se describen los métodos de extracción utilizados tomando como solvente una solución alcohólica acidificada (etanol – ácido cítrico) en diferentes concentraciones. Luego se analizó 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 determinó 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 con 20 panelistas cada uno (76).

En la investigación realizada por (CIFUENTES, 2011) en la Universidad Nacional de Bogotá Colombia, “Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos”. Cuyo objetivo fue realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de los pigmentos antociánicos en cuatro frutas tropicales colombianas: uva de árbol (*Myrciaria off coliflor* (Mart. D.Bery), coral (*Hyeronima macrocarpa* Mull. Arg), mora pequeña (*Rubus megalococcus* Focke) y motilón (*Hyeronima macrocarpa* Mull. Arg). Se obtuvieron los extractos enriquecidos en antocianinas. Estos extractos se analizaron por cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con interface electro spray (LC/MS-ESI). En estas dos frutas se identificaron las mismas antocianinas, siendo mucho mayor la concentración en el motilón que en el coral (14).

Según (Cano, 2011) en su investigación realizada en la Escuela Politécnica, Del Ejército “Extracción y uso de tres pigmentos naturales a partir de tomate de árbol (*solanum betaceum cav.*), mortiño (*vaccinium mytillus l.*) y la mora de castilla (*rubus glaucus*) como alternativa colorante natural para alimentos” que tiene como objetivo extraer tres pigmentos vegetales a partir del Mortiño (*Vaccinium mytillus L.*) Mora de castilla (*rubus glaucus*) y del mucílago interno que recubre a la semilla del Tomate de árbol (*Solanum betaceum Cav.*), como alternativa de sustitución parcial o total (12).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Este trabajo proporciona un conocimiento amplio sobre las propiedades y ventajas de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) como materia prima para la obtención de un colorante natural para su posterior aplicación en derivados lácteos (yogurt).

En la actualidad se ha dado mucha importancia a la producción de colorantes naturales por ser compuestos amigables con el ambiente. Existe un interés por conseguir productos naturales que aporten a mantener y corregir los defectos alimenticios que han desencadenado enfermedades cancerígenas, la hiperactividad en niños relacionada con las dificultades de aprendizaje, podía atribuirse en gran medida a los colorantes alimentarios artificiales, debido a esto se despliega una gran cantidad de recursos dirigidos hacia la búsqueda de nuevas alternativas alimenticias. El uso de colorantes se ha incrementado debido a que se convierte en un indicador de aceptación del consumidor esto ha venido dándose desde hace muchos años es por eso que diversos estudios han demostrado que la aceptación de un producto depende en buena medida de su apariencia y, por tanto, también de su color, por lo cual el consumidor ha optado utilizar colorantes naturales en lugar de colorantes sintéticos, es por ello que este estudio se enfoca en la obtención de un colorante natural que satisfaga las exigencias del mercado actual.

Por este motivo en el presente proyecto se busca dar una alternativa de colorante natural utilizando como materia prima la uva silvestre (*Cissus verticillata*), el cual se aplicará en derivados lácteos (yogurt), se pretende que los resultados de este estudio aporte con información tendiente a la utilización de estos colorantes para la industria alimenticia, ya que en Bolivia no existen estudios que han mostrado información básica sobre la uva silvestres (*Cissus verticillata*), tampoco se ha dado mucha importancia a dar nuevas alternativas de colorantes naturales a través de la investigación. Es por eso que muchos productos lácteos en nuestro país utilizan como colorante natural al carmín de cochinilla, generalmente como agente colorante del color rojo, rosa o púrpura. Actualmente este

colorante ha tomado una gran importancia debido a sus múltiples usos, desde la industria textil, farmacéutica, cosmética y alimentaria.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Extraer la antocianina a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) para su aplicación como colorante natural en derivados lácteos (yogurt).

1.3.2 Objetivos Específicos

El objetivo general se alcanzará con la consecución de los siguientes objetivos específicos.

- Desarrollar un método de extracción solido-líquido para obtener colorante natural (antocianina).
- Identificar la presencia de antocianina mediante el análisis cualitativo.
- Realizar el análisis cuantitativo para determinar la concentración de antocianina por el método de espectrofotometría UV-Visible.
- Establecer la mejor proporción de adición del colorante natural en remplazo del colorante artificial en el yogurt.
- Determinar la estabilidad del colorante natural obtenido mediante pruebas fisicoquímicas antes y después de la adición en el yogurt.
- Conocer el tiempo de vida útil del yogurt que contiene el colorante natural obtenido y realizar pruebas de comparación de color con productos que están en el mercado interno, que contienen colorante artificial y natural.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 UVA SILVESTRE

2.1.1 Taxonomía

La uva silvestre es un árbol que pertenece a la familia Vitáceae, género *Cissus* (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Nombre científico:	<i>Cissus verticillata</i>
Reino:	Plantae
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Vitales
Familia:	Vitaceae
Genero:	<i>Cissus</i>
Especie:	<i>Cissus verticillata</i>

FUENTE: (Nicolson, 1984) ⁽⁸³⁾.

Esta especie de planta tiene características particulares y necesidades climáticas y edafológicas específicas. Así, entre otras, es importante mencionar los diferentes requerimientos de frío invernal, es decir, el número de horas con temperaturas inferiores a 10°C (el cero fisiológico de los frutales de hoja caduca) necesarias para romper el receso invernal y permitir un crecimiento vigoroso de las yemas vegetativas y reproductivas. Tienen un requisito de frío que oscila entre las 800 y las 1200 horas, pudiendo resistir temperaturas extremas de hasta - 10 °C en el invierno. Son autos fértiles, se cultivan en suelos de pH entre 4.5 y 5.0 y presentan un período variable de

flor a fruto de 30 a 90 días ⁽⁸³⁾. Este cultivo se propaga muy fácilmente al retoñar de la cepa y además las aves ayudan esparciendo las semillas al alimentarse del fruto maduro.



FUENTE PROPIA.

Figura 1. Árbol de uva silvestre (*Cissus verticillata*).

2.1.1.1 Familia Vitáceae

Los géneros y especies pertenecientes a la familia Vitáceae no son fáciles de agrupar, sin embargo, estos son muy fáciles de reconocer como pertenecientes a esta familia. Todas las especies pertenecientes a la familia Vitáceae se caracterizan por tener forma de lianas, con hojas opuestas a los zarcillos e inflorescencias, una muy útil característica para la determinación de la familia en la ausencia de flores y frutos. Existen unas 600 especies, la mayoría de países crece de forma silvestre ⁽⁷⁰⁾.

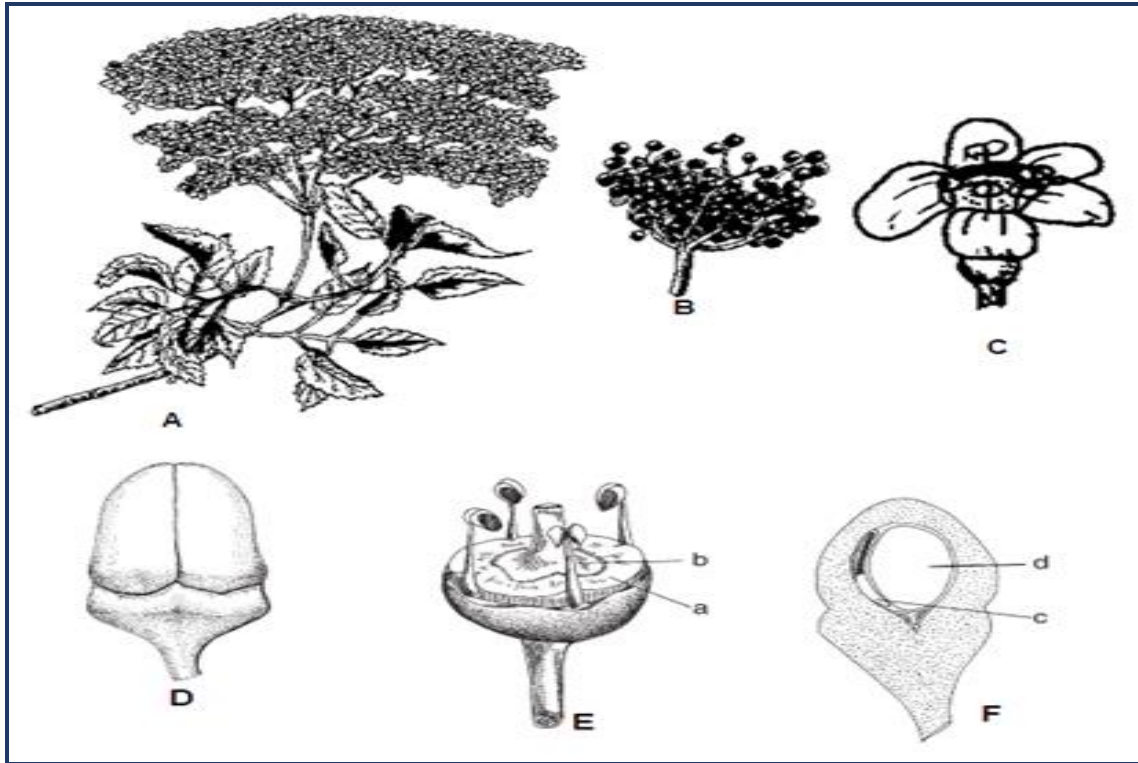
2.1.2 Distribución

Crece espontáneamente en las Américas, desde Florida hasta Bolivia y Paraguay y en las Antillas, especialmente en Cuba.

2.1.3 Descripción botánica

Árbol ramificado que mide 6 a 10 metros de altura, hojas alternas, con varias Inflorescencia racimosa. Flores perfectas de aspecto papilionáceo; 5 sépalos cóncavos color crema (70, 50).

- **Tallo:** De tallo leñosos de color marrón grisáceo muy flexible, con aspecto suberoso. Existe una segunda corteza llamada líber que aparece al rasgar superficialmente la planta.
- **Hojas:** Compuestas, pinadas de hasta 12 cm. De 5 a 7 foliolos ovados y dentados.
- **Inflorescencia:** En forma de cima compuesta umbeliforme hasta de 4 a 6 cm de largo y 5 a 7.5 cm de ancho, a veces varias agregadas a manera de panícula terminal, pedúnculos hasta de 2.5 cm de largo, brácteas triangulares, de 1 a 2 mm de largo, caducas, pedicelos delgados, de 2 a 4 mm de largo, glabros o a veces pubérulos.
- **Flores:** Olorosas agrupadas en inflorescencias llamadas corimbos, muy aplanadas de hasta 20 cm de diámetro. Corola de color crema de unos 5 mm, con 5 pétalos en forma de estrella.
- **Frutos:** Es una baya esférica u ovoide de 8 a 10 mm, carnosos en drupa que cuelgan hacia abajo en la madurez, de color morado oscuro o negruzco.
- **Semillas:** 2 o 3, ovoides, de 3 a 5.5 mm de largo, de color pardo oscuro (135).



FUENTE: (Lombardi, 2000) (70).

Figura 2. *Cissus verticillata*. **A.** rama con hojas e inflorescencias; **B.** inflorescencia; **C.** flor; **D.** botón floral; **E.** flor desprovista de pétalos, a. disco, b. ovario; **F.** corte longitudinal de fruto tierno, c. óvulo atrofiado, d. semilla.

2.1.4 El fruto

La uva silvestre (*Cissus verticillata*) es una baya esférica que, según las condiciones del tiempo durante su crecimiento, puede variar en tamaño, de 8 a 10 mm de diámetro, y en color, desde morado oscuro hasta negro. Tiene un sabor dulce y ligeramente ácido a la vez. Los frutos verdes tienen aproximadamente un 7% de azúcares y los maduros un 15%. Durante la maduración, se producen cambios en la pared celular que provocan un ablandamiento de los frutos. Esto mejora su sabor, pero los vuelve más vulnerables a los daños físicos y microbiológicos. Las uvas silvestres maduras tienen una vida postcosecha muy corta. Para prolongarla se requiere controlar la temperatura y la humedad de almacenamiento, no deben ser expuestas a temperaturas superiores a 10°C

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

y, preferiblemente, deben almacenarse entre - 0.5 y 0°C (63, 89). En estas condiciones tienen una vida útil de aproximadamente 1 mes.

Las bayas de la uva silvestre deben consumirse únicamente cuando están maduras y brillantes, como se indica en la Figura 2, cuando están verdes como se muestran en la Figura 3, posee un alto contenido de sambunigrina con un 0.8%, este es un glucósido cianogénico, que puede producir vómitos, diarrea entre otros.



FUENTE PROPIA.

Figura 3. Bayas de uva silvestre maduras.




FUENTE PROPIA.

Figura 4. Bayas de uva silvestre inmaduras.

2.1.5 Composición química de la uva silvestre

En la Tabla 2 se presenta la composición química de la uva silvestre (49, 96). Estas bayas poseen un alto contenido en fibra dietética y son ricas en minerales como potasio, manganeso y magnesio. Cabe destacar, además, su alto contenido en compuestos fenólicos (monofenoles, polifenoles y flavonoides) entre los que se encuentran las antocianinas (tabla 2) que junto a las vitaminas C y E, confieren a este alimento una gran capacidad antioxidante. Además, parecen ejercer una acción antimicrobiana, potenciadora del sistema inmune y reguladora de la presión arterial y la glucemia (49).

Tabla 2. Composición química de la uva silvestre.

COMPOSICIÓN QUÍMICA	
<p>PRINCIPIO ACTIVO FRUTO (UVA SILVESTRE)</p> 	<ul style="list-style-type: none"> -Carbohidratos: 15.69 gramos. -Grasas: 0.16 gramos. -Proteínas: 0.73 gramos. -Riboflavina (Vitamina B2): 0.07 miligramos, es un 5%. -Niacina (Vitamina B3): 0.18 miligramos, es un 1%. -Vitamina B6: 0.8 miligramos, es un 7%. -Ácido fólico: 2 microgramos, es un 1%. -Vitamina C: 10.8 miligramos, es un 18%. -Vitamina E: 1.48 miligramos, es un 18%. -Tiamina (Vitamina B1): 22 microgramos, es un 21%. -Calcio: 10 miligramos, son 1%. -Hierro: 0.4 miligramos, 3%. -Magnesio: 7 miligramos, es un 2%. -Fósforo: 20 miligramos, son 3%. -Potasio: 191 miligramos, son un 4%.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

	<ul style="list-style-type: none">-Sodio: 3 miligramos, es un 0%.-Antocianinas (Color morado): 235 miligramos, es un 25%.-Antioxidantes: 16,7 miligramos, es un 27,8%.-Aceite esencial: 0.01%.
--	---

FUENTE: (<https://www.botanical-online.com/medicinalssauco.htm>, s.f.) (49).

2.1.6 Mercado nacional

En el Bolivia no existe una producción industrial de la uva silvestre. Actualmente este árbol crece de manera silvestre en el departamento de La Paz. Antecedentes nos muestran que la mayoría de estos cultivos están instalados en el municipio de Achocalla y en algunos sitios de la ciudad de La Paz. La mayoría de los pobladores de Achocalla no le dan mucho interés a este fruto y otros suelen comercializarlas para hacer mermeladas. La uva silvestre continúa creciendo a un ritmo de entre 2% a 5% anual, el bajo interés en el fruto y un enorme desconocimiento de las aplicaciones y los veneficios de este hacen que no se cultiven en gran cantidad y mucho menos comercializarlas.

2.2 FLAVONOIDES

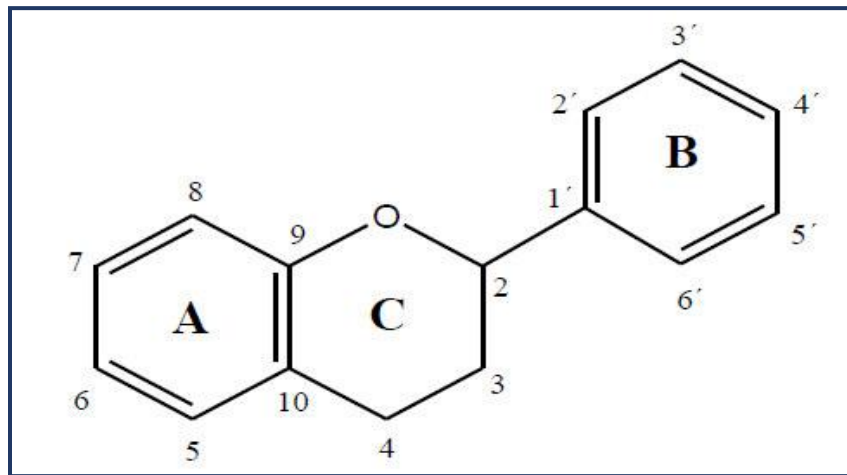
Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenolicos distribuidos en el reino vegetal, ejercen un amplio espectro de funciones en las plantas, principalmente son responsables de los colores vivos de muchas frutas, verduras y flores. Entre otras funciones dan al organismo protección de todos los daños ocasionados por elementos o sustancias oxidantes como la contaminación ambiental, los rayos ultravioletas y sustancias altamente nocivas que se encuentran en los alimentos (102).

Los flavonoides, se refiere a un grupo aromático, pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno ampliamente distribuido entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (106). Por ende, se encuentran en

abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos y té verde (*Camellia sinensis*).

2.2.1 Estructura y clasificación de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos A y C son números ordinarios del 2 al 8 y el anillo B con números primos desde el 2' al 6' (Figura 5).

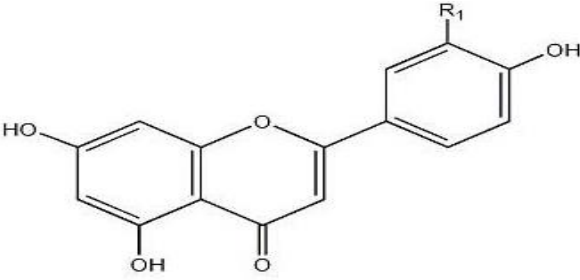
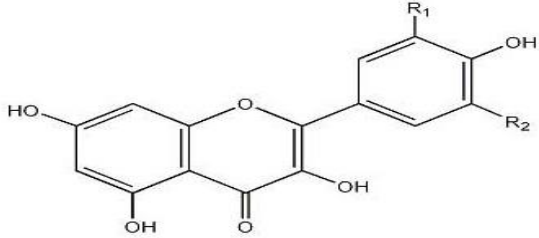
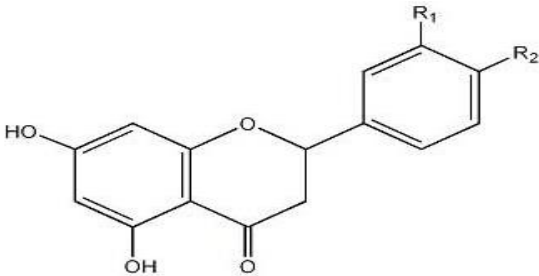
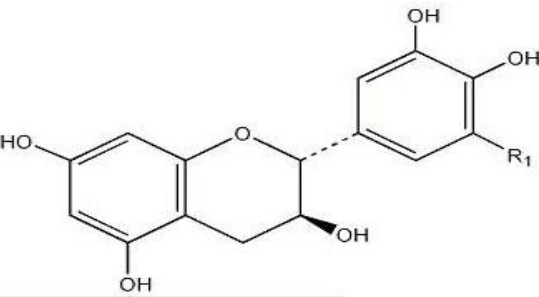
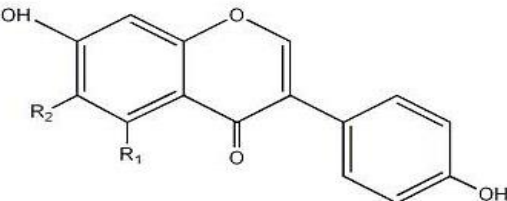
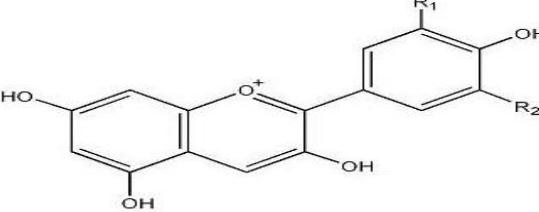


FUENTE: (Martínez-Flórez S, 2002) (74).

Figura 5. Estructura Básica de los Flavonoides.

La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y/o variaciones en el anillo C y sustituciones, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos (74). Los diferentes flavonoides se distinguen por su grado de oxidación, la cantidad de grupos hidroxilicos (OH) y los azúcares ligados a la molécula.

Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central, pueden diferenciarse varios tipos de flavonoides (Figura 6):

Flavonas	Flavonoles
 <p data-bbox="406 535 665 619"> $R_1 = H$: Apigenin $R_1 = OH$: Luteolin </p>	 <p data-bbox="901 504 1323 609"> $R_1 = H$; $R_2 = H$: Kaempferol $R_1 = OH$; $R_2 = H$: Quercetin $R_1 = OH$; $R_2 = OH$: Myricetin $R_1 = OCH_3$; $R_2 = H$: Isorhamnetin </p>
Flavanonas	Flavanoles
 <p data-bbox="300 1060 738 1144"> $R_1 = H$; $R_2 = OH$: Naringenin $R_1 = OH$; $R_2 = OH$: Eriodictyol $R_1 = OH$; $R_2 = OCH_3$: Hesperetin </p>	 <p data-bbox="868 1060 1209 1134"> $R_1 = H$: (+)-Catechin $R_1 = OH$: (+)-Gallocatechin </p>
Isoflavonas	Antocianinas
 <p data-bbox="300 1543 673 1638"> $R_1 = H$; $R_2 = H$: Daidzein $R_1 = OH$; $R_2 = H$: Genistein $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$: Glycitein </p>	 <p data-bbox="917 1543 1372 1659"> $R_1 = H$; $R_2 = H$: Pelargonidin $R_1 = OH$; $R_2 = H$: Cyanidin $R_1 = OH$; $R_2 = OH$: Delphinidin $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OH$: Petunidin $R_1 = OCH_3$; $R_2 = OCH_3$: Malvidin </p>

FUENTE: (<ftp://ftp.mmm.com/pub/Mx/PYM.pdf>, s.f.) (27).

Figura 6. Principales grupos estructurales de Flavonoides.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

- **Flavonas y flavonoles:** Están presentes en muchos vegetales y son los flavonoides más comunes; están ampliamente distribuidos en frutas y las verduras. Las Flavonas que se conocen son el perejil y el apio y dentro de los Flavonoles las fuentes más ricas son la col rizada, puerro, brócoli y arándanos (66, 105).
- **Flavanonas y flavanoles:** Estos compuestos existen en muy pequeñas cantidades comparados con los otros flavonoides. Son incoloros o solo ligeramente amarillos. Por su baja concentración y su característica incolora, ellos han sido grandemente desatendidos.
El grupo de flavanonas se encuentra exclusivamente en altas concentraciones en la corteza de los frutos cítricos. Los flavanoles se encuentran frecuentemente en combinación con ácidos orgánicos, principalmente el ácido gálico. El cacao es una fuente rica de flavanoles, sin embargo, muchos productores de chocolate eliminan los flavanoles por su sabor amargo. El consumidor no está informado porque este tipo de información no es obligatorio en la etiqueta (35).
- **Antocianinas:** Las antocianinas siempre se encuentran como glicósidos; después de la clorofila, son el grupo más importante de pigmentos en las plantas visibles al ojo humano y proporcionan el color malva, rosa, violeta y azulado a numerosas flores y frutos, como por ejemplo la fresa, el clavel, las manzanas y la uva (29, 21).
- **Isoflavonoides:** Casi todos los flavonoides tienen el anillo heterocíclico en posición 2; en los isoflavonoides el anillo B ocupa la posición 3. Las isoflavonas son todas coloreadas y están mucho menos distribuidas en las plantas de hecho están casi restringidas a las leguminosas y sobre todo en la soja (72).

2.3 ANTOCIANINAS

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 (6). Una gran diversidad de antocianinas presentes en la naturaleza las convierte en un grupo muy complejo e interesante. Se han reportado alrededor de 635 antocianinas diferentes, con variadas estructuras base. Las antocianinas se encuentran ampliamente en el reino vegetal y son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul. Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas; tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (2).

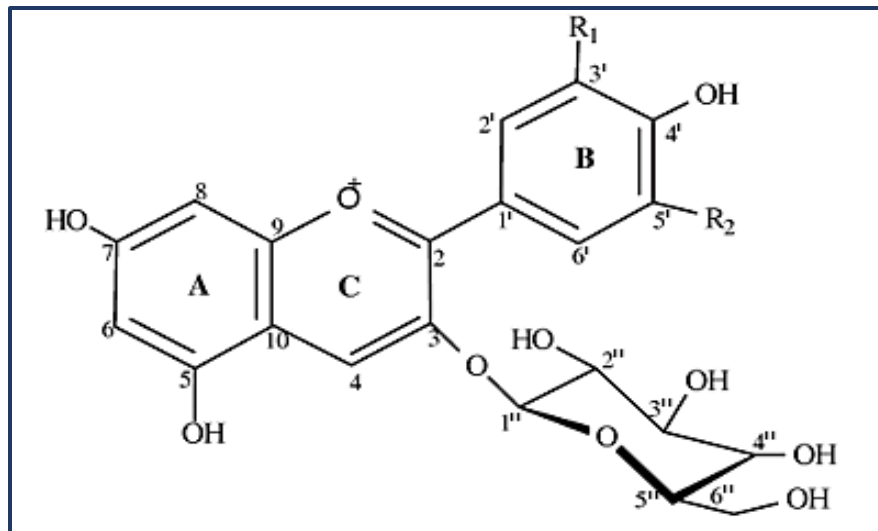
Las antocianinas están presentes en la uva silvestre (*Cissus verticillata*). Estos compuestos son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (13, 81).

2.3.1 Estructura química de las antocianinas

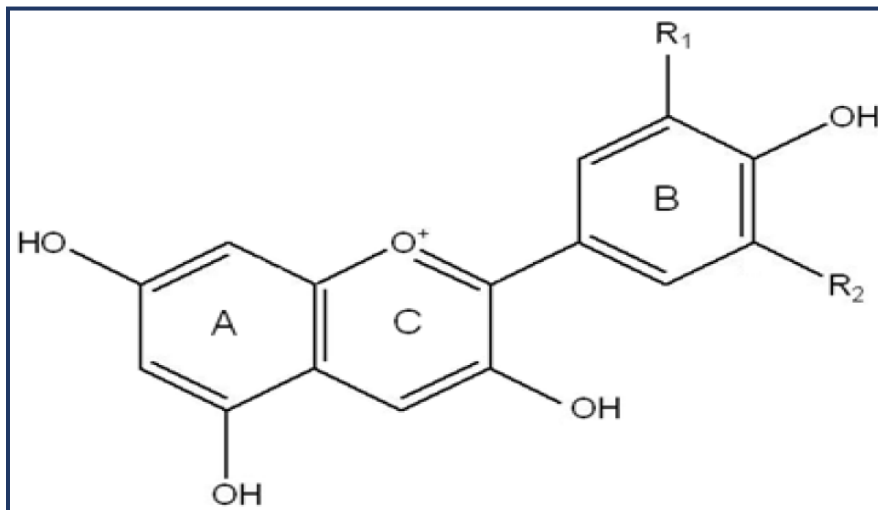
Las antocianinas son glucósidos solubles, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina que es la aglicona, unida a un monosacárido (azúcar) (Figura 7a). Los monosacáridos comúnmente encontrados son D-glucosa, D-galactosa, L-Ramnosa, D-arabinosa y D-xilosa. Normalmente los monosacáridos se unen en la posición 3 de la antocianidina.

La estructura química básica de las antocianidinas es el ion flavilo, también llamado 2-fenilbenzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono. El ion flavilo puede tener diferentes sustituciones (Figura 7b) (108).

a)



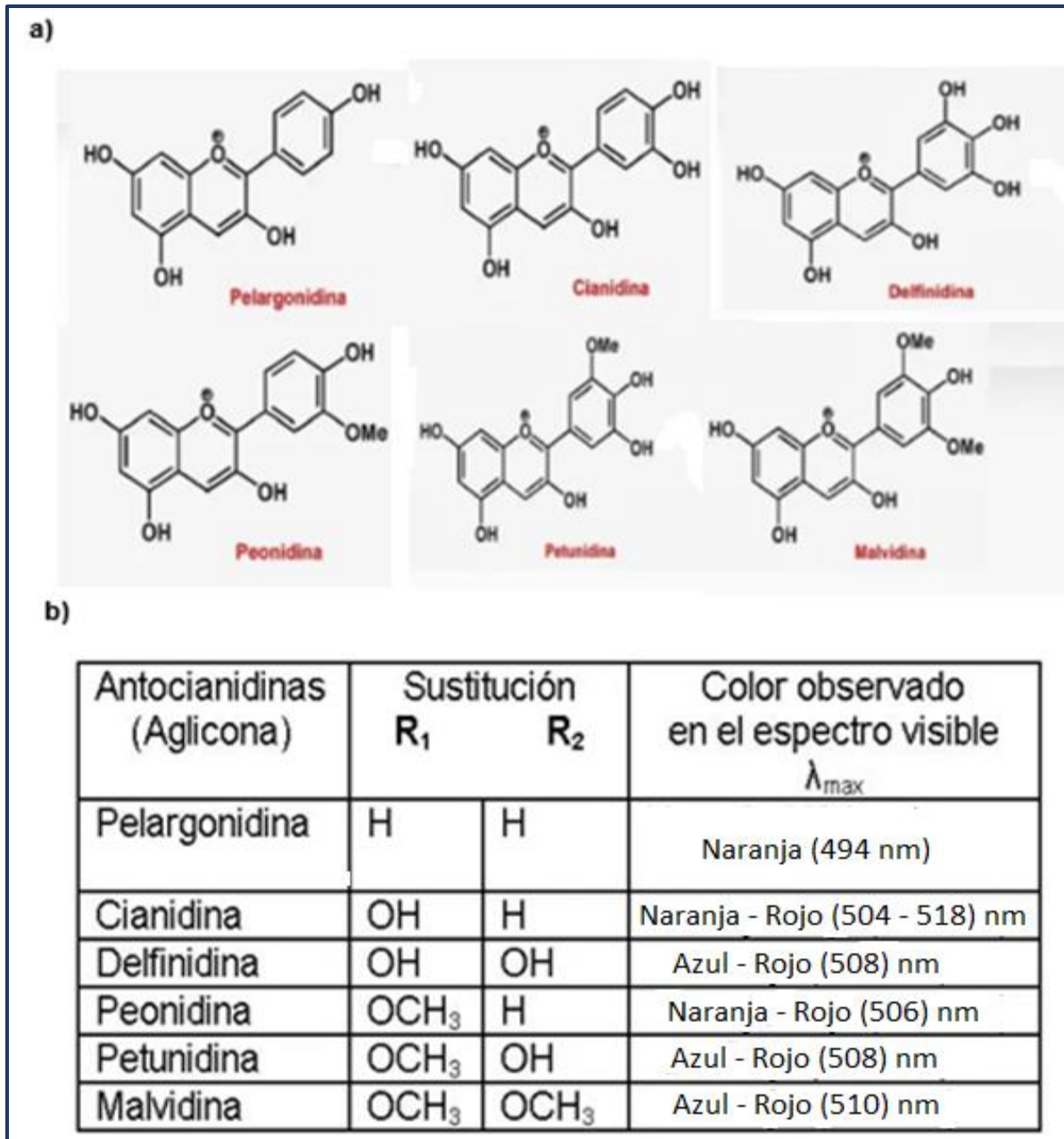
b)



FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

Figura 7. a. Estructura de las antocianidina más el monosacárido; **b.** Estructura básica de las antocianidinas.

Cuando el residuo de azúcar es hidrolizado de la antocianina, el resultado es la aglicona, conocida como antocianidina. Las antocianidinas se clasifican según sustitución en: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Figura 8).



FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

Figura 8. a. Estructuras de las antocianidinas; **b.** Perfil de sustitución y colores de antocianidinas en el espectro visible.

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia

tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas.

2.3.2 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

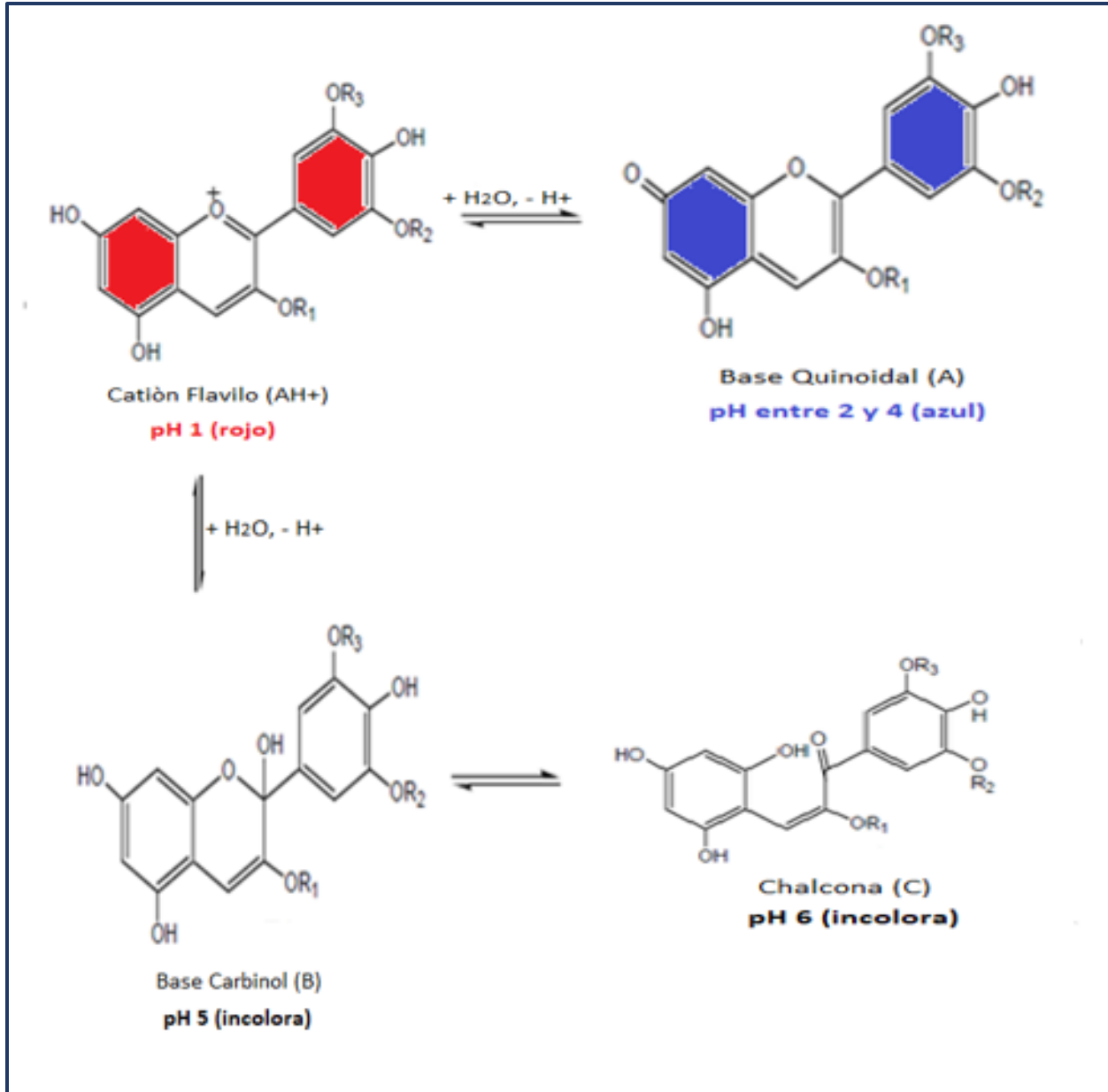
Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas. La estructura de éstas puede verse afectada en cualquier etapa de un proceso tecnológico, como por ejemplo un proceso de extracción de antocianinas de un material vegetal, como así también durante un tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene. A continuación, se exponen los factores más relevantes que afectan a la estabilidad de las antocianinas.

2.3.2.1 pH

Las antocianinas son compuestos cromóforos al igual que los carotenos y las xantofilas, pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad, también el color depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran (Figura 9).

A pH 1 predomina el catión flavilo que se encuentra principalmente en la forma AH^+ el cual es rojo intenso, la forma más estable de las antocianinas. A medida que el pH sube la forma AH^+ del catión flavilo disminuye por el efecto de conjugación del catión flavilo o hidratación del C7, es decir que a valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la forma de base quinoidal (A) de color azul. Entre pH 5 y 6 se observan la forma carbinol (B) que es incolora y chalcona (C) la cual es fácilmente degradada, ambas bastante inestables.

A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (13, 31, 81).



FUENTE: (Castañeda-Ovando A, 2009) (13).

Figura 9. Estructura de las antocianinas a diferentes pH.

Cuando el medio es altamente ácido, la cantidad de protones (H⁺) libres bloquean las pares de electrones no compartidos de los grupos sustituyentes, con lo cual se evita la inestabilidad de la molécula. Cuanto más bajo es el pH menor es el deterioro de las antocianinas (66).

2.3.2.2 Temperatura

La temperatura es otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas. La estabilidad de las antocianinas encontrados en los alimentos disminuye durante el procesamiento y el almacenamiento al aumentar la temperatura, eventualmente la degradación térmica genera productos cafés, especialmente con la presencia de oxígeno (78). Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante un corto periodo de tiempo. En la extracción de antocianinas de grosellas negras investigaron el efecto de la temperatura de extracción en el rango de 6 y 74°C, obteniendo los mayores rendimientos a 30 - 35°C (11). En otros estudios se obtuvieron extractos de antocianinas de 4 especies de berberies y lo almacenaron durante 84 días a temperaturas entre 5 y 35°C, observando que el deterioro de las antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura (66).

El equilibrio entre las estructuras de las antocianinas son reacciones endotérmicas, en una dirección de izquierda a derecha, la consecuencia es la producción de chalconas incoloras. El retorno de chalconas a flavilo es lento (31).



2.3.2.3 Oxígeno

Las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta en la que éstas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura (101). La retención de color es mejorada cuando el oxígeno es removido por calentamiento, puede ser por vacío o por flujo de nitrógeno.

2.3.2.4 Luz

La luz afecta a las antocianinas de dos maneras: es esencial para la biosíntesis, pero también acelera su degradación. Las antocianinas conservan su color mucho mejor cuando se mantienen en la oscuridad; ya que se ha visto esta diferencia después de 24 horas de ser almacenadas en la luz en comparación a cuando se almacenan en la oscuridad. Además, se ha estudiado la estabilidad de las antocianinas bajo la luz de neón y en la oscuridad por 24 semanas, mostrando que la luz decrece considerablemente el contenido de fenoles y antocianinas durante el almacenamiento.

2.3.2.5 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 ⁽⁵⁾.

2.3.3 Propiedades antioxidantes de las antocianinas

Por sus características hidrosolubles, las antocianinas podrían incorporarse a alimentos acuosos. Las uvas, comparados con otras frutas y vegetales, tienen un elevado contenido de estos compuestos y, a priori, una capacidad antioxidante muy alta ^(23, 95). Sin embargo, existen factores que pueden afectar la actividad antioxidante de los frutos, tales como el grado de madurez en la cosecha, estación, diferencias genéticas, condiciones ambientales previas a la cosecha, condiciones de almacenamiento posteriores a la cosecha y procesamiento ⁽¹⁵⁾. Dentro de las sustancias con capacidad antioxidante que se encuentran en arándano se pueden señalar, no solamente a las antocianinas, sino también fenoles y vitamina C, entre otros ⁽¹⁰⁷⁾. Por lo tanto, a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*), se podría obtener un producto rico en antioxidantes, especialmente en antocianinas que podría ser incorporado a ciertos alimentos, tales como cremas, helados, bebidas, frutos, etc.; impartiendoles la característica de alimento

funcional. Además, dado que el color juega un rol importante en la preferencia y aceptabilidad de un alimento, este producto también podría ser utilizado como colorante natural.

Resumiendo, la obtención de un producto rico en antocianinas derivado de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) podría tener un impacto positivo, dado que:

- Se obtendría un colorante natural, constituyendo una alternativa a los cuestionados colorantes sintéticos.
- Se ofrecería una alternativa de industrialización de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) que no puedan introducirse, por distintos motivos, en el mercado de consumo en fresco.

2.3.3.1 Generalidades de los antioxidantes

El metabolismo normal del oxígeno lleva a la producción de especies oxidantes. Estas reaccionan químicamente con los componentes naturales, modificando o suprimiendo su función biológica. Los organismos se defienden de este daño mediante una compleja red de defensas antioxidantes. El oxígeno componente vital para la supervivencia de las especies humanas, está presente en la atmósfera en forma de un triplete estable (O_2). Una vez inhalado, sufre un proceso de reducción gradual hasta ser metabolizado convirtiéndose en agua. Durante este proceso, se forma una pequeña cantidad de reactivos intermediarios, como el radical superóxido (O_2^*), radical hidroxilo (*OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos compuestos son llamados especies reactivas del oxígeno (ROS) y pueden iniciar el proceso de peroxidación de las membranas lipídicas que conllevan a la acumulación de peróxidos. Los productos de la peroxidación por ellos mismos, así como los de la oxidación secundaria como el malonaldehído (MDA) y el 4 – hidroxinonenal (4 - HNE) que son altamente reactivos; pueden reaccionar con sustratos biológicos como las proteínas, aminas y ácido desoxirribonucleico (DNA). Dichos procesos ocasionan una serie de enfermedades degenerativas y contribuyen significativamente al envejecimiento y riesgo de contraer cáncer ⁽¹⁶⁾.

2.3.4 Antocianinas en frutas

El estudio de las antocianinas en frutas, ha tomado fuerza la última década no solo por la capacidad colorante, sino también por su capacidad antioxidante ⁽³¹⁾. Muchas frutas son ricas en antocianinas y en la mayoría de los estudios publicados se ha realizado la identificación y cuantificación de estos pigmentos por HPLC-EM y HPLC-DAD, se ha publicado una extensa revisión sobre antocianinas en frutas tropicales hasta el año 1987 encontrando cerca de 20 compuestos responsables del color rojo en frutas ⁽⁷⁵⁾.

Recientemente se han publicado varios estudios dedicados a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales ricas en antocianinas, en la tabla 3 se detalla el contenido de antocianinas en algunos alimentos ⁽²⁹⁾.

Tabla 3. Contenido de antocianinas totales en algunas frutas.

Producto	Antocianinas totales (mg /100 gr)
Zarzamora	83-326
Mora	25-495
Frambuesa negra	214-428
Frambuesa roja	20-60
Cereza dulce	350-450
Arándano	78
Jugo de arándano	18-87
Fresa	7-30
Jugo de fresa	21-333
Uva roja	30-750
Vino rojo	100-1000
Grosella negra	250
Grosella roja	12-19
Manzana	10
Col roja	25

FUENTE: (Fuleki, 1968) ⁽²⁹⁾.

En general el contenido total de antocianinas en frutas puede estar entre 7 y 1000 mg /100g de fruta fresca ⁽²⁹⁾.

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

2.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS

Existen distintas formas para determinar la concentración de antocianinas ya sea en forma total o en forma separada cada antocianina. Si se quiere establecer las antocianinas en forma general muchos autores de diversos estudios utilizan el método de pH diferencial ⁽¹⁰⁰⁾.

2.4.1 Cuantificación del total de antocianinas mediante el método de pH diferencial

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Esto es posible porque las antocianinas tienen una típica banda de absorción entre 490 y 550 nm en la región del espectro visible, los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas, generalmente expresados como cianidina-3-glucósido o delphinidina-3-glucósido (las antocianinas más comunes).

El método de pH diferencial permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas tampón y la medición por espectrometría de UV-Visible. Se obtiene una medida de la absorbancia máxima en la región visible, seguida por la decoloración. Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias, la forma del oxonio coloreado predomina a pH 1 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5 ⁽⁶⁹⁾.

La concentración de antocianinas (mg/L) se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{(\epsilon * 1)}$$

Ecuación 1

Dónde:

A = Absorbancia.

PM = peso molecular.

FD = Factor de dilución (volumen total/volumen del extracto).

ϵ = absortividad molar.

La absorbancia se calcula de la siguiente manera:

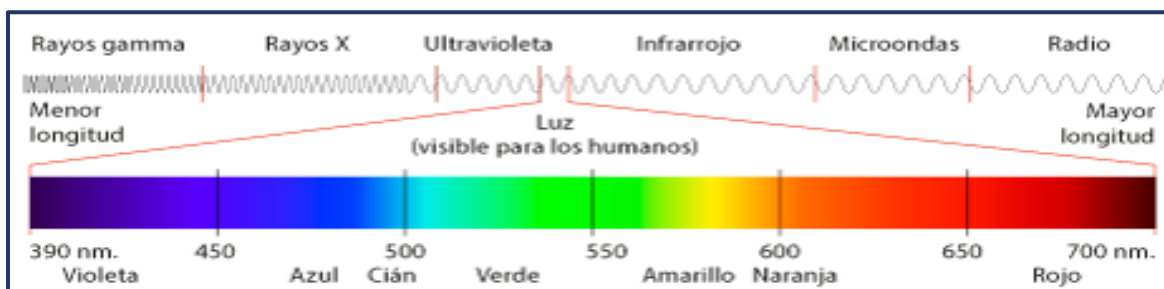
$$A = (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

Ecuación 2

Espectrofotometría:

La espectrofotometría se refiere a los métodos, cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y, según sea la radiación utilizada, como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja (54).

La espectrofotometría es una técnica que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética. La luz que se encuentra en el rango visible y ultravioleta de los espectros electromagnéticos presenta una energía de 150- 400 kJmol^{-1} . La energía de la luz es usada para promover electrones de un estado de excitación a otro. Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud (3).



FUENTE: (Visible Ivanovic, 2014) (121).

Figura 10. Longitudes de onda del Espectro.

Características del sistema:

- Las muestras en solución se ponen en una pequeña celda de silicio.
- Se utilizan dos lámparas: una de hidrogeno o deuterio para la región UV y una de W/halógeno para la región visible.
- Se utiliza también una celda de referencia que contiene solo solvente.
- La luz pasa simultáneamente por la celda de muestra y la celda de referencia.
- El espectrofotómetro compara la luz que pasa por la muestra con la que pasa por la celda de referencia.
- La radiación transmitida es detectada y el espectrofotómetro obtiene el espectro de absorción al barrer la longitud de onda de la luz.

2.5 COLORANTES

Los colorantes son sustancias que dan color a los alimentos, cosméticos, textiles y hasta al mismo cuerpo humano; son los responsables de hacer a estos productos atractivos e informativos, mejorando su aspecto visual y dando respuesta a las expectativas del consumidor ⁽⁶²⁾. Uno de los atributos más agradables de un alimento es su color, los alimentos pueden adquirir su color de cualquier fuente. Una fuente principal es la de los pigmentos vegetales y animales. La clorofila que da el color verde a las lechugas, los carotenos que da el color anaranjado a las zanahorias y el maíz, el licopeno que contribuye al rojo de los tomates y la sandía, las antocianinas que contribuye al morado de las moras y la hemoglobina que da el color rojo a la carne, son unos ejemplos ⁽⁹²⁾. El color es la primera sensación que se percibe de un alimento, y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. Es posible, por ejemplo, confundir a un papel de catadores coloreando productos como los helados con un color que no corresponda con el del aroma utilizado.

Para que un colorante funcione debe tener en su estructura química determinados grupos funcionales responsables de la absorción de la luz denominados: Cromóforos y Auxocromos.

2.5.1 Cromóforos

Un cromóforo es la parte o conjunto de átomos de una molécula responsable de su color. Cuando una molécula absorbe ciertas longitudes de onda de luz visible y transmite o refleja otras, la molécula tiene un color. Un cromóforo es una región molecular donde la diferencia de energía entre dos orbitales atómicos cae dentro del rango del espectro visible. La luz visible que incide en el cromóforo puede también ser absorbida excitando un electrón a partir de su estado de reposo. El color que ven nuestros ojos es el que no se absorbe dentro de un determinado espectro de longitud de onda de la luz visible.

Tabla 4. Grupos y Ejemplos de Cromóforo.

NOMBRE	ESTRUCTURA	EJEMPLOS
GRUPO NITROSO	-NO	C ₄ H ₉ NO
GRUPO NITRO	-NO ₂	CH ₃ NO ₂
GRUPO AZOICO	-N=N-	C ₃ H ₃ N=NCH ₃
GRUPO ETILENICO	=C=C=	C ₆ H ₁₃ CH=CH ₂
GRUPO CARBONILO	=C=O	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ {}_3\text{HCC}_3\text{HC} \end{array}$
GRUPO CARB-NIT	=C=NH	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ {}_2\text{HNC}_3\text{HC} \end{array}$

FUENTE: (<http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>, s.f.) ⁽³⁹⁾.

2.5.2 Auxocromos

Un auxocromo es un grupo funcional cargado positivamente que no absorbe por sí solo en la región del ultravioleta pero que tiene los efectos de desplazar picos de los cromóforos hacia longitudes de onda larga además de aumentar sus intensidades. Los grupos funcionales más comunes son: $-NH_2$, $-OH$, $-NR_2$, $-COOH$ y $-SO_3H$.

2.5.3 Clasificación de los colorantes

2.5.3.1 Colorantes Naturales

El término colorante natural hace referencia a colorantes derivados o extraídos de plantas, invertebrados o minerales. La mayor parte de los colorantes naturales son colorantes vegetales provenientes de plantas, y otras fuentes orgánicas como, por ejemplo, los hongos y líquenes.

Entre los colorantes naturales se distinguen los hidrosolubles, solubles en agua, los liposolubles o solubles en la grasa, y los minerales (Tabla 5).

Tabla 5. Colorantes naturales.

COLORANTES NATURALES HIDROSOLUBLES	
Curcumina (E100)	Riboflavina, lactoflavina o B2 (E101)
Cochinilla o ácido carmínico (E120)	Caramelo (E150)
Betanina o rojo remolacha (E162)	Antocianinas (E163)
COLORANTES NATURALES LIPOSOLUBLES	
Clorofilas (E140 y 141)	Carotenoides (E160)
Xantofilas (E161)	
MINERALES	
Carbón vegetal (E153)	Carbonato cálcico (E170)
Dióxido de titanio (E171)	Oxido e hidróxido de hierro (E172)
Aluminio (E173)	Plata (E174)
Oro (E175)	

FUENTE: (Badui, 1993) ⁽⁵⁾; (Ramírez, 2007) ⁽⁹⁸⁾.

Los colorantes naturales son más sutiles, menos brillantes y menos estables que los colorantes artificiales (99). Hacer una distinción neta entre los colorantes naturales y artificiales es difícil, porque al final lo natural debe ser tratado químicamente para que sea estable, identificable, uniforme en el tono. La idea de natural se aplica a la consideración general de ser inocuo para la salud y permitido sin restricciones (101).

2.5.3.1.1 Clasificación de colorantes naturales de acuerdo a sus características químicas

Tabla 6. Clasificación de colorantes por sus características químicas.

CLASIFICACIÓN DE COLORANTES DE ACUERDO A SUS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	
COLORANTES FLAVONOIDES	
Flavonol	Amarillo
Flavonona	Crema amarilla
Calcona	Rojo y amarillo
Antocianina	Rojo y violeta
COLORANTES CAROTENOIDES	
Caroteno	Anaranjado
Xantofila	amarillo
COLORANTES TIPO QUINONA	
Antroquinona	
Naftoquinona	Rojo-azul-verde
COLORANTES DERIVADOS	
Indol	Azul proveniente del añil
Delfinidina	Azul proveniente de la hierba de pollo
Dihidropilano	Rojo proveniente del palo del Brasil
Betaleina	Rojo proveniente del betabel
Xantonas	Amarillo proveniente de algunos líquenes
Tanino-Pirogallo y catecol	Café proveniente del castaño

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

Clorofila	Verde proveniente de las plantas verdes
-----------	---

FUENTE: (Yoshico, 1996) ⁽¹¹²⁾.

2.5.3.1.2 Clasificación de colorantes naturales según sus propiedades físicas

Tabla 7. Clasificación de colorantes según su origen.

COLORANTES NATURALES		
Según sus propiedades físicas	Directos	-Son los grupos de colorantes de antocianina, carotenoide. -En ocasiones se utilizan sustancias auxiliares como ácidos o sales, son utilizados para teñir o pintar directamente. Como ejemplo tenemos el azafrán.
	Mordentados	-Esta técnica se aplica a las plantas que sirven para teñir como la gardenia, cochinilla, palo de Campeche a través de una reacción de sales metálicas que reaccionan por medio de la fibra.
	Tipo de reducción	-Materias colorantes que se encuentran en el interior de los cuerpos vegetales o animales, pero de forma insoluble, para darles solubilidad, se aplica una sustancia reductora, obteniéndose una solución incolora que se aplica a la fibra y después, mediante una oxidación aparece el color.
	Pigmentos	-Polvos de materiales minerales que no tienen el poder de entintar, por lo cual solo puede utilizarse mezclándose con otro cuerpo, como el engrudo, cola resina, clara de huevo, con los que se forma una pasta para pintar.

FUENTE: (Yoshico, 1996) ⁽¹¹²⁾.

2.5.3.2 Colorantes Artificiales

El origen de estos colorantes es de síntesis química, su composición es menos compleja que la de los colorantes naturales, son hidrosolubles, se presentan generalmente en forma de polvo y tienen normas específicas de pureza. Como ya se ha indicado, el coloreado artificial de los alimentos es una práctica que data de la antigüedad, pero alcanzó su apogeo con el desarrollo en el siglo XIX de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis; ya en 1860 se coloreaba el vino en Francia con fucsina; más adelante se colorearon los macarrones y la mantequilla con dinitrocresol, etc. En los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos, y la presión del público, ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes artificiales por otros naturales. Dentro de los efectos nocivos a la salud tenemos: alergias tipo asma, posible efecto cancerígeno, enfermedad de la tiroides, lesiones en el hígado, hiperacidez, rinitis, urticaria, etc. (79). Estos colorantes son obtenidos mediante un proceso de síntesis química, son mucho más fáciles de utilizar, más resistentes a los tratamientos térmicos, pH extremos, luz, etc. Entre los colorantes artificiales o sintéticos se distinguen los colorantes azoicos y no azoicos (Tabla 8).

Tabla 8. Colorantes artificiales.

COLORANTES SINTÉTICOS AZOICOS	
Tartrazina (E102)	Rojo allura AC (E129)
Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E110)	Negro brillante BN (E151)
Azorrubina, carmoisina (E122)	Marrón FK (E154)
Amaranto (E123)	Marrón HT (E155)
Rojo cochinilla A o rojo Ponceau 4R (E124)	Litol Rubina BK (E180)
Rojo 2G (E128)	
COLORANTES SINTÉTICOS NO AZOICOS	
Amarillo de quinoleína (E104)	Indigotina o carmín de índigo (E132)
Eritrosina (E127)	Azul brillante FCF (E133)

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

Azul patentado V (E131)	Verde ácido brillante BS (E142)
-------------------------	---------------------------------

FUENTE: (Badui, 1993) ⁽⁵⁾; (Ramírez, 2007) ⁽⁹⁸⁾.

En España la cantidad total de colorantes artificiales está limitada, en general entre 100 y 300 mg/Kg en cualquier producto alimentario sólido y 70 mg/L en bebidas refrescantes. La tendencia actual es a limitar, más aún tanto los productos utilizables como las cantidades que pueden añadirse ⁽⁴⁵⁾.

2.5.4 Factores que afectan la Estabilidad de los Colorantes

- Trazas de Metales.
- Altas Temperaturas.
- Agentes oxido-reductores.
- Luz.
- pH.
- Microorganismos.
- Precipitaciones (turbidez).

Todos los colorantes para ser utilizados en la Industria de Alimentos, deben satisfacer las pruebas de toxicidad que requieren las autoridades de salud, para demostrar su inocuidad ⁽⁴⁶⁾.

Así tenemos que dentro de los requisitos exigidos para su utilización están:

- Ser inocuo.
- Constituir una especie química definida y pura.
- Tener gran poder tintóreo, con objeto de utilizar la mínima cantidad posible y ser fácilmente incorporables al producto.
- Ser lo más estable posible a la luz y al calor.
- Poseer compatibilidad con los productos que deben teñir.

- No poseer olor ni sabor desagradable.
- Ser indiferente al pH, agentes oxidantes y reductores.
- Ser lo más económico posible ⁽⁴⁶⁾.

2.6 EXTRACCIÓN

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales. Puede definirse como una operación de separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. Los métodos de extracción pueden ser de 2 tipos:

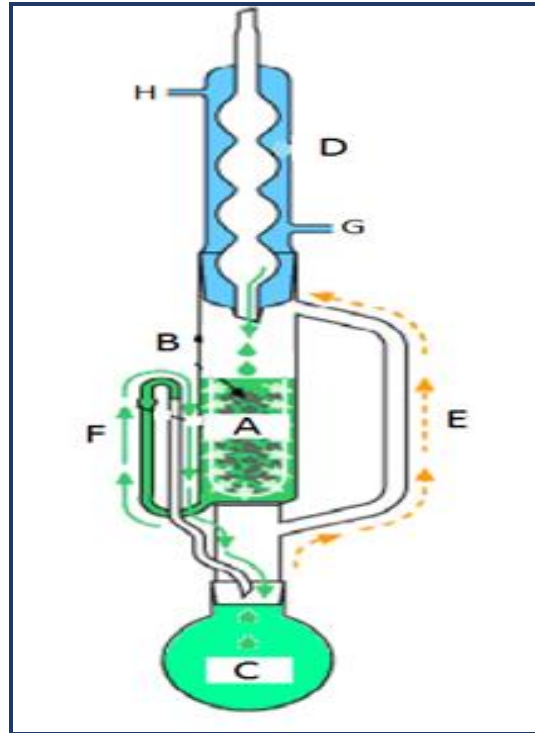
- Extracción líquido-líquido.
- Extracción sólido-líquido.

Sin embargo, nuestro estudio se centrará en la extracción sólido- líquido por el método Soxhlet. El empleo de este método garantiza que durante la extracción no existe la posibilidad de degradar las moléculas del colorante por efecto de la temperatura, debido a que se emplean bajas temperaturas durante la operación, además de permitir el uso de distintos disolventes, según convenga ⁽²⁶⁾.

2.6.1 Descripción del equipo de extracción

EQUIPO SOXHLET:

El equipo Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenido en los cartuchos desechables. La capacidad aproximada en un equipo de laboratorio es de 500 ml de volumen primario con una recirculación de 100 ml cada cinco minutos aproximadamente en estado estable. La velocidad de reflujo depende directamente de la eficiencia y el tamaño del condensador.



FUENTE: (Nuñez, 2008) (90).

Figura 11. Equipo Soxhlet.

La sustancia sólida se introduce en un cartucho poroso (generalmente hecho con papel de filtro, que permite al solvente entrar y salir reteniendo al sólido) que se coloca dentro del recipiente (B). En un balón (C) se coloca el volumen de solvente que se utilizará en la extracción, este balón debe estar en contacto con una manta calefactora. Por el extremo superior del recipiente (B), se coloca un condensador (D).

El solvente se calienta, los vapores ascienden por el tubo (E), condensan en el refrigerante (D) y caen dentro del recipiente (B) impregnando al sólido que se encuentra en el cartucho (A). EL recipiente (B) se va llenando lentamente de líquido hasta que llega al tope del tubo (F) y comienza a devolverse el solvente con el colorante al balón (C), este procedimiento se debe ejecutar hasta alcanzar que la muestra tenga el mínimo contenido de colorante, así se logra que lo extraído comience a concentrarse en el balón de solvente (90), como se muestra en la Figura 11. El solvente de extracción se evapora,

recuperando así a la sustancia deseada. El refrigerante cuenta con una entrada de agua de refrigeración (G) y una salida de agua de refrigeración (H).

2.6.2 Características para la extracción con el equipo SOXHLET

Para la extracción con el equipo Soxhlet se deben tener en cuenta: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación ⁽⁴⁷⁾.

2.6.2.1 Selección del solvente

La selección del solvente se realiza en cada caso teniendo en cuenta la solubilidad en el mismo de la sustancia a extraer y la facilidad con que se puede separar esta del solvente. Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. El solvente más ampliamente utilizado para extraer extractos vegetales de las plantas es el etanol.

2.6.2.1.1 Características del solvente etanol

El compuesto químico etanol, conocido como alcohol etílico, es un alcohol que se presenta en condiciones normales de presión y temperatura como un líquido incoloro e inflamable con un punto de ebullición de 78°C y punto de fusión de -114,1 °C, a nivel del mar. Es altamente inflamable, soluble en agua en cualquier proporción, reacciona violentamente con oxidantes fuertes y lentamente con hipoclorito cálcico, óxido de plata y amoníaco ⁽³⁷⁾.

En este trabajo se seleccionó como disolvente el etanol porque en investigaciones previas del mismo proyecto se encontró que en ensayos de antagonismo de varios extractos vegetales se optó por el uso de etanol en lugar de metanol por sus propiedades parecidas, por su disponibilidad y menor toxicidad que el primero ⁽⁴⁷⁾.

2.6.2.2 Características de la matriz

La extracción con Soxhlet depende fuertemente de las características de la matriz y de las dimensiones de las partículas puesto que la difusión interna puede ser el paso limitante durante la extracción. Partiendo de esto se puede decir que se necesitará un menor tiempo de extracción con una buena eficiencia si el tamaño de partícula es menor mientras que si las dimensiones de las partículas son mayores la extracción se realizará en un mayor tiempo.

2.6.2.3 Condiciones de operación

Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos. Las altas temperatura de ebullición para la recuperación del solvente pueden disminuirse usando evaporación flash o separación por membrana para recuperar el solvente; sin embargo en nuestro caso se emplea el método de evaporación en el mismo equipo Soxhlet, tomando en cuenta que primero se debe eliminar y/o sacar del equipo extractor el cartucho de muestra, de esta forma se producirá la evaporación del solvente el cual se condensará posteriormente en el extractor, a la vez que también se producirá la concentración del extracto en el balón esto se realizará hasta que la consistencia del mismo sea espesa.

2.6.3 Ventajas y desventajas de la extracción SOXHLET

Ventajas:

- Gran capacidad de recuperación e instrumentación simple.
- No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo disolvente orgánico se evapora quedando sólo analito.
- El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.
- El disolvente proviene de una condensación luego es líquido y está caliente. Favorece la solubilidad del analito.

- El Soxhlet ofrece argumentos convincentes para un trabajo económico, versátil, preciso y seguro en el laboratorio moderno.
- Recuperación de disolventes.
- Control del agua de refrigeración ⁽³⁸⁾.

Desventajas:

- Es un proceso lento e imposible de acelerar.
- Se requiere gran cantidad de disolvente.
- Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- Necesidad de etapa final de evaporación ⁽³⁸⁾.

2.6.4 Extracción sólido – líquido

La extracción sólido – líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de una fase líquida o disolvente.

Para llevar a cabo el proceso es necesario:

- 1) Contacto del disolvente con el sólido a tratar, para disolver el componente soluble, o soluto.
- 2) Separación de la disolución y el resto del sólido (con la disolución adherida al mismo).

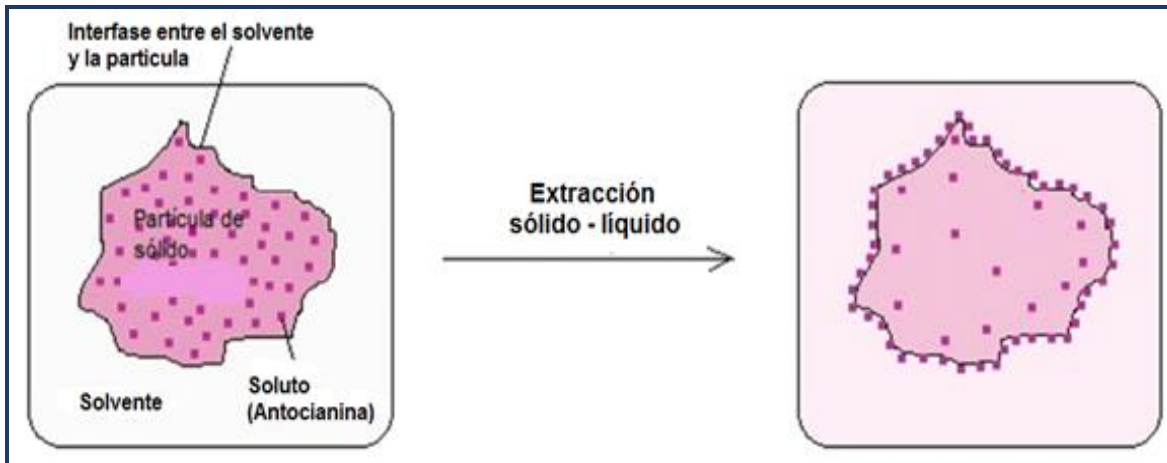
La disolución separada se denomina flujo superior o extracto; recibiendo el nombre de refinado, flujo inferior o lodos el sólido inerte acompañado de la disolución retenida por el mismo ⁽⁶⁴⁾. La forma en que el soluto está contenido en el sólido inerte puede ser diversa. Se puede dar el caso de un sólido disperso en el material insoluble o que esté recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que esté adherido o retenido en el sólido, o bien que esté contenido en su estructura molecular ⁽⁶⁰⁾. La

extracción sólido-líquido se lleva a cabo en una sola o en múltiples etapas. Una etapa es una unidad de equipo en la que se ponen en contacto íntimo las fases durante un tiempo determinado, de forma que se realiza la transferencia de materia entre los componentes de las fases. Esta transferencia tiene lugar hasta alcanzarse el equilibrio. En este contexto, el equilibrio se puede definir como aquella situación lograda cuando la disolución adherida al residuo tiene la misma composición que la del flujo líquido ⁽⁸⁾. Una vez alcanzado dicho equilibrio, se procede a la separación de las fases, obteniéndose una mezcla de disolvente y soluto llamada “extracto” y una mezcla de la que se ha extraído el soluto, denominada “refinado”, que estará formada por la fase sólida inerte con una parte de la disolución retenida.

Sin embargo, en un proceso real es difícil alcanzar el equilibrio teórico ya que se necesitaría un tiempo de proceso muy largo. Es por esto, que para el cálculo de las etapas reales es preciso considerar una eficacia. Ésta se define para una etapa como el cociente entre el cambio en la composición que se logra realmente y el que debería haber tenido lugar en una situación de equilibrio teórico bajo las mismas condiciones de trabajo ⁽⁶⁰⁾. En cuanto al mecanismo de la extracción de un soluto contenido en una partícula sólida mediante un líquido, se puede considerar que ocurre en tres periodos sucesivos hasta alcanzar el equilibrio ⁽⁶¹⁾. Estos periodos son los siguientes:

1. Transferencia de solvente desde el seno de la solución extractiva hacia el sólido. En la extracción sólido-líquido, inicialmente el disolvente penetra y difunde en la matriz sólida llenando sus poros.

2. Difusión del soluto en el disolvente contenido en los poros del sólido. Dado que generalmente el soluto se encuentra en el interior de las partículas sólidas es necesario que el soluto entre en contacto con el disolvente, que se disuelva y que la mezcla soluto-disolvente difunda hasta la superficie de la partícula (Figura 12).



FUENTE: (Ibarz Ribas A, 2000) ⁽⁶¹⁾.

Figura 12. Difusión del soluto en el disolvente.

La transferencia del soluto desde el interior de la partícula sólida hasta su superficie se realiza debido al gradiente de concentración que existe entre la interfase disolvente - partícula. En el interior del poro, se considera que el disolvente permanece prácticamente estacionario, por lo que la transferencia de soluto desde las zonas de mayor concentración hacia el exterior se realiza únicamente por difusión molecular.

3. Transferencia del soluto desde la superficie de las partículas hasta el seno de la disolución.

Una vez que el soluto ha alcanzado la superficie de la partícula, se transfiere desde este punto hasta el seno de la disolución gracias al gradiente de concentración. Esta transferencia de materia se realiza por transporte molecular y turbulento de forma simultánea. Se mencionó anteriormente que, desde el punto de vista teórico, la transferencia de materia tiene lugar hasta que se llega al equilibrio, el cual se alcanza cuando el soluto se disuelve totalmente en el disolvente y se obtiene una disolución de concentración uniforme. En el caso de que el contenido de soluto en el sólido sea suficientemente elevado, se considera que se ha llegado al equilibrio cuando la disolución que se halla en contacto con el sólido esté saturada. Para aumentar la velocidad global de transferencia de materia suele actuarse sobre distintos factores como

la reducción del tamaño de partícula, el aumento de la temperatura de extracción, la agitación del fluido, la proporción de sólido-líquido y el tipo de disolvente utilizado. En este punto cabe destacar que resulta muy importante la elección de un disolvente que sea selectivo con el soluto que se desea extraer y que presente una viscosidad lo suficientemente baja para que pueda penetrar y moverse con facilidad por el interior de sólido ⁽⁶¹⁾.

De lo expuesto se puede señalar que son muchos los factores que influyen en la extracción sólido-líquido. Por ello, en el momento de plantear un estudio sobre la extracción de un determinado soluto presente en una matriz se deben definir aquellas variables que se consideren más influyentes en este proceso. Además, esto también va a depender de la estructura química del soluto a extraer y de los factores que pueden influir en su estructura.

La velocidad de extracción depende de los siguientes factores influyentes:

- **Tamaño de las partículas solidas**

Evidentemente cuando más pequeñas sean, mayor es la superficie interfacial y más corta la longitud de los poros. Por tanto, mayor es la velocidad de transferencia. Sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción.

- **Tipo de disolvente**

El disolvente debe ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad.

- **Temperatura**

Un aumento de temperatura favorece la solubilidad y aumentan los coeficientes de transferencia de materia. El límite superior se fija atendiendo a criterios de calidad del producto, criterios económicos y seguridad con respecto al disolvente.

- Agitación del disolvente – soluto

Favorece la transferencia por aumento de coeficientes de transferencia de materia en la interfase sólido-líquido. Además, se evita la sedimentación y apelmazamiento de las partículas sólidas.

2.6.4.1 Método de cálculo

Los problemas de extracción sólido-líquido pueden resolverse por aplicación de balances de materia y energía justamente con el concepto de etapa teórica. Normalmente se omiten las ecuaciones de balance de energía, dada la poca importancia de los cambios energéticos en los procesos industriales de extracción; por consiguiente, los cálculos se basan en la aplicación reiterada de balances de materia y en el concepto de etapa teórica, y puede acudirse tanto a procedimientos algebraicos como gráficos. Cuando el número de etapas es pequeño, como suele ocurrir en este tipo de extracción, los métodos gráficos permiten una gran simplificación de los cálculos y una visión más general del problema en el transcurso del proceso ⁽⁶⁴⁾.

Los diagramas más importantes empleados en esta operación son:

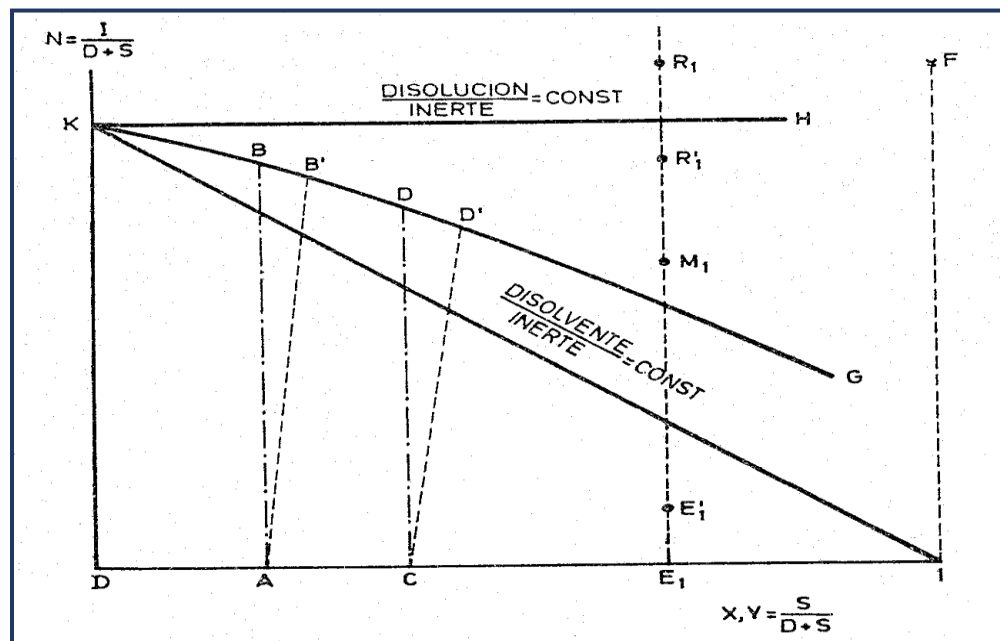
- Triángulo rectángulo.
- Diagrama rectangular.

Sin embargo, en nuestro estudio se empleará el diagrama rectangular.

2.6.4.1.1 Diagrama rectangular

Debido a que en el diagrama triangular los datos suelen agruparse hacia un extremo, resultando incómodas las lecturas, es preferible emplear un diagrama rectangular en el que se representa en ordenadas kilogramos de inerte/kilogramos de disolución, $I/(D+S)$, y en abscisas kilogramo de soluto/kilogramo de disolución, $S/(D+S)$. En este diagrama,

para la sustancia a tratar exenta de disolvente, la ordenada será I/S y la abscisa valdrá la unidad. El disolvente puro tendrá valor cero de abscisa y ordenada (64). Considerando el sólido inerte (del que se ha extraído todo el soluto) en contacto con la disolución (soluto y disolvente), el punto representativo del sistema en este diagrama será M_1 . Si se deja sedimentar el sistema, la disolución que se puede separar vendrá representada por un punto E_1 y los sedimentos o lodos que contienen al sólido inerte y la disolución retenida vendrá representada por un punto R_1 ; la recta E_1R_1 será una recta de reparto que une los puntos representativos de la disolución del flujo superior y de los lodos o flujo inferior. Si el sistema no ha sedimentado tiempo suficiente para que pueda separarse una disolución clara o si el sólido inerte se disuelve parcialmente, las disoluciones correspondientes a los flujos superiores estarán representadas por puntos tales como el E_1' , y los lodos o flujo inferior por puntos tales como el R_1' .



FUENTE: (Joaquín Ocón García, 1970) (64).

Figura 13. Diagrama Rectangular.

La disolución retenida por unidad de sólido inerte vendrá representada por la curva KG que ha de denominarse experimentalmente. Si la disolución retenida por unidad de sólido

inerte es constante e independiente de la concentración, el lugar geométrico de las mezclas solido inerte y disolución retenida será una recta paralela al eje de abscisas (KH). Si lo que permanece constante es la relación disolvente/solido inerte, el lugar geométrico de las mezclas solido inerte-disolución retenida vendrá dado por la recta KS, que pasa por el punto cuya abscisa representa la composición de la disolución retenida por el sólido inerte ⁽⁶⁴⁾.

2.6.4.2 Curva de retención

Para la resolución de los diferentes problemas que se presentan en este tipo de operación, es imprescindible conocer la cantidad de líquido retenido por el sólido y su variación con la composición de la disolución, para lo que debe llevarse a cabo cierta experimentación que facilite este conocimiento. Se define la **retención de disolución** como la cantidad de disolución que queda retenida por unidad de masa de solido inerte:

$$K = \frac{\text{Masa disolución retenida}}{\text{Masa de inertes}}$$

Ecuación 3

La ecuación 1 expresa la relación entre la cantidad de disolución retenida y la cantidad de inerte. Esta relación no es un factor de equilibrio, puesto que solo depende de la naturaleza del sólido y del disolvente, sino de otros varios factores, por lo que habrá de ser determinada experimentalmente en unas condiciones lo más parecidas posibles a las que vayan a existir en el dispositivo experimental. La determinación experimental de los puntos de la curva de retención puede llevarse a cabo añadiendo a una cantidad determinada de carga (inerte + soluto) cantidades variables de disolvente, o lo que es lo mismo, añadiendo a una cantidad determinada de inertes cantidades determinadas de disolución (soluto + disolvente) de composiciones variables. Conociendo estas y la retención producida en cada caso, podrán determinarse las correspondientes coordenadas sobre el diagrama rectangular y, por tanto, trazar la curva de retención.

Las coordenadas para trazar la curva de retención se las calcula mediante las siguientes ecuaciones:

$$x, y = \frac{S}{D + S} = \frac{\text{Kg soluto}}{\text{Kg disolución}}$$

Ecuación 4

$$N = \frac{I}{D + S} = \frac{\text{Kg inerte}}{(\text{Kg soluto} + \text{Kg alcohol etílico})}$$

Ecuación 5

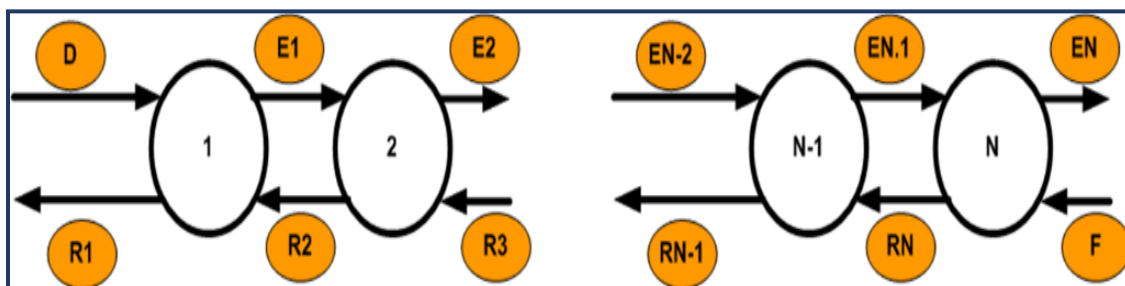
2.6.4.3 Tipos de contacto

- Contacto sencillo.
- Extracción múltiple en corriente directa.
- Extracción múltiple en contracorriente.

Para nuestro estudio se empleará la extracción múltiple en contracorriente.

2.6.4.3.1 Extracción múltiple en contracorriente

El flujo inferior o refinado se va empobreciendo en soluto desde la última hasta la primera etapa, mientras que el flujo superior o extracto se va concentrando en soluto desde la primera hasta la última etapa (64).



FUENTE: (Joaquín Ocón García, 1970) (64).

Figura 14. Extracción múltiple en contracorriente.

2.7 YOGURT

El yogurt es un derivado lácteo, de consistencia semisólida, coagulado mediante la fermentación de la leche por bacterias ácido lácticas, las bacterias más comunes que son responsables de estos efectos son: *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*.

Para llevar a cabo el proceso de fermentación la acción de estas bacterias desencadena un proceso microbiano, la lactosa se transforma en ácido láctico durante el proceso de fermentación tienden a crear coágulo con propiedades adecuadas de pH, sabor, aroma (53).

2.7.1 Valor nutricional del yogurt

El yogurt es un producto que proporciona un elevado contenido de nutrientes, aportando vitaminas, hidratos de carbono, proteínas y minerales, especialmente calcio y fósforo. El yogurt contiene una verdadera fuente de vitaminas, entre las que se encuentran son las vitaminas del grupo B especialmente tiamina y riboflavina y en menor proporción la vitamina A; los hidratos de carbono en el yogurt hacen que sea una fuente amplia de energía en la dieta diaria de los consumidores, que cubre el 82 % del valor calórico aportado por las proteínas, debido a un alto contenido de aminoácidos esenciales, es considerado un alimento nutricional para el consumo de niños y adultos (53).

2.7.2 Calidad de Yogurt

El Instituto Boliviano de Normas y Calidad (IBNORCA) es la organización responsable del estudio y elaboración de la Normas Bolivianas de Calidad. Su utilización es un compromiso de conciencia y de responsabilidad del sector productivo y de exigencia del sector consumidor. IBNORCA (2006) en su norma NB-33016, señala que, el yogurt de calidad intachable, es un producto de un valor elevado por el cual los componentes

principales de requerimiento del producto son los siguientes: Requisitos organolépticos, Requisitos físico-químico y Características microbiológicas ⁽⁸⁸⁾.

2.7.2.1 Requisitos Organolépticos

- Sabor

El producto tendrá un sabor agradable con una acidez característica del mismo y libre de sabores extraños, (IBNORCA ,2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

El sabor natural es difícil de definir, normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. A veces se presenta con cierto sabor salado por la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre (mastitis). Pero en general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico ⁽⁵¹⁾.

- Olor

Agradable y en relación con el producto. Libre de olores ajenos, (IBNORCA ,2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

El olor comercial es difícil de percibir salvo que sea un olor ajeno a ella. Entre esos olores ajenos están los que provienen de algunos alimentos, medio ambiente, utensilios y de los microorganismos ⁽⁵⁹⁾. El olor de la leche es también característico y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo. La leche puede adquirir, con cierta facilidad sabores u olores extraños, derivados de ciertos alimentos consumidos por la vaca antes del ordeño, de sustancia de olor penetrante o superficies metálicas con las cuales ha estado en contacto o bien de cambios químicos o microbiológicos que el producto puede experimentar durante su manipulación ⁽⁵¹⁾.

- Color

Estará en relación con el producto. Blanco o ligeramente crema para el yogurt natural. Para los yogures frutados o saborizados, su color estará en lo posible, en relación con el sabor o fruta utilizada, (IBNORCA ,2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

La leche es un líquido blanquecino amarillento y opaco, color característico que se debe principalmente a la dispersión de la luz por las miscelas de fosfocaseinato de calcio. Los glóbulos grasos también dispersan la luz, pero contribuyen muy poco en el color blanco de la leche. Por último, el caroteno y la riboflamina contribuyen al color amarillento ⁽⁵⁹⁾.

- Aspecto

Todas las variedades de yogurt deberán tener un aspecto uniforme, libre de burbujas y materiales ajenos, de consistencia característica al tipo de yogurt, (IBNORCA ,2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

La viscosidad de la leche está dada por el grado de resistencia a fluir, o sea que es el coeficiente de frotamiento entre las moléculas. La viscosidad aumenta con la disminución de la temperatura, el incremento del contenido graso, la homogenización, fermentación, envejecimiento y altas temperaturas seguidas de enfriamiento ⁽⁵⁹⁾.

2.7.2.2 Requisitos Físico-Químicos

En la siguiente tabla, IBNORCA menciona las características físico-químicos que deberá tener los diferentes tipos de yogurt:

Tabla 9. Requisitos Físico-Químicos para el yogurt, (IBNORCA ,2006 NB-33016).

PARÁMETROS	YOGURT		YOGURT LIGERO		YOGURT DIETÉTICO		MÉTODO DE ENSAYO
	Min	Max	Min	Max	Min	Max	
pH	-	4,6	-	4,6	-	4,6	
Acidez titulable (ácido lácteo) % m/m	0,5	1,5	0,5	1,5	0,5	1,5	NB 229
Materia grasa	2,6	-	0,5	2,6	-	0,5	NB 330178**

Sólidos no grasos*	8,2	-	-	-	-	8,2	
--------------------	-----	---	---	---	---	-----	--

FUENTE: (NORMA BOLIVIANA NB 32005, 2002) ⁽⁸⁸⁾.

* El valor máximo admisible de sólidos no grasos dependerá de la composición de la leche utilizada.

** Proceso de elaboración.

2.7.2.2.1 Parámetros de Control de calidad para la Elaboración del Yogurt

Los parámetros establecidos para el control de calidad en la elaboración del yogurt son: pH, Acidez Titulable, Sólidos disueltos (°Brix), Coliformes totales UFC/ml, Escherichia coli UFC/ml, Mohos y levaduras UFC/ml, (IBNORCA, 2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

- pH

El pH o potencial de hidrógeno es un parámetro que indica la concentración de iones de hidrogeno $[H]^+$ que existen en una solución. Dicho de otro modo, es una unidad de medida que nos indica el grado de acidez de una solución ⁽⁵⁸⁾. Los valores del pH varían en una escala que va de 0 hasta 14. Así, tenemos un pH neutro cuando su valor es 7, los valores de pH menores a 7 son valores ácidos y los valores de pH básicos, o alcalinos, son los que están por encima de 7 ⁽⁵⁹⁾.

Monitorizar el pH es crucial para producir un yogurt con una consistencia y calidad adecuadas. Al producirse ácido láctico mediante la fermentación de la lactosa se da una correlativa caída del pH.

La cantidad de ácido láctico presente en este nivel de pH es la ideal para el yogur, dándole la acidez característica, favoreciendo el espesor, y actuando como un conservante contra cepas bacterianas indeseables. Una desviación del pH predeterminado puede reducir la vida útil del yogur o crear un producto que es demasiado amargo o agrio. Los consumidores esperan que la textura del yogur permanezca constante, por lo que la detención de la fermentación en el pH adecuado es de vital importancia para la percepción del consumidor.

- Acidez Titulable

El aumento de la acidez del yogurt por la producción de ácido láctico ocasiona la coagulación de la caseína, además afecta la textura, sabor en el producto y otros componentes que aumentan la acidez titulable. El porcentaje de ácido láctico adecuado es extremadamente importante para obtener un yogurt de alta calidad con sabor propio, cuerpo y textura propia, esto es para que el producto tenga el mínimo porcentaje de sinéresis durante el almacenamiento ⁽⁵⁷⁾.

La acidez titulable en el yogurt se obtiene mediante la absorción de los iones hidroxilo por la cantidad de ácido que se ha generado por el desarrollo de microorganismos (la acidez aumenta con la acidificación bacteriana). La acidez titulable es la cantidad total de ácido láctico en una solución determinada, realizando una titulación y usando una solución estándar de hidróxido de sodio, tenemos como resultado ácido láctico expresado en porcentaje (IBNORCA, 1998 NB-229) ⁽⁸⁷⁾. La reacción que sufre el ácido láctico es la siguiente:



Por lo tanto, la acidez titulable se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Acido lactico} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N * 100 * F}{V_m}$$

Ecuación 6

Donde:

V_{NaOH} = Volumen gastado de NaOH para valorar la muestra (ml)

N = Normalidad del NaOH

V_m = Volumen de la muestra

F = Factor de ácido láctico 0,090

- Grados Brix (°Brix)

Sirven para determinar el cociente total de azúcar (sacarosa) disuelta en un líquido, es decir nos sirve para ver qué tan concentrado está el yogurt, por ejemplo una solución de 25 °Brix contiene 25 g de azúcar (sacarosa) por 100 g de líquido. Dicho de otro modo, en 100 g de solución hay 25 g de sacarosa y 75 g de agua ⁽⁵²⁾.

Para medir °Brix utilizamos un refractómetro el cual se basan en el principio de que cuando aumenta la densidad de una sustancia, el índice de refracción aumenta proporcionalmente. Los refractómetros son instrumentos de medición que utilizan el fenómeno de la refracción de la luz ⁽⁴³⁾.

2.7.2.3 Características Microbiológicas

El producto debe estar libre de microorganismos patógenos y debe cumplir con lo especificado en la siguiente tabla:

Tabla 10. Características microbiológicas del yogurt, (IBNORCA, 2006 NB-33016).

MICROORGANISMOS	n	c	m	M	MÉTODO DE ENSAYO
Coliformes totales UFC/ml	5	2	10	100	NB 32005 NB 32016
Escherichia coli UFC/ml	5	2	0	10	NB 32005 NB 32016
Mohos y levaduras UFC/ml	5	2	50	200	NB 32018 NB 32006

FUENTE: (NORMA BOLIVIANA NB 33016, 2006) ⁽⁸⁸⁾.

n: Número de unidades de muestras a ser examinadas.

m: Valor del parámetro microbiológico por el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.

c: Número más de unidades de muestra que puede contener un número de m.o. comprendidos entre "m" y "M".

M: Valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

Los microorganismos propios del yogurt presentes en el producto final deben estar en una cantidad mínima de 1×10^5 UFC/ml de bacterias viables.

- **Escherichia coli**

Se utiliza como microorganismo indicador de la contaminación de origen fecal. Su hábitat natural es el hombre y animales de sangre caliente y debido a esto se ha utilizado como indicador dentro del grupo coliformes, es el microorganismo de mayor significado sanitario (IBNORCA, 2002 NB-32005) ⁽⁸⁵⁾.

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo puede estar aislado o en parejas y tener flagelos, se desarrolla fácilmente sobre medios con nutrientes simples. Las colonias pueden ser lisas, poco convexas, húmedas, de superficie brillante, con el borde completo o seco y áspero. Casi todas las cepas fermentan la lactosa (IBNORCA, 2002 NB-32005) ⁽⁸⁵⁾. Tiene forma de bastoncillos, que miden $1.1 - 1.5 \times 2.0 - 6.0$ micrones (vivos) o $0.4 - 0.7 \times 1.0 - 3.0$ micrones (secos y teñidos); existen aislados o en parejas, y pueden tener flagelos, que les confiere motilidad; se desarrollan fácilmente sobre medios con nutrientes simples. Las colonias pueden ser lisas, poco convexas, húmedas, de superficie brillante, con el borde complejo o seco y áspero ⁽⁵⁶⁾.

- **Coliformes Totales**

Las bacterias coliformes son bacilos cortos Gram-negativos, aerobios o anaerobios facultativos no esporulados, que fermentan glucosa y lactosa con formación de ácido y gas (IBNORCA, 2002 NB-32005) ⁽⁸⁵⁾.

Los coliformes son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario inadecuado. La presencia de estos microorganismos en cantidades mayores al permitido indica:

- Mala manipulación y/o procesamiento del alimento.

- Riesgo indirecto, mayor probabilidad de existencia de bacterias entéricas patógenas como salmonella (IBNORCA, 2002 NB-32005) ⁽⁸⁵⁾.

Las bacterias coliformes pertenecen a la familia de las Enterobacteriácea esta familia es una de las más vastas y de las más difíciles de subdividir. Las especies más frecuentes en los productos lácteos son los que fermentan la lactosa. La mayor parte de las entero bacterias son huéspedes normales del intestino de los mamíferos; su presencia en el agua o en la leche puede atribuirse a una contaminación de origen fecal. Muchas de estas especies tienen fase de vida libre en el suelo y en agua. Se puede encontrar en productos vegetales ⁽⁵²⁾.

- Mohos y Levaduras

Los mohos desempeñan una importante función en los alimentos: algunos son beneficiosos, porque segregan sustancias que intensifican el aroma de los alimentos, mientras que otros son perjudiciales, por que favorecen ciertos tipos de putrefacciones de los alimentos. Algunos mohos pueden producir toxinas, que son peligrosas para la salud de la población ⁽⁵⁶⁾. Los mohos son protistas no fotosintéticos multicelulares, filamentosos. Se los puede identificar por su aspecto algodonoso aterciopelado de coloración variable. Los mohos están constituidos por unos filamentos ramificados entrecruzadas llamadas hifas cuyo conjunto se llama micelio. Las hifas son de dos clases unas sumergidas y otras aéreas, también se las clasifica en vegetativas y fértiles que son las que contienen el órgano de reproducción (IBNORCA, 2003 NB-32006) ⁽⁸⁶⁾.

Las levaduras son unicelulares, algunas tienen forma cilíndrica o alargada, y otras formas elipsoidales, y abundan mucho en la naturaleza. La célula de la levadura tiene de 2 a 6 micrones de anchura y de 10 a 30 micrones de longitud, y puede reproducirse asexualmente, por gemación, o sexualmente, mediante la producción de asco esporas ⁽⁵⁶⁾. En general los mohos y las levaduras utilizan diversos tipos de nutrientes y sustratos tan sencillos como complejos, poseen gran cantidad de enzimas hidrolíticas y algunos se cultivan para obtener amilasa pecinosa, proteinasas y lipasa (IBNORCA, 2003 NB-32006) ⁽⁸⁶⁾.

Por lo tanto, los colorantes naturales deben de cumplir con pruebas microbiológicas establecidas para su aplicación en la Industria Alimenticia. Estas pruebas garantizan que el producto será aceptable desde el punto de vista de la salud pública, es decir, que no serán responsables de la difusión de enfermedades infecciosas ni de intoxicaciones alimentarias, también garantizan que serán aceptables desde el punto de vista estético, en el sentido de que se ha evitado la contaminación con materia fecal, con parásitos, mohos, etc. (42)

2.8 ADITIVOS ALIMENTARIOS

2.8.1 Definición de Aditivo Alimentario

La reglamentación del CODEX ALIMENTARIUS contribuyen a la inocuidad, la calidad y la equidad en el comercio internacional de alimentos. Define a los aditivos como: “sustancias que no se consumen como alimento, ni tampoco se usa como un ingrediente básico en alimentos, puede o no tener valor nutritivo. Estas sustancias son añadidas intencionalmente en el alimento con fines organolépticos, tecnológicos, en las etapas de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento. Esta definición no contiene “contaminantes” o sustancias agregadas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutritivas”.

2.8.1.1 Efectos adversos en la salud

Hoy en día, los aditivos alimentarios cada vez se añaden a los alimentos para realzar su gusto, sabor, color, textura, debido al consumo generalizado, es importante tener presente la seguridad de los consumidores, ya que es una preocupación de los posibles efectos adversos que causan los aditivos alimentarios, de lo cual los mismos deben ser permitidos y evaluados estrictamente por organismos científicos. Es necesario aplicar dosis con base a la legislación y normas establecidas de cada país con respecto a los aditivos alimentarios.

2.8.2 Los colorantes ¿aditivos modernos?

Los aditivos constan en la letra pequeña de las etiquetas de los alimentos industriales y en conserva. Con estas sustancias, el fabricante pretende garantizar una calidad perdurable: sirven para la conservación, el aspecto atractivo, el aroma y el sabor de los alimentos. Sin embargo, no debe pensarse que la adición de estos compuestos es una práctica moderna, de hecho, la coloración de los alimentos ya se practicaba en tiempos de los romanos y de los egipcios.

2.8.3 Legislación actual

Actualmente los colorantes son el grupo de aditivos en el que mayores diferencias se encuentran en las legislaciones entre distintos países. En algunos, como los países nórdicos, prácticamente no pueden utilizarse, mientras que en el Reino Unido se utilizan algunos que no están autorizados en casi ningún otro país de la Unión Europea. También existen diferencias notables entre los colorantes autorizados en Estados Unidos y en la Unión Europea, lo que dificulta ocasionalmente el comercio internacional de algunos alimentos elaborados.

Hay que recordar que para que se pueda utilizar un colorante alimentario (o cualquier aditivo) en la Unión Europea, primero debe figurar en la lista de los autorizados en general, y segundo, debe estar autorizado para ese producto concreto. De los colorantes permitidos hoy en día la mayor parte pertenecen al grupo de las vitaminas, las provitaminas y sustancias naturales como la clorofila, los carotenos y el rojo de remolacha.

2.8.3.1 Los números E

El principal requisito para autorizar un aditivo es que tenga un propósito útil demostrado y se haya sometido a una rigurosa valoración científica.

El significado de la letra E (de Europa) es la representación de un aditivo que ha sido aprobado por la Unión Europea, es decir, que el Comité Científico lo ha evaluado como seguro, con el fin de permitir la libre circulación de los alimentos de un país a otro. Una vez aprobado, se otorga la letra (E) que le permite identificarlos, conocer su función y su denominación química. Los números precedidos de la letra E que se encuentran en la mayoría de los productos industrializados corresponde a aditivos alimentarios, entre los que se incluyen colorantes, conservantes, antioxidantes, espesantes, etc.

Colorantes: (E-1XX) con el número uno delante, son los aditivos responsables de devolver el color original al alimento que ha podido perderse durante su procesado.

2.8.4 Dosis de colorantes permitidos en la industria láctea (yogurt)

Se permitirá el uso, solo de aromatizantes y colorantes naturales y/o artificiales, inocuos siempre y cuando cumpla con la Norma Boliviana correspondiente y/o CODEX Alimentarius. Queda prohibido el uso de anilinas (IBNORCA, 2006 NB-33016) ⁽⁸⁸⁾.

Podrá haber aditivos adicionales en el yogurt siempre y cuando se cumpla la Norma General para Aditivos Alimentarios (CODEX STAN 192-1995). Solamente podrán emplearse las clases de colorantes que se indican en la siguiente tabla y dentro de los límites especificados.

Tabla 11. Dosis (mg/kg) de tipos de colorantes permitidos en el yogurt

Nombre del aditivo	Nivel máximo
COLORANTES	
Curcumina	100 mg/kg
Riboflavin, sintéticas	} 300 mg/kg
Riboflavina 5', fosfato de sodio	
Tartracina	300 mg/kg
Amarillo de quinolina	150 mg/kg
Amarillo ocaso FCF	300 mg/kg
Carmines	150 mg/kg
Azorrubina (carmoisina)	150 mg/kg
Ponceau 4R (rojo de cochinilla A)	150 mg/kg
Rojo allura AC	300 mg/kg
Indigotina (carmine de indigo)	100 mg/kg
Azul brillante FCF	150 mg/kg
Clorofilas, complejos cúpricos	} 500 mg/kg
Clorofilinas, complejos cúpricos, sales de sodio y potasio	
Verde sólido FCF	100 mg/kg
Caramelo II – caramelo al sulfito	150 mg/kg
Caramelo III – caramelo al amoniaco	2 000 mg/kg
Caramelo IV – caramelo al sulfito amónico	2 000 mg/kg
Negro brillante (negro PN)	150 mg/kg
Marrón HT	150 mg/kg
Carotenos, <i>beta</i> -, sintéticos	} 100 mg/kg
Carotenal, <i>beta</i> -apo-8'-	
Éster etílico del ácido <i>beta</i> -apo-8'-carotenoico	
Carotenos, <i>beta</i> -, <i>Blakeslea trispora</i>	} 600 mg/kg
Carotenos, <i>beta</i> -, vegetales	
Extractos de annato – base de bixina	20 mg/kg como bixina
Extractos de annato – base de norbixina	20 mg/kg como norbixina
Licopenos	30 mg/kg como licopeno puro
Luteína de <i>Tagetes erecta</i>	150 mg/kg
Zeaxantina, sintética	150 mg/kg
Extracto de piel de uva	100 mg/kg
Óxido de hierro, negro	} 100 mg/kg
Óxido de hierro, rojo	
Óxido de hierro, amarillo	

FUENTE: (<ftp://ftp.mmm.com/pub/Mx/PYM.pdf>, s.f.) (27).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El trabajo se realizó en los laboratorios de la Carrera de Química Industrial de la Facultad de Tecnología.

Las muestras para el análisis se recolectaron manualmente en el municipio de Achocalla, tercera sección de la provincia murillo ubicada al sur de la ciudad de La Paz distante a 30 Km, topográficamente se divide en dos regiones: por un lado, la planicie altiplánica, al norte del municipio que colinda con la ciudad de El Alto, se caracteriza por un clima frío, con temperaturas medias anuales de 15°C, y, por otro lado la cuenca o cabecera del valle ubicada al sur, colindante con el municipio de Mecapaca, con clima templado y temperatura media anual de 19°C.

Figura 15. Mapa político de la 3ra sección de la provincia murillo (municipio de Achocalla).



FUENTE:

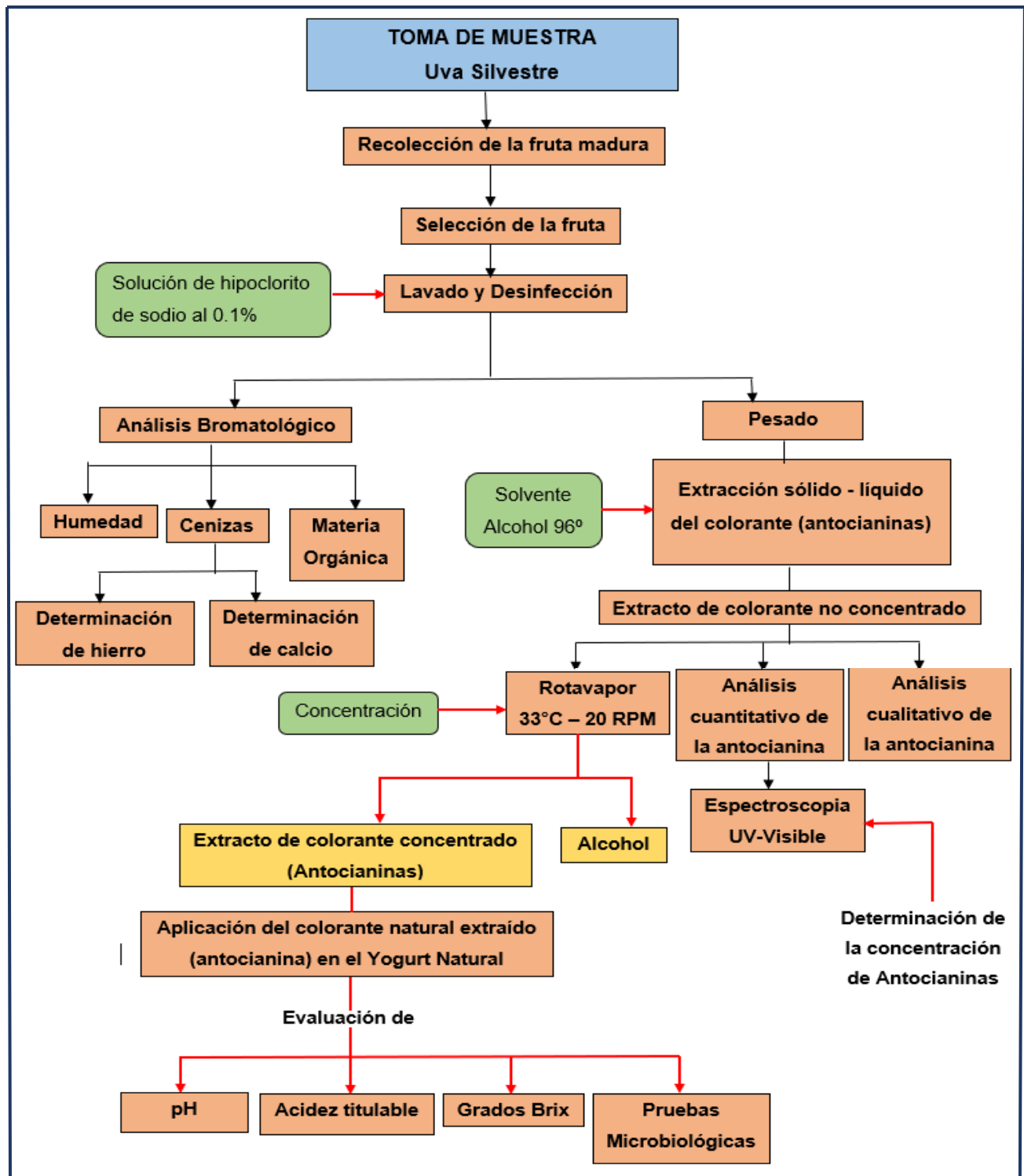
(https://www.google.com/search?tbm=isch&sa=1&ei=MctRXe7rlobl_QbcrJO4Bg&q=mapa+politico+de+achocalla&oq=mapa+politico+de+achocalla, s.f.) (54).

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

El proceso de recolección se realizó en cuatro oportunidades realizando contactos con pobladores además de visitas a ferias locales, donde existe producción de la materia prima en épocas de verano generalmente en los meses de marzo y abril. Cabe aclarar que se trata de una uva silvestre poco conocida y consumida en nuestra población.

3.2 METODOLOGÍA

La metodología para el estudio del colorante extraído de uva silvestre (*Cissus verticillata*), fue desarrollada en cuatro etapas: primero el análisis bromatológico de la uva silvestre, seguido de la obtención del extracto crudo enriquecido en antocianinas, tercero identificación y cuantificación del colorante tipo antocianina; y finalmente el estudio de la estabilidad del color en el yogurt.



FUENTE PROPIA.

Diagrama 1. Metodología de trabajo para la obtención del colorante natural (Antocianina).

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

3.2.1 Tipo de estudio

El presente estudio de investigación es descriptivo, analítico, cuantitativo y experimental.

3.3 FASES DE ESTUDIO

3.3.1 FASE I: Preparación de Materiales, Equipos y Reactivos para la extracción del colorante (Antocianina)

MATERIALES BÁSICOS	
✓ Balón con fondo redondo	✓ Probeta
✓ Extractor soxhlet	✓ Pipetas
✓ Condensador	✓ Pipeta pasteur
✓ Soporte universal	✓ Vasos precipitados
✓ Pinzas	✓ Erlenmeyer
✓ Nueces	✓ Embudo
✓ Refrigerante Liebig	✓ Mortero
✓ Columnas de fraccionamiento	✓ Cepillo
✓ Espátula	✓ Piseta
✓ Caja Petri	✓ Teflón
✓ Celdas de cuarzo de un centímetro	✓ Adaptador de grifo
✓ Tubos de ensayo	✓ Fuentes
✓ Gradilla de madera	✓ Hornilla
✓ Manguerillas	✓ Varilla de vidrio
✓ Papel filtro	
MATERIA PRIMA	
✓ Uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>) procedente del municipio de Achocalla.	
✓ Yogurt natural distribuido por PIL ANDINA S.A.	

✓ Yogurt de frutilla con adición de colorante natural carmín de cochinilla, distribuido por PIL ANDINA S.A. ✓ Colorante sintético distribuido por ELY-MAR producto peruano.	
EQUIPOS	
✓ Balanza Analítica ✓ Estufa ✓ Horno de incineración ✓ Espectrofotómetro UV-VIS	✓ Rotavapor ✓ Refrigerador ✓ PH-metro ✓ Refractómetro en escala 0-50
REACTIVOS	
✓ Agua Destilada ✓ Etanol 96% ✓ Ácido Cítrico ✓ Ácido Clorhídrico ✓ Hidróxido de Sodio ✓ Cloruro de Potasio (0.025 M) ✓ Acetato Sódico (0.4 M) ✓ Mg° metálico ✓ Zn° metálico	

FUENTE PROPIA.

3.3.2 FASE II: Examen preliminar de la uva silvestre

- Toma de muestra

La toma de muestra de la uva silvestre se realizó bajo la NB (Norma Boliviana), es decir fueron recolectadas en condiciones inocuas, en envases con capacidad de 600 g. Proceso que se realizó en épocas de verano tiempo de cosecha de esta fruta silvestre.

- Acondicionamiento de la muestra

Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de la carrera de Química Industrial, bajo refrigeración a 5°C, para no alterar las propiedades químicas de las muestras para su posterior análisis.

- Selección

Mediante un examen organoléptico se realizó una selección de las especies sanas y maduras, con el fin de obtener materia prima de calidad para el desarrollo del proceso.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 1. Selección de muestra.

- Lavado y Desinfección

Este proceso permitió eliminar de la superficie de los alimentos la carga microbiana que a simple vista no se puede observar, también esta es una manipulación en la que el producto elimina sustancias que lo contaminan (partículas ajenas al producto). La desinfección se la realizó con una solución de hipoclorito al 0.1%, en la cual se mantuvo el producto sumergido por 15 minutos.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 2. Muestra seleccionada.

3.3.3 FASE III: Análisis Bromatológico de la uva silvestre

Se conoce como bromatología al estudio a profundidad de todo lo relacionado a los alimentos en cuanto a su composición, nutrientes, características fisicoquímicas, cualidades organolépticas (olor, sabor, textura, aspecto, color, etc.) y además su comportamiento en cuanto a producción, manipulación, elaboración, conservación e incluso en lo referente a los aspectos sanitarios. Esta área científica es sumamente importante para manipular los alimentos de una forma adecuada para que así sean mucho mejores para nuestro consumo, no solo a nivel nutricional, sino también más seguros.

Para realizar el análisis bromatológico se utilizaron los métodos establecidos por IBNORCA, de la misma manera se revisó el Manual de Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Carrera de Química Industrial. Para nuestro análisis bromatológico se tomó en cuenta la evaluación organoléptica y el análisis químico.

3.3.3.1 Evaluación organoléptica

La evaluación organoléptica de los alimentos interpreta las respuestas de las personas según la vista, el olfato, el tacto, el gusto.

Para este estudio se tomaron muestras de uva silvestre escogidas al azar, después de lavarlas y desinfectarlas las cuales fueron conservadas 4 horas después de su cosecha a -5°C . Se realizaron pruebas de color, olor, sabor, aroma y forma.

3.3.3.2 Análisis químico

3.3.3.2.1 Humedad

Todos los alimentos contienen agua en mayor o menor proporción; en los alimentos naturales hay entre un 60% y un 95% de agua, como promedio. El agua se encuentra en los alimentos en forma libre, aumentando el volumen.

El contenido de humedad es la relación que existe entre el peso de agua contenida en la muestra en estado natural y el peso de la muestra después de ser secada en la estufa a una temperatura entre los 105°C - 110°C . Se expresa en forma de porcentaje, puede variar desde cero cuando está perfectamente seco hasta un máximo determinado que no necesariamente es el 100%.

Método

Este método se basa en secar la muestra a $108^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, para después de pesar, determinar su contenido de humedad (IBNORCA, 2006 NB 319002) ⁽⁸⁴⁾.

- Se pesó 10 gramos de uva silvestre (toda la baya en general cascara, pulpa y semillas) en una caja petri previamente pesada.
- Ya teniendo la muestra en la caja petri pesar nuevamente.
- Llevar la caja petri a la estufa a $108^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dejándola por espacio de una hora.
- Se sacó la muestra de la estufa y se colocó en un desecador durante 10 minutos, pesar nuevamente la muestra.
- Este proceso tardó aproximadamente 4 horas, registrando cada 30 minutos la diferencia de pesadas, es decir hasta obtener un peso constante.
- El procedimiento se realizó por cuadruplicado.

El porcentaje de humedad se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{P_m - P_m \text{ seca}}{P_m} * 100$$

Ecuación 7

Dónde:

P_m = Peso de la muestra.

$P_m \text{ seca}$ = Peso de la muestra seca.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 1. Determinación de humedad.

3.3.3.2.2 Ceniza

Las cenizas de un alimento es el residuo inorgánico que queda después de calcinar la materia orgánica, están constituidas por óxidos o sales, de los diferentes elementos.

La materia orgánica es quemada en presencia de oxígeno del aire formando como producto de reacción CO_2 y H_2O .

Método

Este método se basa en la incineración de la muestra a una temperatura de $550\text{ }^\circ\text{C} \pm 20\text{ }^\circ\text{C}$ o a $900\text{ }^\circ\text{C} \pm 25\text{ }^\circ\text{C}$ (rojo sin brillo) (IBNORCA, 2010 NB 317028).

- Para la determinación del porcentaje de cenizas se utilizó las muestras secas del análisis de humedad anteriormente realizadas.
- Se pesó 3.35 gramos de muestra en un crisol de porcelana previamente pesado.
- Una vez pesada la muestra se llevó los crisoles a un horno de incineración mufla vulcana-550 y se mantuvo a una temperatura de 800°C durante 3 horas, hasta que las cenizas presentaron una coloración blanquecina o plomo.
- Se trasladaron los crisoles al desecador usando siempre pinzas de metal para manejar los crisoles después de que se incineraran. Se enfriaron y se pesaron inmediatamente para prevenir la absorción de la humedad.
- El procedimiento se realizó por cuadruplicado.

El porcentaje de cenizas se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Ceniza} = \frac{P \text{ ceniza}}{Pm \text{ seca}} * 100$$

Ecuación 8

Dónde:

P ceniza = Peso de cenizas.

Pm seca = Peso de la muestra seca.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 4. Determinación de cenizas.

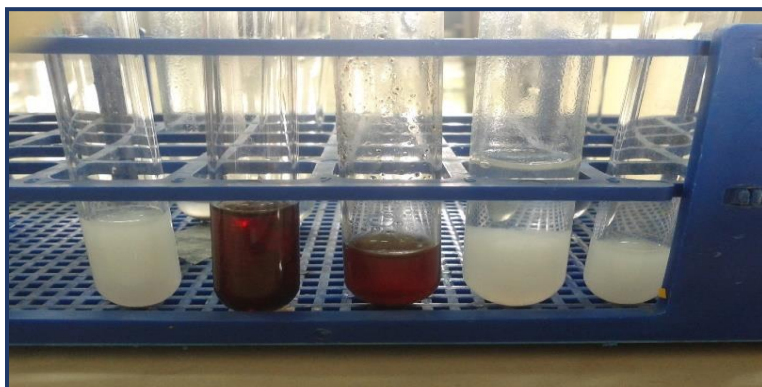
Con el residuo inorgánico o cenizas se determinó la presencia de elementos minerales mediante el siguiente análisis cualitativo:

Identificación de hierro

- Para la identificación de hierro inicialmente disolvemos completamente la muestra (cenizas) en agua.
- Una vez disuelto adicionamos gotas de ácido clorhídrico hasta un medio ácido.
- Posteriormente colocamos miligramos de tiocianato de potasio teniendo como resultado una solución roja intensa.

Identificación de calcio

- Para la identificación de calcio disolvemos completamente la muestra (cenizas) en agua.
- Una vez disuelto adicionamos miligramos de carbonato de amonio para precipitar carbonato de calcio.
- Al obtener el precipitado de carbonato de calcio adicionamos ácido nítrico suministrando un poco de calor para generar el dióxido de carbono (efervescencia) y el ion calcio disolviéndose el precipitado.
- Finalmente, a la solución obtenida adicionamos miligramos de oxalato de amonio en medio de pH de 7-8 para precipitar oxalato de calcio.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 5. Identificación de elementos minerales en las cenizas.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

3.3.3.2.3 Materia Orgánica

La materia seca en un alimento puede ser dividida en materia orgánica e inorgánica después de la calcinación. Compuestos que contienen carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O) y nitrógeno (N) son clasificados como orgánicos. Cuando una muestra de alimento está colocada en una mufla a una temperatura de $550^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$ o a $900^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ (rojo sin brillo) la materia orgánica es quemada y la materia restante es la parte mineral, llamada ceniza.

Método

Para la determinación de la materia orgánica es simplemente la relación entre cenizas y la materia seca (humedad), datos que ya tenemos de los análisis realizados anteriormente.

El porcentaje de materia orgánica se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Materia Orgánica} = \frac{\text{Pm seca} - \text{P ceniza}}{\text{Pm seca}} * (100 - \%H)$$

Ecuación 9

3.3.4 FASE IV: Extracción del colorante (Antocianinas)

Los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de solventes ácidos, algunas bibliografías sugieren, por ejemplo: HCl en Metanol, HCl en Etanol, Cloroformo con Acetona, Etanol con Ácido Acético, Metanol con Ácido Acético, Etanol con Ácido Cítrico. Se debe tomar en cuenta que el concentrado final será de grado alimenticio, por este motivo las soluciones como el Metanol y el cloroformo podrían provocar daños irreversibles para la salud o podrían dejar un olor residual como el caso del Ácido Acético y Acetona (80). La obtención de los extractos de antocianinas a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) se efectuó usando como disolventes: alcohol

etílico, alcohol etílico acidificado y agua destilada, con el objetivo de encontrar el mejor solvente.

Para obtener los extractos se empleó el equipo Soxhlet, el cual consta de un balón de fondo aplanado, un refrigerante, cuerpo extractor (corneta) y mangueras. El mismo que para el presente estudio se encuentra en el laboratorio de Química Industrial de la facultad de Tecnología.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 6. Extractor Soxhlet.

Los pasos que se siguieron para obtener el extracto son:

- Se lava el equipo con abundante agua y detergente para eliminar posibles contaminantes.
- Después de haber dejado escurrir cada parte del equipo se procede a armarlo, para ello en primer lugar se coloca sobre la manta de calentamiento el balón de base plana en el cual se pone puntos de ebullición (trocitos de tubos capilares).
- Al balón adicionar 125 ml de solvente (el volumen apropiado deberá ser la mitad de la capacidad del balón), el cual sujetar a un soporte universal.

- Previamente construir un cartucho de papel filtro. Una vez construido el cartucho pesarlo y registrar el dato.
- Pesar 25 gramos de muestra (uva silvestre).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 7. Pesado de la muestra.

- Encima de este balón se instala el cuerpo extractor (corneta) en donde va el cartucho con los 25 g de muestra (uva silvestre). Este cartucho es de papel filtro, sellado con grapas. Finalmente, por encima del cuerpo extractor va el refrigerante al cual se conectan dos mangueras, una para la entrada del agua y la otra para su evacuación.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 8. Cartucho armado.

- Una vez instalado el equipo se procede a la extracción. Se abre la llave de agua para que circule por el refrigerante y a la vez se conecta la manta calentadora para que el

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

solvente empiece a evaporarse y por tanto a extraer el principio activo de la muestra. Cabe recalcar que esta manta calentadora no tiene niveles de temperatura por lo que nuestro primer objetivo será encontrar la temperatura adecuada de tal forma que no se produzca una fuerte explosión del solvente sino únicamente alcance la temperatura de ebullición del mismo para de esta forma provocar la evaporación de este, y así la extracción.

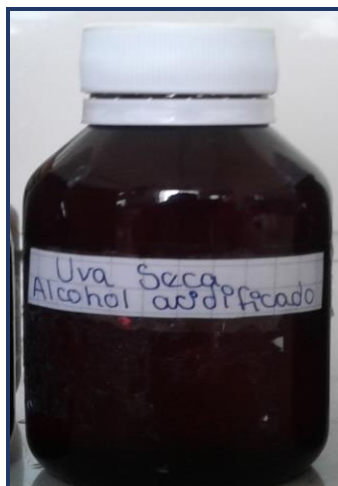
- Realizar la extracción continua a una temperatura no mayor a 60°C, hasta observar una completa extracción del colorante, es decir que el disolvente que cae del sifón al balón sea cristalino (cortar la extracción), aproximadamente de 4 a 5 horas (8 sifonadas).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 9. Extracción del colorante.

- Cuando transcurre el tiempo necesario para alcanzar las 8 sifonadas se apaga el equipo hasta que este se enfríe, luego se desarma y con ayuda de una pinza se saca el cartucho del cuerpo extractor, llevar el cartucho con la muestra ya extraída al secador (estufa).
- El extracto obtenido dejar enfriar a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez frío colocar en botellas de vidrio lavadas perfectamente, se etiquetó y guardó en un lugar oscuro para evitar incidencia de la luz.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 10. Extracto de colorante envasado.

- Se realizó 10 pruebas de extracción con pesos iguales de muestra, recolectando cada extracto obtenido en un frasco ámbar.
- Se obtuvo un volumen total de 1110 ml del extracto natural (todo lo recolectado).

Nota: Los diferentes solventes que se utilizaron fueron: alcohol etílico de 96°, alcohol etílico acidificado (alcohol etílico - Ácido Cítrico al 0.03%) y agua destilada. (Ver Anexo 1)

3.3.5 FASE V: Análisis cualitativo de los extractos obtenidos no concentrados

Consiste en un conjunto de pruebas cualitativas que son sencillas y rápidas. Estas pruebas permiten detectar y/o identificar la presencia de la molécula de antocianina en nuestro extracto alcohólico obtenido.

Ha de mencionarse que las reacciones utilizadas son selectivas para las clases o grupos de compuestos que se investigan; detectando la mínima cantidad posible, con el empleo de un mínimo equipo de laboratorio.

A continuación, detallaremos un conjunto de pruebas o ensayos que empleamos en el análisis cualitativo del extracto alcohólico:

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

3.3.5.1 Prueba de Shinoda

- Medir 2.0 ml de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
 - Adicionar una porción de Mg⁰ metálico.
 - Adicionar 1.0 ml de HCl concentrado.
 - Observar coloración formada y comparar con los colores de la tabla 32.
- Identificación para Flavonoides (20) (Ver Anexo 2).

3.3.5.2 Prueba con Zn/HCl

- Medir 2.0 ml de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
 - Transferirlo a un tubo de ensayo.
 - Adicionar una porción de Zn⁰ metálico.
 - Adicionar 1 ml de HCl concentrado.
 - Observar coloración formada y comparar con los colores de la tabla 33.
- Identificación para Flavonoides (20) (Ver Anexo 2).

3.3.5.3 Prueba con NaOH 1N

- Tomar 10.0 ml de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
 - Calentar en baño de vapor y concentrar hasta 5.0 ml.
 - En un tubo de ensayo colocar 2.5 ml del extracto concentrado.
 - Añadir 0.5 ml de NaOH 1N.
 - Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla 34.
- Identificación para Flavonoides (20) (Ver Anexo 2).

3.3.5.4 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido

- Medir 1.0 ml de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Transferir a un tubo de ensayo.

- Adicionar unas gotas de HCl concentrado hasta llevar a pH ácido, utilizando papel indicador para verificar el pH.
- Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla 35.

Identificación para Antocianinas (20) (Ver Anexo 2).

3.3.5.5 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH alcalino

- Medir 1.0 ml de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Transferir a un tubo de ensayo.
- Adicionar unas gotas de NaOH 1N hasta llevar a pH alcalino, utilizando papel indicador para verificar el pH.
- Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla 35.

Identificación para Antocianinas (20) (Ver Anexo 2).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 11. Análisis cualitativo de antocianinas.

3.3.6 FASE VI: Cuantificación de antocianinas totales en el extracto obtenidos no concentrados

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

Debido a que el pH es uno de los principales factores que afectan la estabilidad del color de las antocianinas, la concentración de estas se determinó por absorbancia usando el método de pH diferencial.

Este método se basa en que los espectros de UV-visible de las antocianinas varía de acuerdo al pH del medio, con los cambios de pH se manifiesta un llamativo cambio en la absorbancia.

Se trabajó con el equipo, UV-VIS SPECTROPHOTOMETERS SHIMADZU versión, UVmini-1240.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 12. Espectrofotómetro UV-Visible.

Método para cuantificar las antocianinas

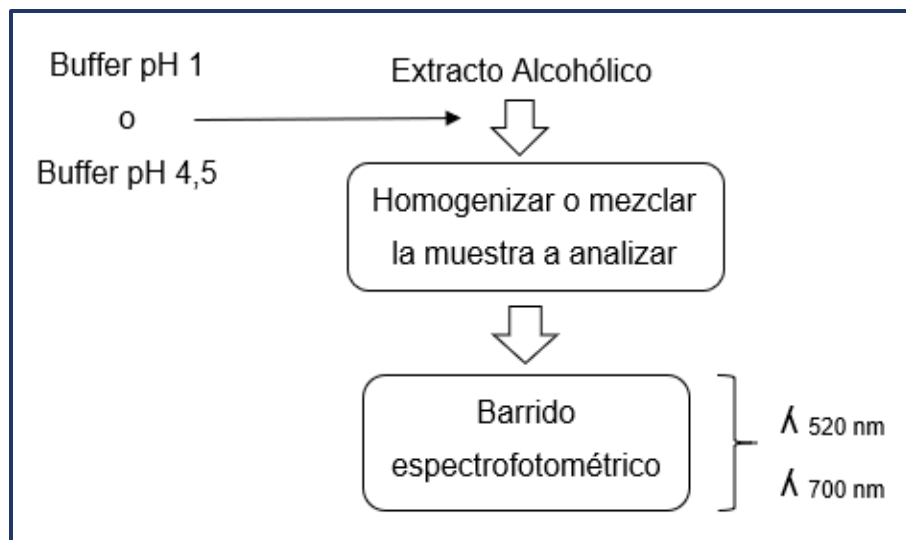
Soluciones buffer:

- Preparar una solución de cloruro de potasio (KCl) 0,025 M y ajustar el pH a 1 con ácido clorhídrico concentrado.
- Preparar una solución de acetato de sodio (CH₃COONa) 0,4 M y ajustar el pH a 4,5 con ácido clorhídrico concentrado.

Lectura de la absorbancia:

Las mediciones se realizan a las longitudes de onda de 520 nm y 700 nm, para determinar el contenido de antocianinas totales.

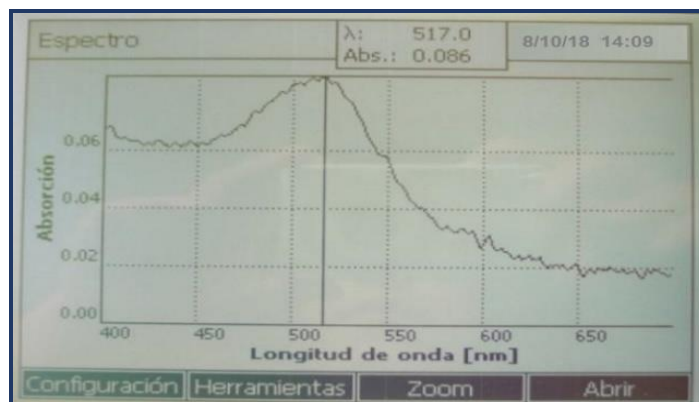
**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**



FUENTE PROPIA.

Diagrama 2. Lectura de absorción del extracto alcohólico para el método pH diferencial.

- Se utilizó como blanco alcohol etílico y agua destilada, los mismos solventes con el que se realizó la extracción.
- Se tomaron 5 ml de la solución extraída y se mezclaron 5 ml de buffer pH 1.
- Como la solución no se encontraba concentrada, no se realizó diluciones.
- Realizar un barrido espectrofotométrico en un rango de longitud de onda desde 520 hasta 700nm, tener una absorbancia menor a 0.8 UA (Esto para cumplir la Ley de Beer).
- Así mismo, se realizó el mismo procedimiento para la muestra con el buffer de pH 4.5.
- Se toma la lectura de los picos más altos a pH 1 y a pH 4.5, así como la toma de lectura a los 700nm.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 13. Lectura de antocianinas en espectrofotómetro.

3.3.7 FASE VII: Concentración del extracto seleccionado

Se toma el extracto alcohólico ya que este presenta una mejor extracción del colorante, por tener mayor concentración de antocianinas presentes. El extracto alcohólico fue reducido y llevado a un rotavapor, esto con el fin de precipitar y concentrar el colorante, obteniendo así un líquido aceitoso de color rojizo intenso.

Para concentrar 1110 ml de extracto alcohólico se tuvo que dividir en dos proporciones iguales de 555 ml, ya que el balón del rotavapor tenía una capacidad de 1000 ml.

- Colocar 555 ml del extracto alcohólico en el balón del rotavapor (mitad de la capacidad).
- Llevar al equipo del rotavapor cuidando siempre la exposición a la luz del medio y elevadas temperaturas ya que la antocianina es sensible a estos factores.
- El rotavapor cuenta con una fuente de agua en el que se encuentra el balón junto con el extracto natural, la concentración se realiza a una temperatura de 33°C y a 20 rpm, por un tiempo aproximado de 40 minutos, hasta eliminar la porción alcohólica, reduciendo así el tiempo de exposición al calor y evitar la degradación de la antocianina. El equipo también cuenta con un motor de succión.
- A medida que va girando y es calentado la solución extraída, se recolecta el solvente en otro balón.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

- Quedando en el primer balón 275 ml de extracto natural concentrado (colorante), reduciendo de tal manera el volumen inicial, ya que en su mayoría contenía solvente alcohólico.
- Se realizó el mismo procedimiento con la otra mitad de extracto, obteniéndose un volumen de 272 ml.
- Volumen total de colorante natural concentrado 547 ml.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 12. Rotavapor.

Envasado

Se lo realizó con la finalidad de proteger al producto de agentes externos, alteración y contaminación, para ello se procedió a retirar el concentrado del rotavapor y a envasar en frascos de vidrio color ámbar debidamente esterilizado, para luego ser almacenados en un lugar seco y protegido de la luz.

3.3.7.1 Determinación de Sólidos totales en el extracto concentrado (colorante) de uva silvestre.

La determinación de los sólidos totales permite estimar los contenidos de materias disueltas y suspendidas presentes en agua, pero el resultado está condicionado por la temperatura y la duración de la desecación. La determinación de sólidos disueltos totales

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

mide específicamente el total de residuos sólidos filtrables (sales y residuos orgánicos). La materia seca que permanece en el alimento posterior a la remoción del agua se conoce como sólidos totales.

Método

Este método se basa en la incineración de la muestra a una temperatura de $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $900\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rojo sin brillo) (IBNORCA, 2010 NB 317028).

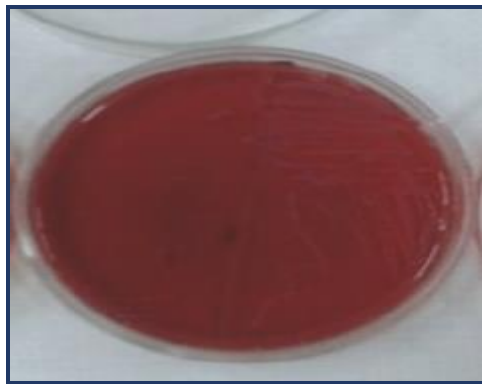
La determinación de los sólidos totales del extracto concentrado se basa en una medición cuantitativa de disminución de peso que experimenta una cápsula previamente tarada tras la evaporación de una muestra y secado a peso constante a $68\text{ }^{\circ}\text{C} - 69\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Pesar la caja petri vacía, colocar 20 ml de muestra dentro de esta y pesar nuevamente.
- Colocar la caja petri con la muestra en una placa calefactora en baño maría a una temperatura de $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 a 30 minutos y evaporarla hasta casi sequedad (consistencia pegajosa entre color caramelo y negro), pero evitando ebullición y salpicaduras.
- Quite la capsula del baño maría, limpie la humedad exterior de la capsula y coloque en el desecador durante 10 minutos, pesar rápidamente para evitar cambios en el peso por exposición al aire y/o degradación del residuo.
- Registrar los datos.
- Repita el calentamiento por periodos de aproximadamente 30 min, enfríe y pese hasta obtener masa constante.
- El procedimiento se realizó por cuadruplicado.

El porcentaje de sólidos totales se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Sólidos Totales} = \frac{\text{Peso del residuo en g}}{\text{ml de muestra}} * 100$$

Ecuación 10



FUENTE PROPIA.

Fotografía 15. Determinación de solidos totales del colorante concentrado.

3.3.8 FASE VIII: Aplicación del colorante natural (antocianina) en el Yogurt Natural

Se realizaron 4 tratamientos (Tabla 12), los cuales reciben la denominación: T0, T1, T2 y T3.

Tabla 12. Dosis del colorante de uva silvestre para cada tratamiento.
ml de colorante/100 ml de yogurt natural.

MUESTRAS			
TRATAMIENTO	DOSIS DE COLORANTE		CANTIDAD DE YOGURT NATURAL
	%	ml	
T0	0%	0 ml	100 ml
T1	5,7%	6 ml	100 ml
T2	6,5%	7 ml	100 ml
T3	7,4%	8 ml	100 ml

FUENTE PROPIA.

- En envases de Tecnopor se midieron 100 ml de Yogurt Natural PIL, para cada tratamiento (T0, T1, T2 y T3).
- Seguidamente colocar las dosis del colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*). Las dosis aplicadas fueron: 6 ml, 7 ml y 8 ml.

- Para medir el efecto del colorante en los diferentes tratamientos se almacenaron las muestras en refrigeración (5 °C) por el lapso de 30 días, en envases tapados.
- En el transcurso de los 30 días se tomaron datos semanales correspondientes a: pH, Acidez y Grados Brix.

Antes de determinar las dosis indicadas anteriormente en el yogurt se procedió a realizar pruebas preliminares, para el uso del colorante, mediante las pruebas se determinó que las dosis de: 0.5, 1, 1.5, 2, 3 y 4 ml de colorante/100 ml de Yogurt Natural no dan el resultado esperado, ya que al ser aplicadas su coloración no es significativa, por lo que, para el ensayo en sí, se optó por elevar las dosis de colorante en 6, 7 y 8 ml de colorante/100 ml de Yogurt Natural.

3.3.8.1 Factores de estudio

En la “Extracción de antocianinas a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) para su aplicación como colorante natural en derivados lácteos (yogurt)”. Se detallan los factores de estudio en la Tabla 13.

Tabla 13. Factores de estudio.

TRATAMIENTOS	DOSIS DE COLORANTE	VARIABLES A EVALUAR EN EL YOGURT
T0	0 ml	
T1	6 ml	- pH
T2	7 ml	- Acidez
T3	8 ml	- Grados Brix

FUENTE PROPIA.

3.3.8.2 Variables a evaluar

3.3.8.2.1 Variables Cuantitativas

- **Determinación del pH en el yogurt**

- Se realizó la calibración del pH-metro PCST 35, con soluciones tampón de pH 4 y 10.
- Colocar 9 ml de muestra (yogurt con adición del colorante obtenido) en un vaso precipitado de 50 ml, seguidamente adicionar agua destilada para que el yogurt tenga una consistencia más líquida.
- Lavar el electrodo del pH-metro con agua destilada, introducir el electrodo dentro del vaso de precipitado que contienen la muestra y realizar la lectura.
- Se realizó la lectura del pH por triplicado para cada tratamiento (una vez a la semana en el transcurso de 30 días).

- **Determinación de la Acidez Titulable en el yogurt**

Estandarización del NaOH

Al ser el hidróxido de sodio un patrón primario, esta disolución solo será aproximadamente 0,1 N, por lo que es necesario estandarizarla para conocer exactamente su concentración.

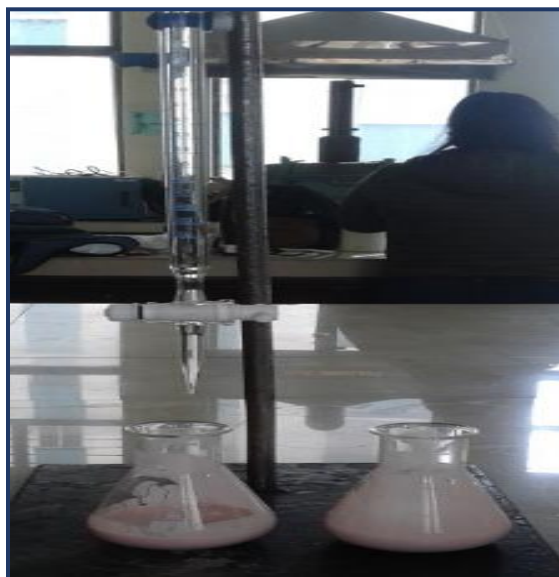
- Pesar en un vaso precipitado 2 gramos de hidróxido de sodio disolver en agua destilada con ayuda de una varilla colocarlo en un matraz aforado de 500 ml, completar el volumen del aforo.
- Tomamos una bureta y la llenamos con 50 ml de la solución de NaOH, sujetando la bureta a un soporte universal.
- Pesar 0,8160 gramos de biftalato ácido de potasio, vaciarlo a un matraz erlenmeyer y disolver con agua destilada con ayuda de un agitador colocar 3 gotas de fenolftaleína como indicador.
- Dejamos salir poco a poco la solución de NaOH desde la bureta hasta que la mezcla se torne de color fucsia o rosado (equilibrio); registrar el volumen gastado de NaOH.

- Este procedimiento se realizó por triplicado para conocer la concentración exacta del hidróxido de sodio.

Acidez titulable en el yogurt

La acidez del yogurt debe expresarse en porcentaje de ácido láctico o grados Dornic (°D).

- Tomar 9 ml de muestra (yogurt con adición del colorante obtenido) en un matraz erlenmeyer y mezclar con 9 ml de agua destilada para que el yogurt tenga una consistencia más líquida, seguidamente colocar 3 gotas de fenolftaleína.
- Gota a gota se procedió a titular con la solución de hidróxido de sodio 0,1 N ya estandarizada, agitando constantemente.
- Titular hasta obtener una coloración rosada.
- Leer en la bureta la cantidad de hidróxido de sodio gastado y registrar los datos.
- Se realizó la titulación por triplicado para cada tratamiento (una vez a la semana en el transcurso de 30 días).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 16. Medición de acidez en yogurt.

- **Determinación de los Grados Brix en el yogurt**

Para la determinación de los grados Brix se utiliza un Refractómetro manual con escala de 0-50.

- Se calibro el refractómetro con agua destilada limpiar y secar.
- Se deposito una o dos gotas de muestra (yogurt con adición del colorante obtenido) sobre el prisma principal, cerrar dejando la muestra entre los dos prismas.
- Seguidamente se precedió a hacer la lectura, se utilizó agua destilada para limpiar el prisma.
- Este procedimiento se lo realizo por triplicado para cada tratamiento (una vez a la semana en el transcurso de 30 días).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 17. Refractómetro manual.

3.3.9 FASE IX: Análisis y comparación con muestras referentes de un colorante natural comercial y otro artificial

El trabajo se desarrolló según procedimiento del análisis para el yogurt con adición de colorante natural extraído de uva silvestre (*Cissus verticillata*).

Muestras:

Tabla 14. Muestras para análisis y comparación frente al colorante natural obtenido.

MUESTRAS PARA ANÁLISIS Y COMPARACIÓN	
COLORANTE NATURAL	COLORANTE ARTIFICIAL
Carmín de Cochinilla*	Rojo allura (Azoico)**

FUENTE PROPIA.

* Yogurt de frutilla con adición de colorante natural carmín de cochinilla, distribuido por: PIL ANDINA S.A.

** Colorante sintético distribuido por: ELY-MAR producto peruano.

- En un vaso Tecnopor tomar 100 ml de yogurt con colorante carmín de cochinilla (yogurt de frutilla PIL), seguidamente en otro vaso tomar 100 ml de yogurt con colorante artificial (Rojo allura).
- Las muestras de igual manera fueron almacenaron a 5 °C por el lapso de 30 días, en envases tapados.
- En el transcurso de los 30 días se tomaron datos semanales correspondientes a: pH, Acidez y Grados Brix (procedimiento ya mencionado anteriormente).
- Los resultados fueron comparados con el yogurt que contiene distintas dosis de colorante natural extraído de uva silvestre.

3.3.9.1 Consideración y análisis de todas las muestras

Tabla 15. Análisis de todas las muestras almacenados en refrigeración (5 °C).

ANÁLISIS DE TODAS LAS MUESTRAS ALMACENADOS EN REFRIGERACIÓN (5 °C)		
Muestras	Tratamiento	Cantidad de muestras
Yogurt natural*	T0	4
Yogurt con adición de colorante natural de uva silvestre**	T1 T2	12

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

	T3	
Yogurt con adición de colorante natural (Carmín de cochinilla) ***	TCN	4
Yogurt con adición de colorante artificial (rojo allura) ****	TCA	4
TOTAL, DE MUESTRAS		24

FUENTE PROPIA.

*Yogurt natural, distribuido por: PIL ANDINA S.A.

**Colorante obtenido de uva silvestre, procedente de: Municipio de Achocalla.

***Yogurt de frutilla con adición de colorante natural carmín de cochinilla, distribuido por: PIL ANDINA.

****Colorante sintético rojo allura distribuido por: ELY-MAR producto peruano.

3.3.10 FASE X: Pruebas Microbiológicas en el yogurt.

Todas las pruebas de las características microbiológicas del yogurt, exigidas por IBNORCA, se realizaron en el Laboratorio de la Carrera de Química Industrial de la Universidad Mayor de San Andrés. Las pruebas se realizaron en las muestras.

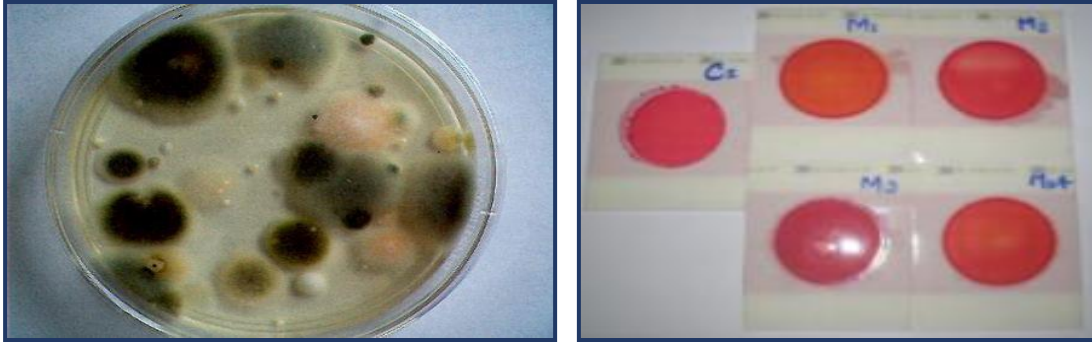
3.3.10.1 Recuento de Escherichia coli, Coliformes totales, Mohos y Levaduras

La determinación de Coliformes totales; fecales y Escherichia coli se ha realizado por la técnica de NMP (Numero Más Probable). El método se basa en la propiedad, que tienen los microorganismos denominados coliformes, de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a una temperatura entre 35°C +/- 2°C e incubados durante un periodo comprendido entre 24h a 48h (IBNORCA, 2002 NB32005). En la determinación de Mohos y Levaduras el método se basa en la siembra de una suspensión obtenida de una muestra con el diluyente y sus diluciones decimales, en un medio de cultivo selectivo, incubados a una temperatura de 22°C durante 72 horas (IBNORCA, 2003 NB-32006).

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

- Se preparo los medios de cultivo Bilis rojo verde brillante, MacConkey y PDA (Papa Dextrosa Agar) para Escherichia coli, Coliformes totales, Mohos y Levaduras respectivamente.
- El agar se llevó durante 20 minutos a la autoclave, cajas petri y el diluyente (peptona) preparado en un matraz erlenmeyer, todos previamente acondicionados.
- Se preparo 5 tubos de ensayo con peptona y se acondicionaran para llevarlos a la autoclave, para su posterior esterilización.
- Se adiciono 25 ml de muestra (yogurt con adición del colorante obtenido) en el matraz erlenmeyer que contiene peptona y se agitó hasta producir una mezcla homogénea.
- Se tomaron 1 ml de la mezcla y se depositó en la caja petri, seguidamente se adiciono 20 ml de Bilis rojo verde brillante (para coliformes totales), MacConkey (para coliformes totales) y agar PDA (para mohos y levaduras) en condiciones inocuas (bajo la flama de un mechero).
- Se tomaron de igual manera 1 ml de la mezcla y se depositaron en el primer tubo de ensayo que contiene peptona, se agito y se tomó 1 ml del primer tubo de ensayo para sembrar en una caja petri.
- El procedimiento anterior se las realizo consecutivamente en los cinco tubos de ensayo y cinco cajas petri.
- Una vez realizada la siembra esperar por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.
- Para Escherichia coli incubar por 48 horas (+/- 2 horas) a 35°C (+/- 1°C), para Coliformes incubar la caja cara arriba por 24 horas (+/- 2 horas) a 35°C (+/- 2°C) ⁽¹⁶⁴⁾.
- Para Levaduras y Mohos incubar la caja cara arriba por 3 a 4 días entre 21°C y 25°C ⁽¹³³⁾.
- El análisis microbiológico se realizó por duplicado para cada tratamiento.
- Ver Guía de Interpretación para el recuento de Escherichia coli, Coliformes Totales, Mohos y Levaduras.

Nota: No se encontró ninguna Especificación Microbiológica Nacional e Internacional para este tipo de Microorganismos en colorantes.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 18. Recuento de Escherichia coli, Coliformes totales, Mohos y Levaduras.

3.3.11 FASE XI: Análisis sensorial

Se realizaron las pruebas sensoriales en los distintos tratamientos con denominación T1, T2 y T3, para así compararlo frente a un yogurt comercial de frutilla y un yogurt con colorante artificial que también fueron sometidos a esta prueba sensorial.

- Se tomaron 250 ml de: muestras de yogurt con el colorante obtenido de uva silvestre (Tratamientos con denominación T1, T2 y T3), yogurt comercial de frutilla y yogurt con colorante artificial en envases tapados cada uno.
- Las muestras fueron almacenadas a 5°C por el lapso de 30 días.
- Para realizar el análisis sensorial se procedió a medir 25 ml de yogurt de las cinco muestras en pequeños vasitos, se reunió a un panel de 10 degustadores.
- Seguidamente se procedió a registrar la información de las variables cualitativas mediante hojas de degustación diseñadas con todas las normas de un análisis sensorial para yogurt.
- La variable cualitativa fue medida al día 1 y al día 30 de la implementación del ensayo.

Este análisis y comparación fue efectuada para comparar la tonalidad de color entre los diferentes tratamientos con denominación T1, T2, T3, TCN y TCA.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS Y RESULTADOS

En el estudio de la “Extracción de antocianinas a partir de la uva silvestre (*Cissus verticillata*) para su aplicación como colorante natural en derivados lácteos (yogurt)” se obtuvo los siguientes análisis y resultados.

4.1 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO DE LA UVA SILVESTRE

4.1.1 Evaluación organoléptica

El análisis organoléptico o evaluación sensorial, se realizó a través de los sentidos de la vista, olfato y gusto, considerando los caracteres de aspecto, olor, sabor y color de la uva silvestre (*Cissus verticillata*).



- **Nombre:** Uva silvestre.
- **Familia:** Vitáceae.
- **Nombre científico:** Cissus Verticillata.
- **Forma:** Esférico u ovoide.
- **Color:** negro brillante.
- **Olor:** Característico.
- **Sabor:** Ligeramente ácido.
- **Aroma:** Intenso.

4.1.2 Análisis químico

Para el análisis bromatológico nos basamos en los métodos establecidos por el Manual de Laboratorio de Análisis de Alimentos.

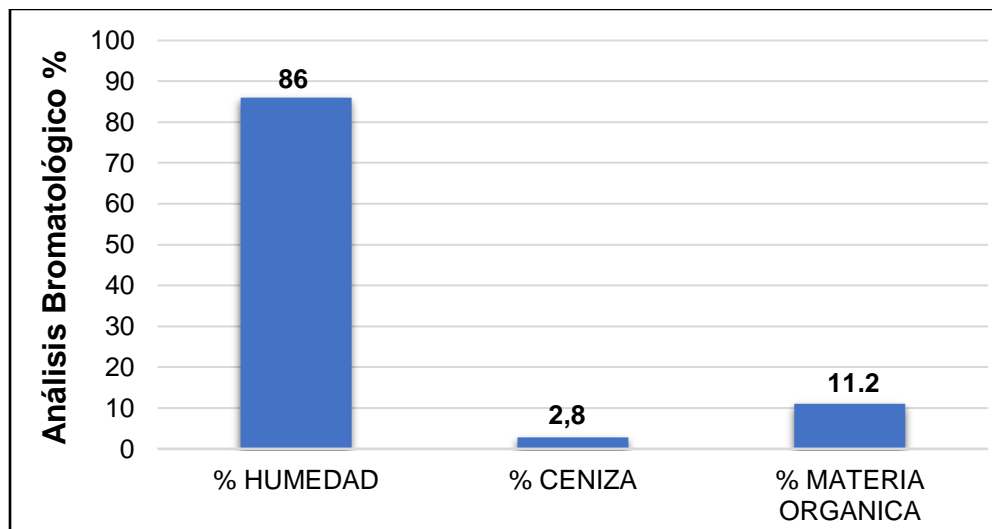
Tabla 16. Resultados del análisis bromatológico de la uva silvestre (*Cissus verticillata*).

EXPRESIÓN	RESULTADOS %	$(\bar{x} \pm \alpha)$ g	CV %
Humedad	86	$0,86 \pm 0,02$	1,20
Cenizas	2,8	$0,028 \pm 0,004$	8,36
Materia Orgánica	11,2	$0,112 \pm 0,01$	8,41

FUENTE PROPIA.

Para una mejor visualización a continuación se muestra la gráfica de resultados.

Gráfica 1. Resultado del análisis bromatológico de la uva silvestre (*Cissus verticillata*).



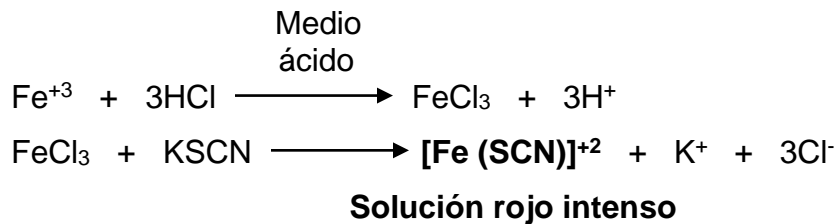
FUENTE PROPIA.

La baya de uva silvestre (*Cissus verticillata*) es un fruto que presenta alto contenido de humedad con un 86%, esto se debe a que del 80 % hasta el 90 % de la composición de

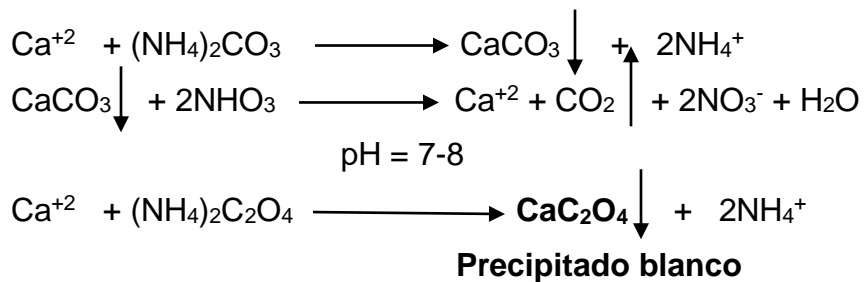
las frutas es agua, debido a este alto porcentaje de agua y a los aromas de su composición, la fruta es muy refrescante.

Con el residuo inorgánico o cenizas se determinó la presencia de elementos minerales mediante análisis cualitativo.

✓ **Determinación de hierro.**



✓ **Determinación de calcio.**



4.2 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LOS EXTRACTO NO CONCENTRADOS DE UVA SILVESTRE

Tabla 17. Prueba shinoda de identificación para Flavonoides.

IMAGEN (Anexo 14)	MUESTRA	SOLVENTE	PRUEBA	MÉTODO DE ANÁLISIS	COLORACIÓN OBTENIDA
	Uva silvestre	Alcohol etílico	shinoda	Cualitativo	Rojo

Fotografía 42	Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado			Rojo
	Uva silvestre	Agua destilada			Rojo

FUENTE PROPIA.

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de flavonoles y coloraciones anaranjadas como resultado de la combinación de colores amarillo y rojo debido a la interferencia de pigmentación, determinándose de esta manera la presencia de flavonas y flavonoles, ya que dicha coloración está presente en la Tabla 32 Identificación para Flavonoides.

Tabla 18. Prueba con Zn/HCl para identificación de Flavonoides.

IMAGEN (Anexo 14)	MUESTRA	SOLVENTE	PRUEBA	MÉTODO DE ANÁLISIS	COLORACIÓN OBTENIDA
Fotografía 43	Uva silvestre	Alcohol etílico	Zn/HCl	Cualitativo	Rojo
	Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado			Rojo
	Uva silvestre	Agua destilada			Rojo

FUENTE PROPIA.

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de flavonoles, según la Tabla 33 Identificación para Flavonoides.

Tabla 19. Prueba con Hidróxido de Sodio 1N para identificación de Flavonoides.

IMAGEN (Anexo 14)	MUESTRA	SOLVENTE	PRUEBA	MÉTODO DE ANÁLISIS	COLORACIÓN OBTENIDA
Fotografía 44	Uva silvestre	Alcohol etílico	NaOH 1N	Cualitativo	Verde
	Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado			Verde Azulado
	Uva silvestre	Agua destilada			Amarillo verdoso

FUENTE PROPIA.

En esta prueba se obtuvieron coloraciones de diferentes tonalidades de verde como resultado de la combinación de colores amarillo y azul, debido a la interferencia de pigmentación, lo cual confirma la presencia de flavonas, flavonoles y antocianinas de acuerdo a la Tabla 34 Identificación para Flavonoides. Las coloraciones amarillas en los extractos de uva silvestre en agua destilada por método Soxhlet indica la presencia de flavonas y flavonoles, pero a la vez indica la poca extracción de estos colorantes con este solvente, ya que también se ha podido comprobar la presencia de antocianinas.

Tabla 20. Prueba a un pH ácido para identificación de Antocianinas.

IMAGEN (Anexo 14)	MUESTRA	SOLVENTE	PRUEBA	MÉTODO DE ANÁLISIS	COLORACIÓN OBTENIDA
Fotografía 45	Uva silvestre	Alcohol etílico	pH Ácido	Cualitativo	Rojo
	Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado			Rojo
	Uva silvestre	Agua destilada			Rojo

FUENTE PROPIA.

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de antocianinas, ya que dicha coloración nos muestra la Tabla 35 Identificación para Antocianinas.

Tabla 21. Prueba a un pH alcalino para identificación de Antocianinas.

IMAGEN (Anexo 14)	MUESTRA	SOLVENTE	PRUEBA	MÉTODO DE ANÁLISIS	COLORACIÓN OBTENIDA
Fotografía 46	Uva silvestre	Alcohol etílico	pH Alcalino	Cualitativo	Verde
	Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado			Verde azulado
	Uva silvestre	Agua destilada			Verde

FUENTE PROPIA.

En esta prueba se obtuvieron coloraciones verdes y verdes azuladas que indican la presencia de antocianinas, ya que dicha coloración se encuentra en la Tabla 35 Identificación para Antocianina.

4.3 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN LOS EXTRACTOS NO CONCENTRADO DE UVA SILVESTRE

El espectro es como la huella dactilar del compuesto estudiado y, con ello, nos aseguramos de medir en el rango de longitud de onda correcto. De forma que los espectros de absorción para los extractos alcohólicos de la uva silvestre son los mostrados en los siguientes resultados.

La presencia de la antocianina más representativa en nuestro estudio es la **cianidina-3-glucosido** debido a que los picos que se reflejaban. Para el cálculo se utilizaron los siguientes datos:

PM: cianidina-3-glucosido: 449,2 g/mol.

FD: Factores de Dilución: 1000.

ϵ : absortividad molar de la cianidina-3-glucosido: 26900 L mol⁻¹ cm⁻¹.

❖ **Disolvente: Alcohol Etilico.**

Tabla 22. Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente alcohol etílico.

	pH 1	pH 4,5
A λ 520nm	0,6524	0,156
A λ 700nm	0,002	0,001

FUENTE PROPIA.

$$A = (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\text{max vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

$$A = (0,6524 - 0,002)_{\text{pH1}} - (0,156 - 0,001)_{\text{pH4,5}}$$

$$A = 0,4954$$

Remplazando:

$$\text{Colorante Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * \text{PM} * \text{FD} * 1000}{(\epsilon * 1)}$$

$$\text{Colorante Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{0,4954 * 449,2 \text{ g/mol} * 50 * 1000}{(26900 \text{ L/mol} * \text{cm} * 1 \text{ cm})}$$

Colorante Antocianina = 413,6314 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$, cianidina – 3 – glucosido
--

❖ **Disolvente: Alcohol Etílico Acidificado.****Tabla 23.** Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente alcohol etílico acidificado.

	pH 1	pH 4,5
A λ 520nm	0,5109	0,211
A λ 700nm	0,007	0,018

FUENTE PROPIA.

$$A = (0,5109 - 0,007)pH1 - (0,211 - 0,018)pH4,5$$

$$A = 0,3109$$

Remplazando:

$$\text{Colorante Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{(\epsilon * 1)}$$

$$\text{Colorante Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{0,3109 * 449,2 \text{ g/mol} * 50 * 1000}{(26900 \text{ L/mol} * \text{cm} * 1 \text{ cm})}$$

Colorante Antocianina = 259,5842 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$, cianidina – 3 – glucosido
--

❖ **Disolvente: Agua destilada.****Tabla 24.** Lectura de la absorbancia a distintas longitudes de onda en el extracto no concentrado a pH1 y pH4,5. Disolvente agua destilada.

	pH 1	pH 4,5
A λ 520nm	0,4982	0,299
A λ 700nm	0,005	0,021

FUENTE PROPIA.

$$A = (0,4982 - 0,005)pH1 - (0,299 - 0,021)pH4,5$$

$$A = 0,2152$$

Remplazando:

$$\text{Colorante Antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{(\epsilon * 1)}$$

$$\text{Colorante Antocianinas } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{0,2152 * 449,2 \text{ g/mol} * 50 * 1000}{(26900 \text{ L/mol} * \text{cm} * 1 \text{ cm})}$$

Colorante Antocianina = 179,68 $\frac{\text{mg}}{\text{L}}$, cianidina - 3 - glucosido
--

Utilizando el método del pH diferencial se pudo realizar los cálculos para determinar la concentración de antocianina (mg/L) en la uva silvestre (*Cissus verticillata*).

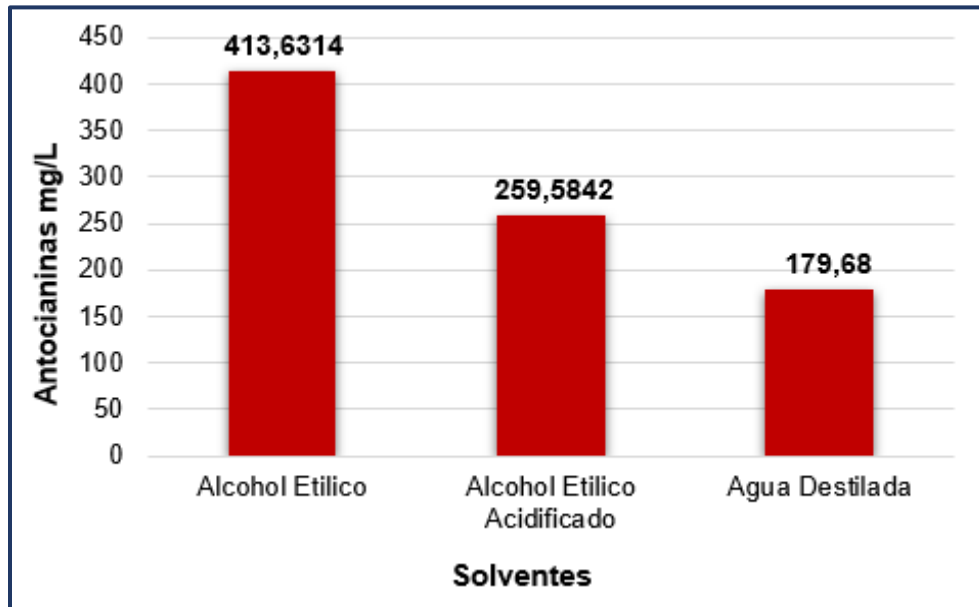
En la Tabla 25, observamos las concentraciones de antocianinas por cada 250 gramos de muestra en distintos solventes.

Tabla 25. Resultados de las concentraciones de antocianinas (mg/L) en el extracto líquido de uva silvestre a partir de 250 gramos.

MUESTRA	SOLVENTE	METODO DE ANÁLISIS	($\bar{x} \pm \alpha$) mg/L	CV %
Uva silvestre	Alcohol etílico	Espectrofotómetro	413,6314 \pm 0,0258	0,37
Uva silvestre	Alcohol etílico acidificado		259,5842 \pm 0,0102	0,05
Uva silvestre	Agua destilada		179,68 \pm 0,0972	2,35

FUENTE PROPIA.

Gráfica 3. Comparación de la cantidad de Antocianinas mg/L en el extracto líquido con diferentes solventes.



FUENTE PROPIA.

La cantidad de antocianinas está entre 20-1000 mg/100g de fruta fresca según (Fuleki, 1968), lo que se observa es una cantidad aceptable en la concentración de antocianinas extraídas con solvente alcohol etílico, en comparación a la extracción con los solventes de alcohol etílico acidificado y agua destilada los resultados de concentración son mínimos. En general la baja concentración se debe al mal cuidado de las bayas y a la mala manipulación durante y después de la cosecha ya que los proveedores los dejan expuestas al sol.

Por lo que para nuestro estudio tomaremos el extracto con mayor concentración: **413,6314 mg/L.**

4.4 EXTRACCIÓN DEL COLORANTE (ANTOCIANINA)

En este estudio se realizaron diez extracciones de uva silvestre, obteniendo las siguientes características:

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

EXTRACCIÓN DE UVA SILVESTRE							
#	Cantidad de muestra	Cantidad de solvente	Tiempo de extracción	Temperatura de extracción*	Volumen de extracto alcohólico obtenido	Volumen total de extracto concentrado (colorante)	Cantidad total de solvente recuperado
1	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	112 ml	547 ml	563 ml
2	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	100 ml		
3	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	118 ml		
4	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	115 ml		
5	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	110 ml		
6	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	98 ml		
7	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	115 ml		
8	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	115 ml		
9	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	112 ml		
10	25 g	125 ml	5 horas	35 - 40 °C	115 ml		
TOTAL	250 g	1250 ml	-	-	1110 ml	547 ml	563 ml

FUENTE PROPIA.

* Esta temperatura fue tomada con la ayuda de un termómetro ya que el equipo no consta con medidor de temperatura. Para nuestro estudio específico todas las extracciones se realizaron a un nivel máximo de 35 - 40 °C.

4.4.1 Determinación del rendimiento del colorante extraído

Se utilizó como equipo el extractor Soxhlet, para una extracción continua solido-liquido, utilizando como solvente alcohol etílico, ya que este solvente fue el que extrajo mayor contenido de antocianinas.

Para conocer la cantidad de colorante extraído (antocianina) en el trabajo desarrollado se determinó el rendimiento práctico y teórico, esto para la comparación de resultados.

4.4.1.1 Rendimiento práctico

En nuestro trabajo se realizaron 10 extracciones y en cada una de ellas se utilizaron 25 g de muestra con 125 ml de solvente. Para realizar este cálculo debemos considerar que a partir de 250 g de muestra de uva silvestre se necesitó 1250 ml de solvente, y a partir de este se obtuvieron 547 ml de colorante concentrado de uva silvestre. El rendimiento práctico en la extracción es:

$$\% \text{ Colorante extraído} = \frac{m \text{ colorante}}{m \text{ muestra}} * 100$$

Ecuación 10

Dónde:

m colorante concentrado = 118,5 g

m muestra = 250 g.

$$\% \text{ Colorante extraído} = \frac{118,5}{250} * 100$$

% Colorante extraído = 47,4

4.4.1.2 Rendimiento teórico

Datos a considerar:

El extracto natural es la mezcla del disolvente más el soluto (colorante) que es 1110 ml, y se utilizó 1250 ml de solvente, acá se observa una diferencia de volúmenes, donde el faltante se encuentra en el refinado es decir en el cartucho. El refinado es la sumatoria del Inerte (residuo de la muestra) más el disolvente y soluto retenido en el cartucho, esto en mínima cantidad.

Para una mejor interpretación se tiene las siguientes ecuaciones:

$$E = D + S = 1110 \text{ ml}$$

$$D = 1250 \text{ ml}$$

$$I = 218,48 \text{ g}$$

$$R = I + (D+S) r$$

Dónde:

E = Extracto.

D = Disolvente.

S = Sólido.

R = Refinado.

I = Inerte.

(D+S) r = Disolvente y sólido retenido.

Para el cálculo del rendimiento teórico empleamos el diagrama rectangular.

UVA SILVESTRE

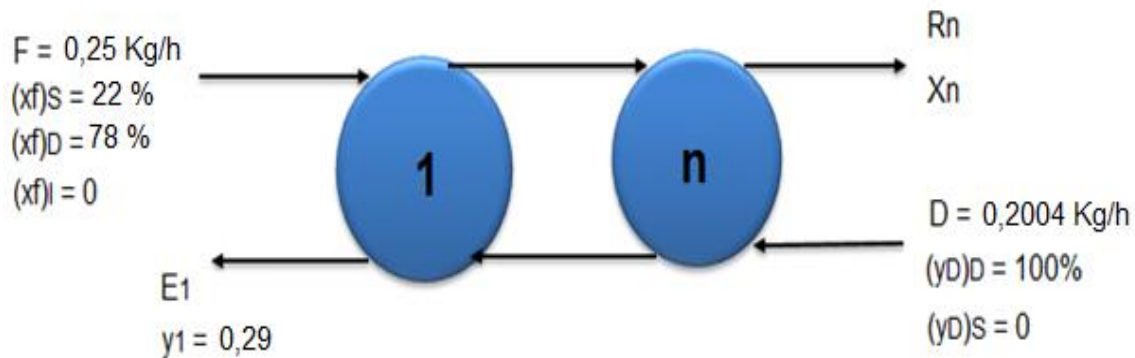


Diagrama 3. Contacto múltiple en contracorriente.

➤ **Primera etapa.**

Para la alimentación "F":

$$NF = \frac{I}{D + S} = \frac{0,25 * 0,78}{0 + (0,25 * 0,22)} = 3,54$$

$$XF = \frac{S}{D + S} = \frac{(0,25 * 0,22)}{0 + (0,25 * 0,22)} = 1$$

Para la mezcla "M1":

$$NM = \frac{I}{DT + S} = \frac{(0,25 * 0,78)}{0,2004 + (0,25 * 0,22)} = 0,76$$

$$XM = \frac{S}{DT + S} = \frac{(0,25 * 0,22)}{0,2004 + (0,25 * 0,22)} = 0,22$$

De la gráfica se tiene los siguientes datos:

$$E1: Y1=0,29$$

$$R1: X1=0,29, N1=1,5$$

Calculando "R1":

$$R1 = \frac{I * (1 + N)}{N}$$

Ecuación 13

$$R1 = \frac{(0,25 * 0,78) * (1 + 1,5)}{1,5} = \mathbf{0,32}$$

Calculando "E1":

$$F + D = E + R = M$$

Ecuación 14

$$E1 = F + D - R = 0,25 + 0,2004 - 0,32$$

$$\mathbf{E1 = 0,1304}$$

Disolución retenida:

$$Dr = (R1 - I) * (1 - X1)$$

Ecuación 15

$$Dr1 = (0,32 - (0,25 * 0,78)) * (1 - 0,29) = 0,0888$$

➤ **Segunda etapa.**

Para la mezcla "M2":

$$NM2 = \frac{I}{DT + S} = \frac{(0,25 * 0,78)}{0,2004 + 0,0888 + ((0,25 * 0,22) - (0,1304 * 0,29))} = 0,64$$

$$XM2 = \frac{S}{DT + S} = \frac{(0,25 * 0,22) - (0,1304 * 0,29)}{0,2004 + 0,0888 + ((0,25 * 0,22) - (0,1304 * 0,29))} = 0,06$$

De la gráfica se tiene los siguientes datos:

$$E2: Y2=0,13$$

$$R2: X2=0,13, N2=1,7$$

Calculando "R2":

$$R2 = \frac{(0,25 * 0,78) * (1 + 1,7)}{1,7} = \mathbf{0,30}$$

Calculando "E2":

$$E2 = 0,32 + 0,2004 - 0,30 = \mathbf{0,2204}$$

Disolución retenida:

$$Dr2 = (0,30 - (0,25 * 0,78)) * (1 - 0,13) = 0,0914$$

Cálculo de las coordenadas del polo:

$$F - E1 = Rn - D = \text{POLO}$$

Ecuación 16

En función al soluto:

$$P(\text{XP})\text{S} = F(\text{XF})\text{S} - E1(\text{Y1})\text{S}$$

Ecuación 17

$$(\text{XP})\text{S} = \frac{F(\text{XF})\text{S} - E1(\text{Y1})\text{S}}{P} = \frac{((0,25 * 0,22) - (0,1304 * 0,29))}{(0,25 - 0,1304)} = \mathbf{0,14}$$

En función al disolvente:

$$P(\text{XP})\text{D} = Rn(\text{Xn})\text{D} - D(\text{YD})\text{D}$$

Ecuación 18

$$(\text{XP})\text{D} = \frac{Rn(\text{Xn})\text{D} - D(\text{YD})\text{D}}{P} = \frac{((0,30 * 0,13) - (0,2004 * 1))}{(0,30 - 0,2004)} = \mathbf{-1,62}$$

Para el rendimiento del colorante natural extraído se tiene:

Extracto total:

$$ET = E1 + E2$$

Ecuación 19

$$ET = 0,1304 + 0,2204 = 0,3508$$

Composición global:

$$Y\text{T} = \frac{E1 * y1 + E2 * y2}{E1 + E2}$$

Ecuación 20

$$Y\text{T} = \frac{(0,1304 * 0,29) + (0,2204 * 0,13)}{0,3508} = 0,1$$

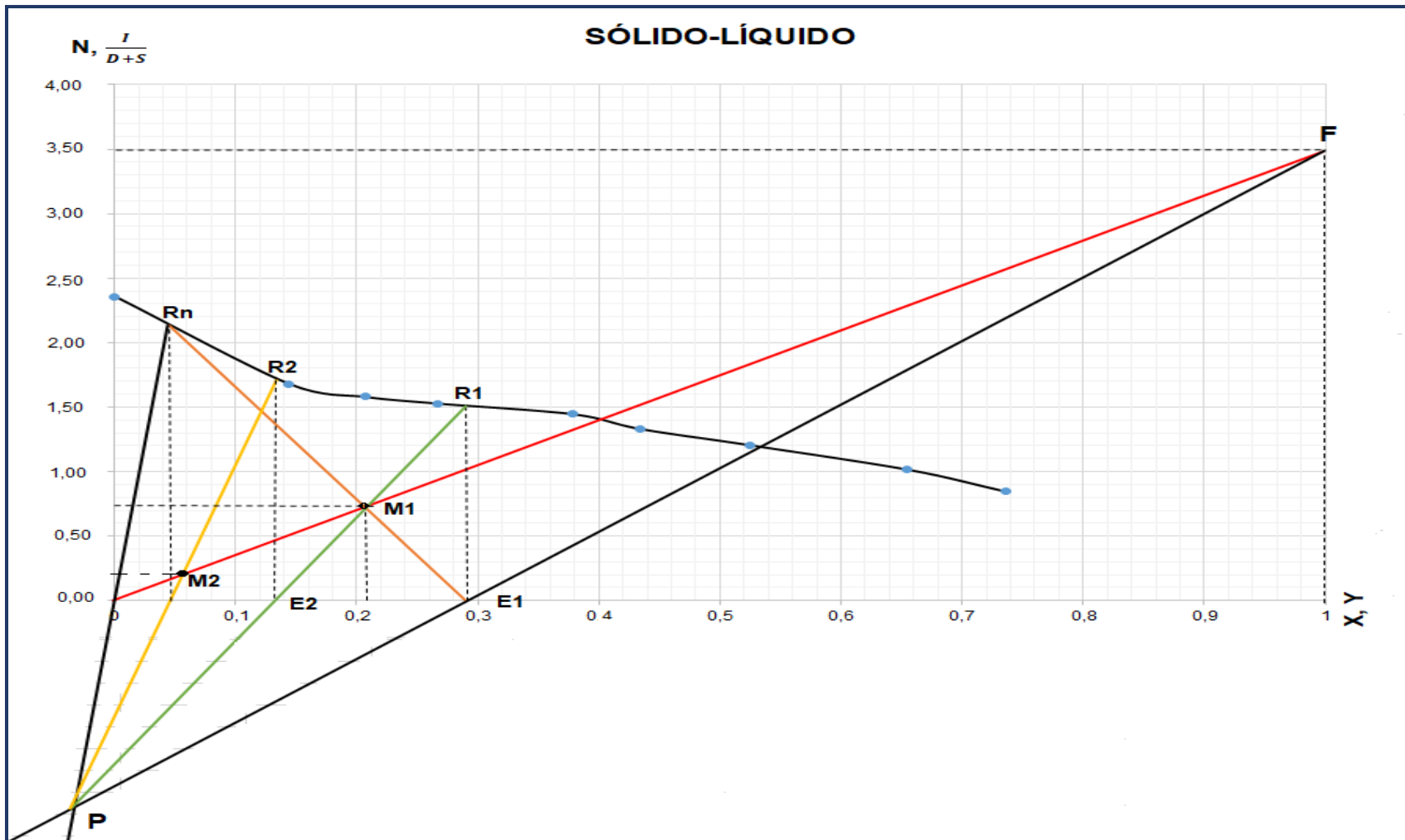
El rendimiento teórico de colorante natural extraído es:

$$\% \text{ Colorante extraído} = \frac{ET * YT}{F * XF} * 100$$

$$\% \text{ Colorante extraído} = \frac{(0,3508 * 0,1)}{(0,25 * 0,22)} * 100$$

% Colorante extraído = 63,78

La siguiente representación gráfica del diagrama rectangular indica el camino a seguir en la determinación del número de etapas teóricas en contracorriente para la operación solido-liquido.



FUENTE PROPIA.

Diagrama 4. Representación gráfica en diagrama rectangular sólido-líquido.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

El trabajo desarrollado mediante la técnica de extracción sólido-líquido se obtuvo un rendimiento práctico de 47,4% y un rendimiento teórico de 63,78% de colorante natural extraído de uva silvestre (*Cissus verticillata*), también se obtuvo el número de etapas teóricas igual a 3. La diferencia entre rendimiento teórico y práctico se debe a factores que son propios en el trabajo experimental como ser: fallas y desgaste en equipos-materiales, rendimiento en materia prima y variables del proceso.

Tabla 26. Comparación de resultados de rendimiento práctico y teórico.

EXTRACCIÓN SÓLIDO - LÍQUIDO UVA SILVESTRE	
Rendimiento práctico	Rendimiento teórico
47,4%	63,78%

FUENTE PROPIA.

4.5 ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DEL COLORANTE OBTENIDO APLICADO AL YOGURT NATURAL CON MUESTRAS REFERENTES A UN COLORANTE COMERCIAL Y OTRO ARTIFICIAL

4.5.1 Determinación de pH en el yogurt

Tabla 27. Resultados de la variación de pH en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C.

TRATAMIENTO	METODO DE ANÁLISIS	($\bar{x} \pm \alpha$)	GRADO DE ACEPTACIÓN	CONCLUSIÓN
T0	pH	4,61 ± 0,02	Máximo 4,6	NC
T1		4,6 ± 0,01		C
T2		4,6 ± 0,01		C
T3		4,6 ± 0,01	IBNORCA NB-33016	C
TCN		4,6 ± 0,01		C
TCA		4,4 ± 0,2		NC

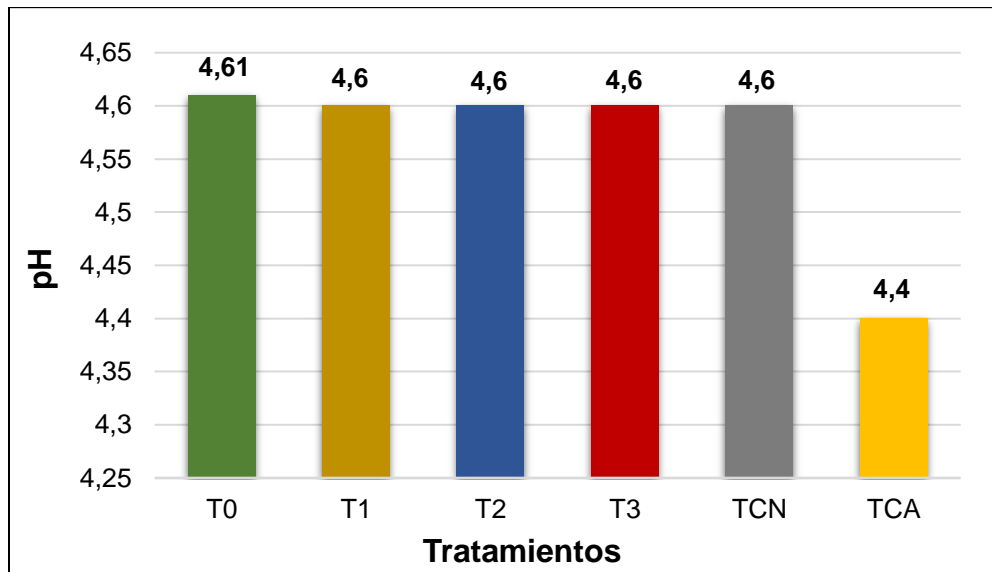
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA) PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)







FUENTE PROPIA.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Gráfica 4. Comparación de valores de pH en el yogurt de los distintos tratamientos.



T0	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 0%	
T1	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 5,7%	
T2	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 6,5%	
T3	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 7,4%	
TCN	Yogur coloreado con colorante natural (Carmín de cochinilla)	
TCA	Yogur coloreado con colorante artificial (rojo allura)	

FUENTE PROPIA.

La Norma Boliviana NB-33016, elaborada por IBNORCA, señala que el yogurt de calidad intachable, deberá presentar un pH de 4.6.

En la Gráfica 4, se puede apreciar la diferencia entre los valores de pH en el yogurt, el tratamiento T0 presenta un pH de 4,61 indicando que está por encima de la norma establecida por IBNORCA, el tratamiento TCA se encuentra por debajo de lo establecido

por esta norma con un pH de 4,4, los restantes tratamientos T1, T2, T3 y TCN fueron los que obtuvieron un pH de 4,6 señalando que el yogurt es de calidad.

De manera general revelan que el pH tiende a decrecer durante el almacenamiento. La disminución en el pH se debe a que las bacterias ácido lácticas continúan su actividad metabólica, a pesar de que la temperatura de almacenamiento es baja (< 5°C) produciendo ácido láctico, lo que provoca que el medio se acidifique y baje el pH.

4.5.2 Determinación de Acidez Titulable en el yogurt

Para realizar los cálculos del porcentaje de ácido láctico inicialmente debemos estandarizar la solución de hidróxido de sodio.

- Preparación de NaOH 0.1N.

$$0,5 \text{ L} * \frac{0,1 \text{ eq} - \text{g NaOH}}{1 \text{ L}} * \frac{1 \text{ mol NaOH}}{1 \text{ eq} - \text{g NaOH}} * \frac{40 \text{ g NaOH}}{1 \text{ mol NaOH}} = 2 \text{ g NaOH}$$

Reacción del biftalato ácido de potasio (KHP) y el hidróxido de sodio (NaOH):



- Concentración real de NaOH 0,1N:

$$N = \frac{0,004 \text{ Eq} - \text{g NaOH}}{38,67 \text{ ml}} * \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 0,1034 \text{ N NaOH}$$

Tabla 28. Resultados de la variación del porcentaje de acidez titulable en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C.

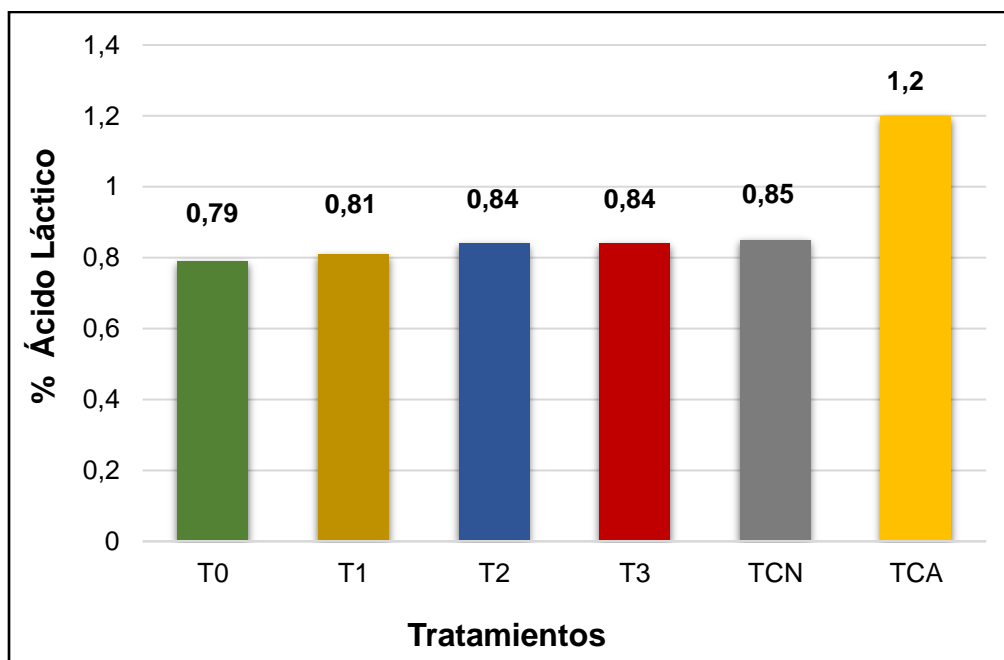
TRATAMIENTO	METODO DE ANÁLISIS	($\bar{x} \pm \alpha$)	GRADO DE ACEPTACIÓN	CONCLUSIÓN
T0	ACIDEZ TITULABLE	0,79 ± 0,01	Mínimo	C
T1		0,81 ± 0,02	0,5 %	C
T2		0,84 ± 0,01	Máximo	C
T3		0,84 ± 0,01	1,5 %	C
TCN		0,85 ± 0,01	IBNORCA	C
TCA		1,2 ± 0,14	NB-33016	C







FUENTE PROPIA.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Gráfica 5. Comparación de valores del porcentaje de acidez titulable en el yogurt de los distintos tratamientos.



T0	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 0%	
T1	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 5,7%	
T2	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 6,5%	
T3	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 7,4%	
TCN	Yogur coloreado con colorante natural (Carmín de cochinilla)	
TCA	Yogur coloreado con colorante artificial (rojo allura)	

FUENTE PROPIA.

La acidez de un yogurt debe oscilar entre 0,5 a 1,5 por ciento de ácido láctico, esto establecido por la norma NB-33016 del Instituto Boliviano de Normas de Calidad para la elaboración de un yogurt de calidad.

La Gráfica 5, nos indica que los tratamientos T0, T1, T2, T3, TCN y TCA son considerados aceptables ya que se hallan dentro del rango establecido por la norma IBNORCA. La producción de ácido láctico es importante para obtener un yogurt de alta calidad, con sabor propio, cuerpo y textura. El yogurt a un inicio no se encuentra tan ácido como al final del periodo de almacenamiento, sin embargo, conforme transcurrió el tiempo los sistemas se van acidificando más.

4.5.3 Determinación de los grados brix (°Brix) en el yogurt

Tabla 29. Resultados de la variación de los grados brix (° Brix) en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C.

TRATAMIENTO	METODO DE ANÁLISIS	($\bar{x} \pm \alpha$)	GRADO DE ACEPTACIÓN	CONCLUSIÓN
T0	REFRACTÓMETRO	8,2 ± 0,1	Mínimo	C
T1		8,2 ± 0,1	8,2	C
T2		8,2 ± 0,1		C
T3		8,2 ± 0,1	IBNORCA	C
TCN		8,21 ± 0,02	NB-33016	NC

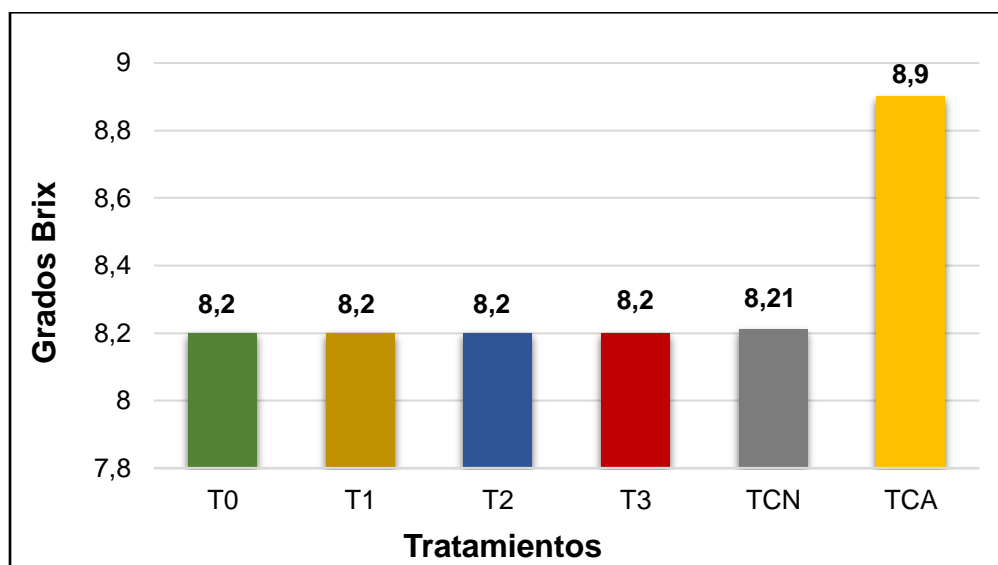
TCA		8,9 ± 0,06		NC
-----	--	------------	--	----







FUENTE PROPIA.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Gráfica 6. Comparación de valores de los grados brix (° Brix) en el yogurt de los distintos tratamientos.



T0	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 0%	
T1	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 5,7%	
T2	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 6,5%	
T3	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 7,4%	
TCN	Yogur coloreado con colorante natural (Carmín de cochinilla)	
TCA	Yogur coloreado con colorante artificial (rojo allura)	

FUENTE PROPIA.

IBNORCA establece rangos de 8.2 % como mínimo de grados brix (°Brix) para que el yogurt sea de buena calidad.

En la Gráfica 6, se puede observar que los tratamientos T0, T1, T2 y T3 se encuentran dentro del rango establecido por IBNORCA, en comparación a los tratamientos TCN y TCA presentan mayor contenido de ($^{\circ}\text{Brix}$) de 8,21 y 8,9 respectivamente. Esto nos indica que según la norma ninguno de los últimos tratamientos es adecuado para la elaboración de un yogurt de calidad por lo que se encuentran por encima de las normas establecidas por IBNORCA.

4.6 Análisis microbiológico en el yogurt

4.6.1 Recuento de Coliformes totales, Escherichia coli, Mohos y Levaduras

Tabla 30. Resultados del análisis microbiológico en el yogurt en los distintos tratamientos.

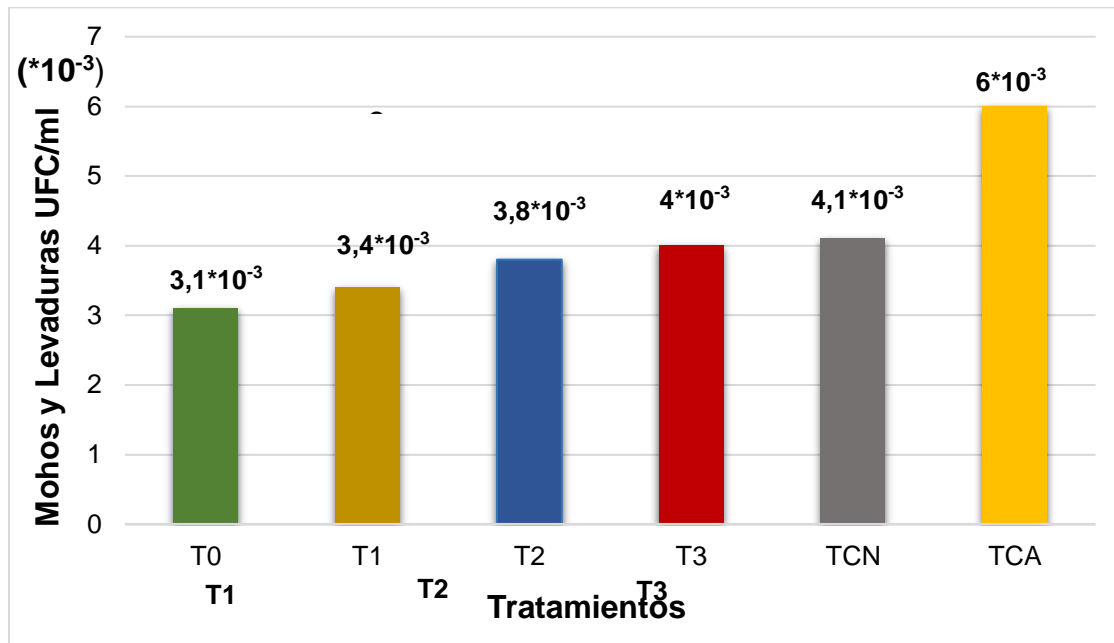
TRATAMIENTOS	PARÁMETROS			CONCLUSIÓN
	Coliformes totales UFC/ml	Escherichia coli UFC/ml	Mohos y Levaduras UFC/ml	
T0	-	-	$3,1 \cdot 10^{-3}$	C
T1	-	-	$3,4 \cdot 10^{-3}$	C
T2	-	-	$3,8 \cdot 10^{-3}$	C
T3	-	-	$4 \cdot 10^{-3}$	C
TCN	-	-	$4,1 \cdot 10^{-3}$	C
TCA	-	-	$6 \cdot 10^{-3}$	C







FUENTE PROPIA.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Gráfica 7. Comparación de valores de Mohos y Levaduras en el yogurt de los distintos tratamientos.



T0	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 0%	
T1	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 5,7%	
T2	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 6,5%	
T3	Yogurt coloreado con colorante de uva silvestre al 7,4%	
TCN	Yogur coloreado con colorante natural (Carmín de cochinilla)	
TCA	Yogur coloreado con colorante artificial (rojo allura)	

FUENTE PROPIA.

En los diferentes tratamientos que se sometieron al análisis microbiológico se pudo observar resultados negativos en Coliformes totales y Escherichia coli, es decir que no hay presencia de Coliformes totales y Escherichia coli.

En el tratamiento T0 se tiene ($3,1 \times 10^{-3}$), T1 ($3,4 \times 10^{-3}$), T2 ($3,8 \times 10^{-3}$), T3 ($4,0 \times 10^{-3}$), TCN ($4,1 \times 10^{-3}$) y TCA (6×10^{-3}) UFC/ml de mohos y levaduras, indicado que todos los tratamientos se encuentran dentro de los parámetros establecido por IBNORCA.

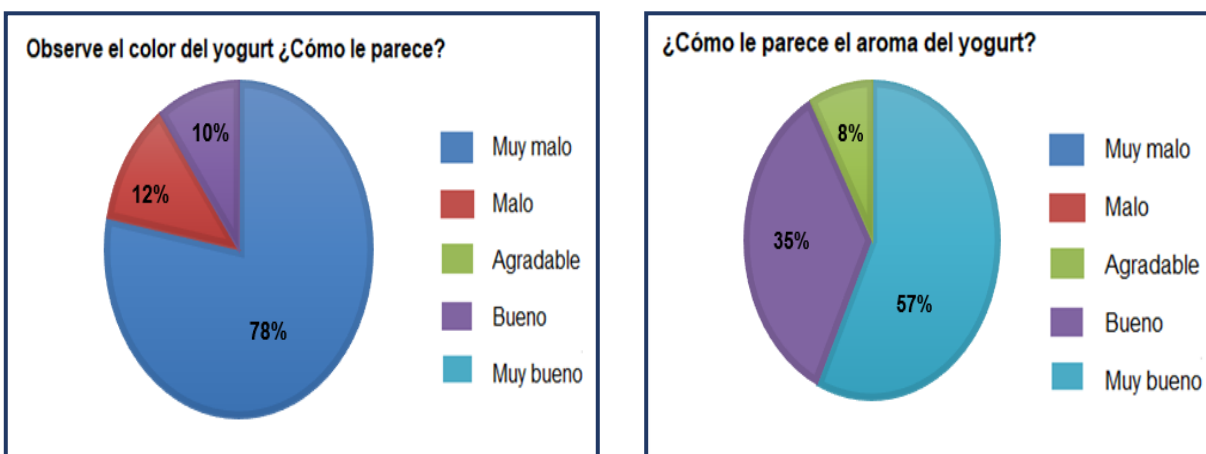
4.7 ANÁLISIS SENSORIAL DEL YOGURT

Se realizaron las pruebas sensoriales de color en el yogurt con adición del colorante de uva silvestre en los distintos tratamientos con denominación T1, T2 y T3, para así compararlo frente a un yogurt comercial de frutilla y un yogurt con colorante artificial que también fueron sometidos a esta prueba sensorial. Este análisis y comparación fue efectuada para comparar la tonalidad de color.

Los consumidores del panel de degustación fueron estudiantes de la carrera de Química Industrial de la Universidad Mayor de San Andrés. Los resultados se dividieron en dos, de acuerdo con la naturaleza de las preguntas. Se tuvo una calificación de atributos, como se observa en los gráficos siguientes:

- Análisis sensoria día 1.

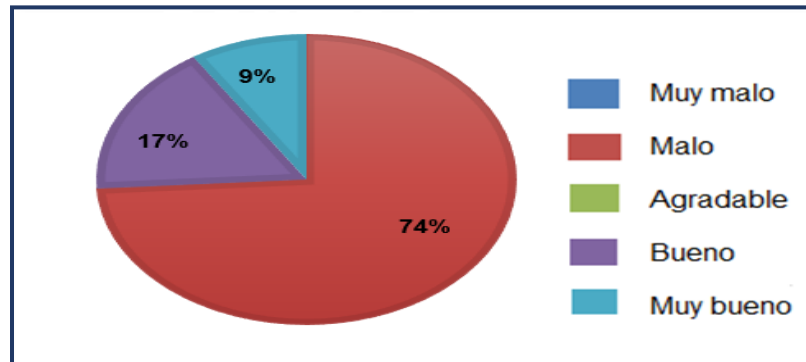
➤ Tratamiento T1



FUENTE PROPIA.

Gráfica 8. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T1.

La otra pregunta al día 1 que se realizó en el panel fue una calificación global.

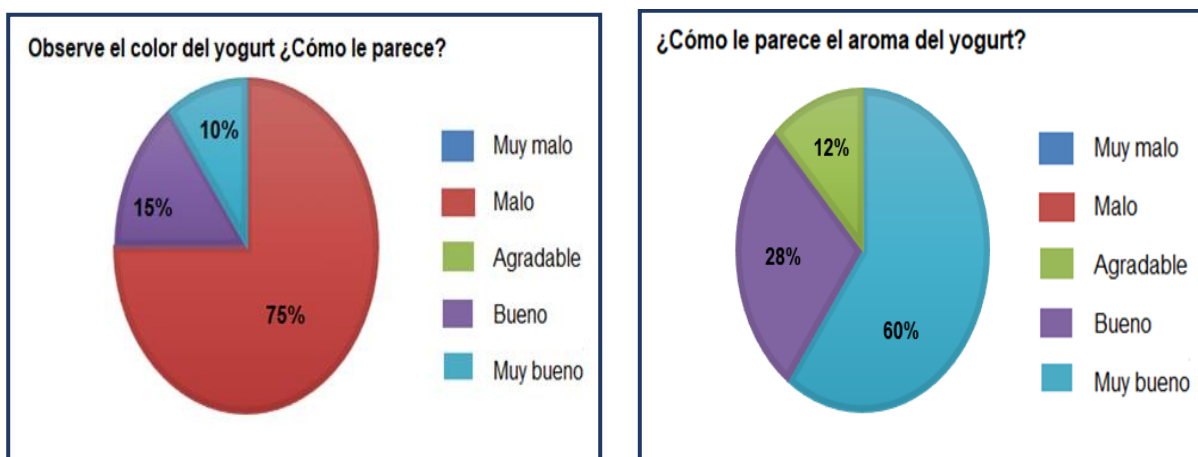


FUENTE PROPIA.

Gráfica 9. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T1.

En la Gráfica 9, se observa que el 26% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, y el 74% lo catalogan como “malo”. Esto representa mala aceptación del yogurt.

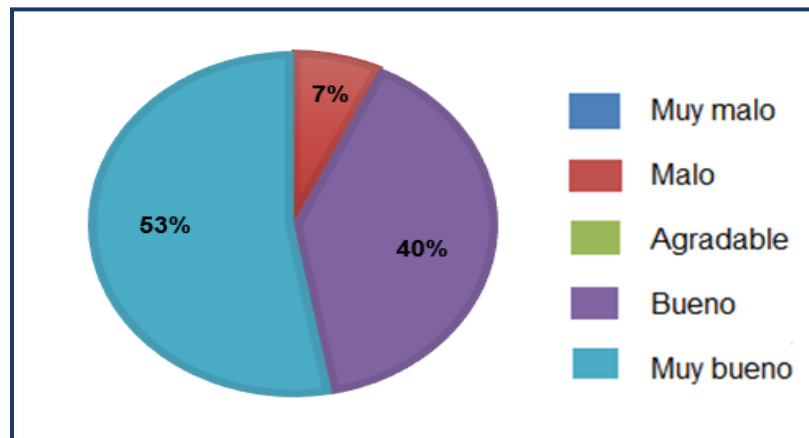
➤ Tratamiento T2



FUENTE PROPIA.

Gráfica 10. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T2.

La otra pregunta al día 1 que se realizó en el panel fue una calificación global.

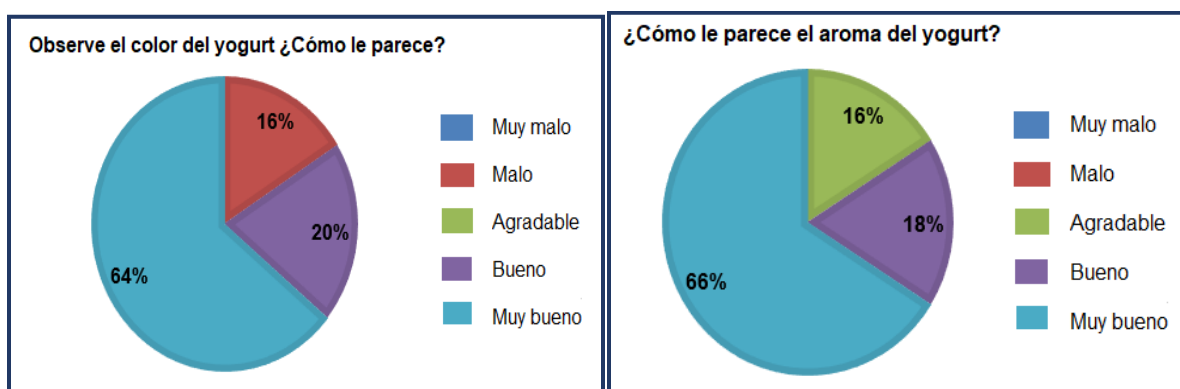


FUENTE PROPIA.

Gráfica 11. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T2.

En la Gráfica 11, se observa que el 93% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, y el 7% lo catalogan como “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

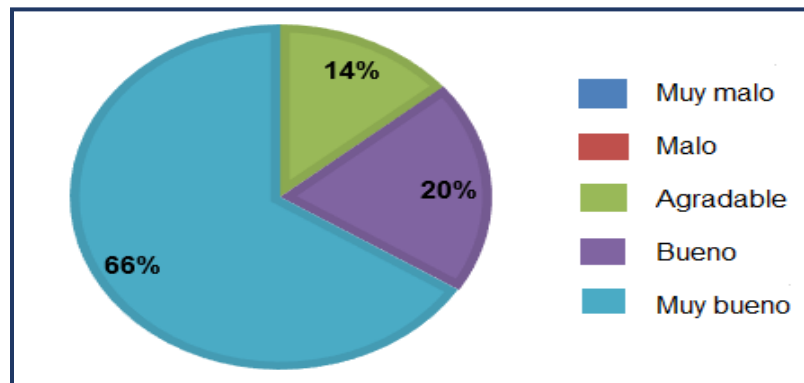
➤ Tratamiento T3



FUENTE PROPIA.

Gráfica 12. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación T3.

La otra pregunta al día 1 que se realizó en el panel fue una calificación global.

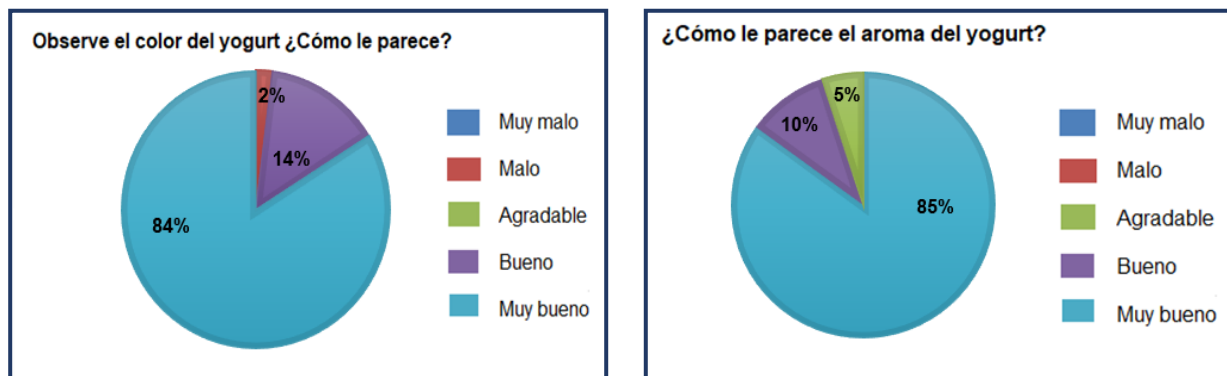


FUENTE PROPIA.

Gráfica 13. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación T3.

En la Gráfica 13, se observa que el 86% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, solamente el 14% lo encuentra como “regular” y ninguno lo cataloga “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

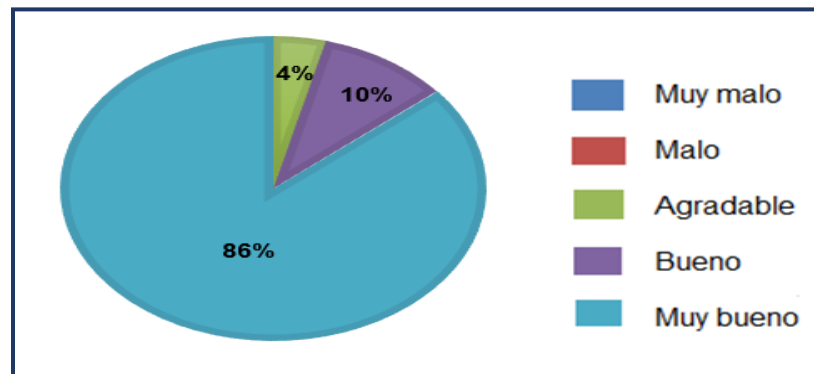
➤ Tratamiento TCN



FUENTE PROPIA.

Gráfica 14. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación TCN.

La otra pregunta al día 1 que se realizó en el panel fue una calificación global.

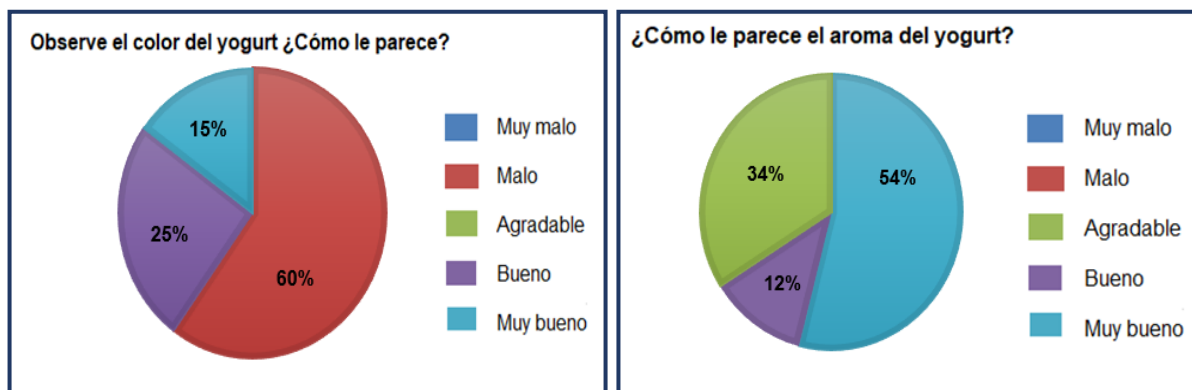


FUENTE PROPIA.

Gráfica 15. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación TCN.

En la Gráfica 15, se observa que el 96% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, solamente el 4% lo encuentra como “regular” y ninguno lo cataloga “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

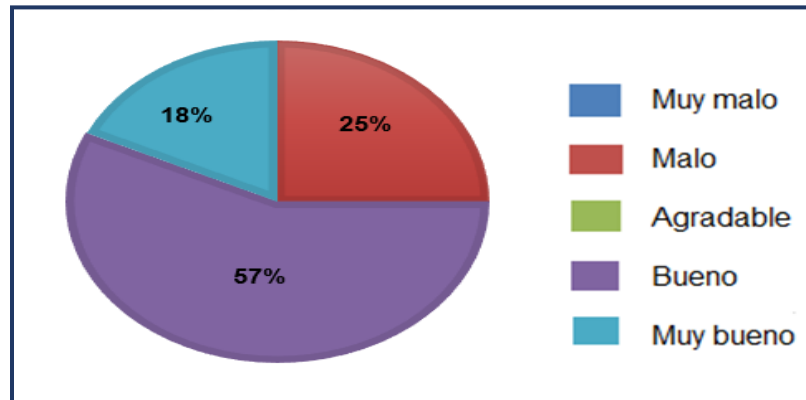
➤ Tratamiento TCA



FUENTE PROPIA.

Gráfica 16. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 1 para el tratamiento con denominación TCA.

La otra pregunta al día 1 que se realizó en el panel fue una calificación global.



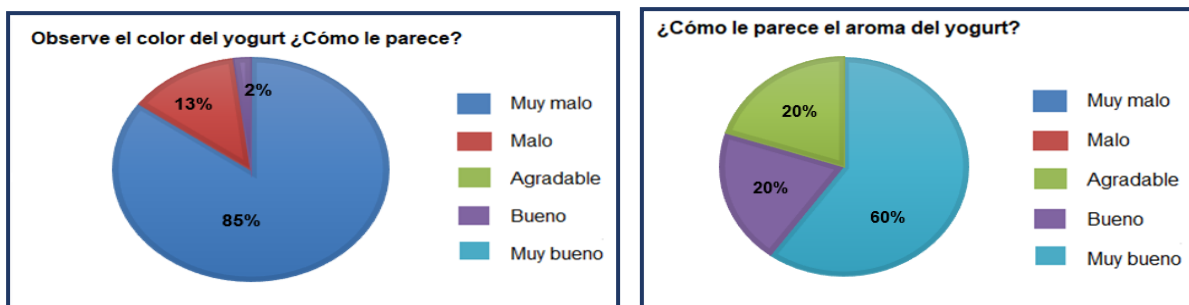
FUENTE PROPIA.

Gráfica 17. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 1 para el tratamiento con denominación TCA.

En la Gráfica 17, se observa que el 75% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, y el 25% lo catalogan como “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

- Análisis sensorial día 30.

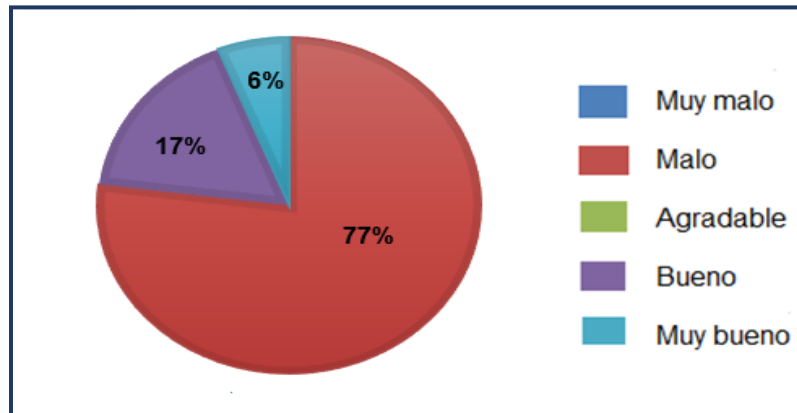
➤ Tratamiento T1



FUENTE PROPIA.

Gráfica 18. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T1.

La otra pregunta al día 30 que se realizó en el panel fue una calificación global.

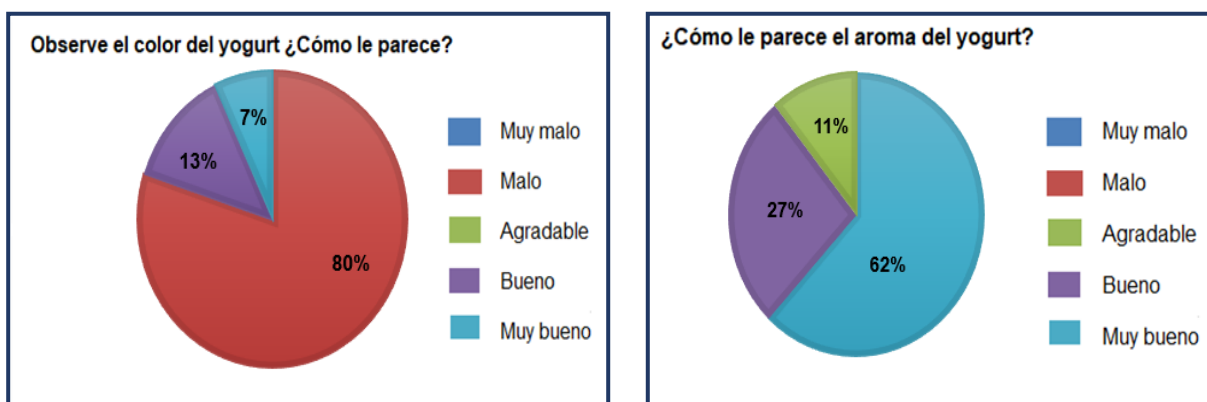


FUENTE PROPIA.

Gráfica 19. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T1.

En la Gráfica 19, se observa que el 23% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, y el 77% lo catalogan como “malo”. Esto representa una baja aceptación del yogurt.

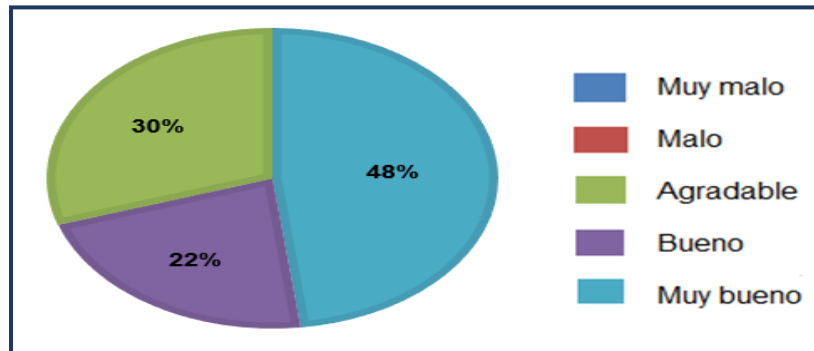
➤ Tratamiento T2



FUENTE PROPIA.

Gráfica 20. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T2.

La otra pregunta al día 30 que se realizó en el panel fue una calificación global.

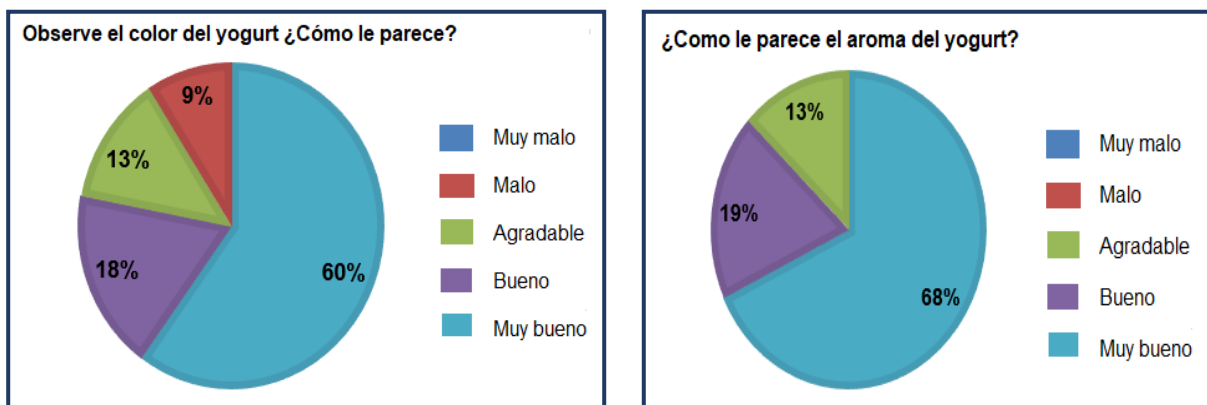


FUENTE PROPIA.

Gráfica 21. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T2.

En la Gráfica 21, se observa que el 70% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, solamente el 30% lo encuentra como “regular” y ninguno lo cataloga “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

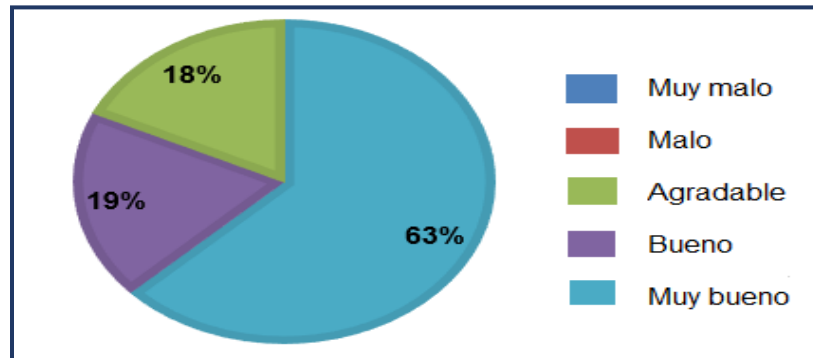
➤ Tratamiento T3



FUENTE PROPIA.

Gráfica 22. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación T3.

La otra pregunta al día 30 que se realizó en el panel fue una calificación global.

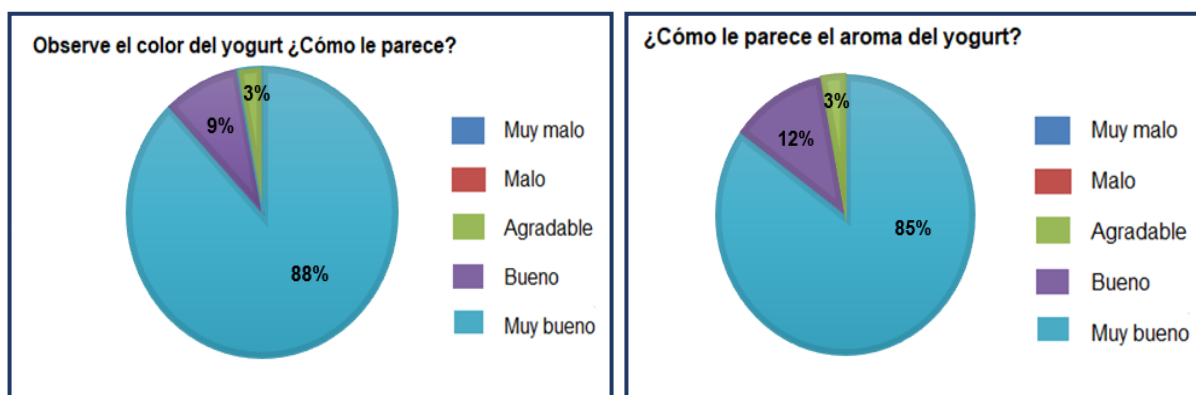


FUENTE PROPIA.

Gráfica 23. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación T3.

En la Gráfica 23, se observa que el 82% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, solamente el 18% lo encuentra como “regular” y ninguno lo cataloga “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

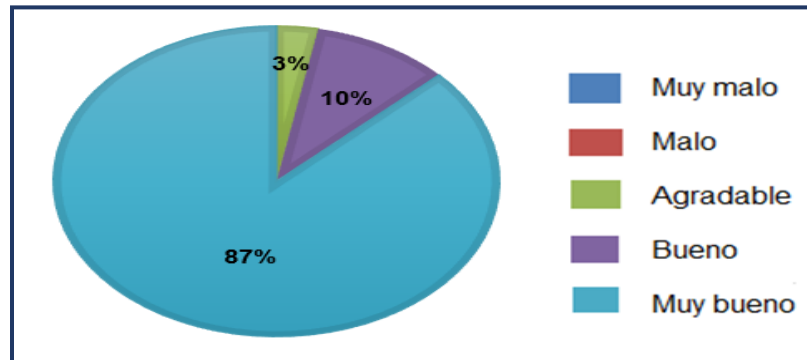
➤ Tratamiento TCN



FUENTE PROPIA.

Gráfica 24. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación TCN.

La otra pregunta al día 30 que se realizó en el panel fue una calificación global.

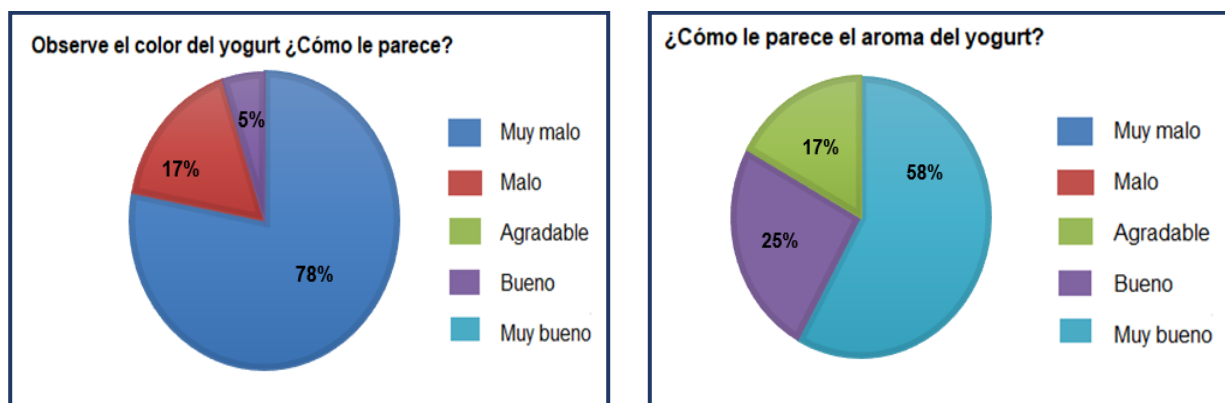


FUENTE PROPIA.

Gráfica 25. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación TCN.

En la Gráfica 25, se observa que el 97% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, solamente el 3% lo encuentra como “regular” y ninguno lo cataloga “malo”. Esto representa una aceptación alta del yogurt.

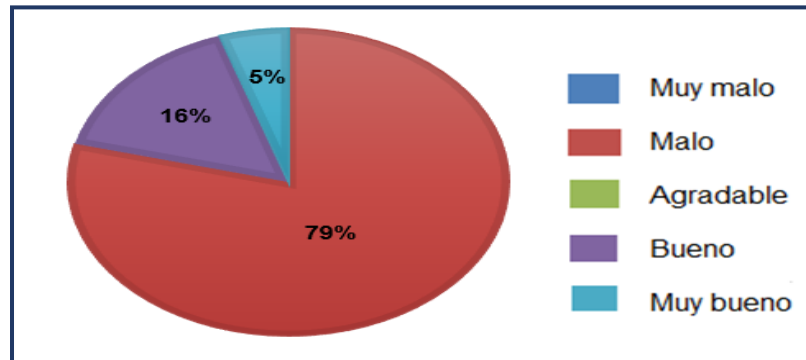
➤ Tratamiento TCA



FUENTE PROPIA.

Gráfica 26. Resultado de las encuestas del análisis sensorial día 30 para el tratamiento con denominación TCA.

La otra pregunta al día 30 que se realizó en el panel fue una calificación global.



FUENTE PROPIA.

Gráfica 27. Prueba de los entrevistados. Calificación global día 30 para el tratamiento con denominación TCA.

En la Gráfica 27, se observa que el 21% de los encuestados califican el producto como “Bueno” o “muy bueno”, y el 79% lo catalogan como “malo”. Esto representa una baja aceptación del yogurt.

En las gráficas al día 1 como al día 30 los consumidores convocados para el panel de degustación califican a los parámetros organolépticos según las normas establecidas por IBNORCA (NB-320016).

En los resultados del análisis sensorial podemos observar una aceptación del color en el yogurt, esto en los tratamientos con denominación “T2” y “T3” mientras que el tratamiento con denominación “T1” tuvo una aceptación muy baja. Al día 30 la calificación es menor a comparación del día 1 ya que el yogurt coloreado con colorante natural de uva silvestre sufrió una mínima decoloración, esto por la variación de acidez que experimenta el yogurt almacenado durante 30 días a 5 °C, las antocianinas son más estables en medios ácidos, libres de oxígeno bajo condiciones frías y en oscuridad. El yogurt coloreado con colorante natural carmín de cochinilla tratamiento con denominación “TCN” no sufrió decoloración durante el tiempo de almacenamiento, pero cabe recalcar que en comparación con el yogurt coloreado con el colorante obtenido de uva silvestre presenta mayor intensidad

de color rosado-rojizo. El análisis sensorial del yogurt coloreado con colorante artificial rojo allura tratamiento con denominación "TCA" sufrió durante el tiempo de almacenamiento una decoloración de rosado intenso a gris, al ser un colorante artificial en cuanto el yogurt se va acidificando y subiendo el porcentaje de ácido láctico el colorante tiende a no ser estable y por ende se decolora.

Luego de realizar la comparación de los valores y/o resultados del análisis de pH, Acidez, Grados Brix, análisis microbiológico y análisis sensorial (preferencia de los consumidores según el factor color) entre los diferentes tratamientos con denominación T0, T1, T2, T3, TCA y TCN, se escogió al mejor en los resultados de los análisis ya mencionados.

Los tratamientos T1, T2 y T3 son de nuestro interés al tener el colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*), el tratamiento con denominación "T3" (Yogurt con adición del colorante natural de uva silvestre al 7,4 %) es el que presenta mejores resultados en cada uno de los análisis, por otro lado, también presenta un buen color desde el día 1 al día 30, seguido del tratamiento "T2" (Yogurt con adición del colorante natural de uva silvestre al 6,5%), y el tratamiento con menor puntuación es el tratamiento "T1" (Yogurt con adición del colorante natural de uva silvestre al 5,7%).

CAPÍTULO V

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

5.1 ANÁLISIS PRELIMINAR DE COSTOS

Toda empresa o inversionista espera conocer ciertos procesos de contabilización de costos, ya que este factor es de mucha importancia para el empresario como para el inversionista.

Para realizar el costo de producción del colorante natural obtenido se tomaron en cuenta los siguientes puntos:

- **Costos variables:** Son los que varían en proporción directa con el volumen de producción.
- **Costos fijos:** Se consideran a los egresos que no sufren cambio cualquiera que sea el volumen de producción.
- **Costo total:** Es la sumatoria del costo fijo y el costo variable.

$$[\text{Costo Total}] = [\text{Costo Fijo}] + [\text{Costo Variable}]$$

Ecuación 21

- **Ingreso:** Es el incremento de los recursos económicos netamente provenientes de la actividad comercial de una persona, empresa o un sistema contable, y que constituye un aumento del patrimonio neto de los mismos.

- **Punto de equilibrio:** Define el nivel de ventas en donde los costos fijos y los costos variables se cubren. Esto quiere decir que, aunque no gana dinero tampoco pierde su objetivo principal es, cubrir los costos y que sus ventas aumenten, de esta forma cualquier empresa al utilizar bien este punto se puede ubicar por encima de él y obtener beneficios positivos en sentido económico.

5.2 CONSIDERACIONES PREVIAS

Se determina el costo de producción del colorante natural de uva silvestre (*Cissus verticillata*), sobre una base de 250 gramos de muestra y 1250 ml de solvente (alcohol etílico), teniendo como producto final 547 ml de colorante concentrado.

En el rubro de activos fijos, no se toman en cuenta para los cálculos ciertos activos como terreno, edificaciones e instalaciones, ya que, lo que se busca es determinar el costo de producción del colorante extraído. Debido a las condiciones de trabajo, este estudio permite estimar el costo a nivel de laboratorio y sólo proporciona una idea aproximada de lo que cuesta extraer el colorante.

Tabla 31. Costos variables (expresado en Bs).

COSTOS VARIABLES				
	COSTO UNITARIO	CANTIDAD NECESARIA POR DÍA	CANTIDAD NECESARIA POR MES	INVERSIÓN TOTAL
MATERIA PRIMA				
Uva silvestre (<i>Cissus verticillata</i>).	1Kg ----- 24Bs	120Kg/día ----- 2880Bs	3120Kg/mes----74880Bs	74880
REACTIVOS				
- Alcohol etílico 96°.	1L ----- 14Bs	600L/día ----- 8400Bs	15600L/mes----218400Bs	218400
INSUMOS				
- Envase de vidrio ámbar.	1Unidad (10L) ----- 15Bs	14Unidad/día ----- 210Bs	344Unidad/mes-----5160Bs	5160
- Envase de vidrio ámbar para la venta del colorante.	1Unidad (100ml) --- 2,50Bs	1320Unidad/día---3300Bs	34320Unidad/mes ----- 85800Bs	85800
TOTAL				384,240

FUENTE PROPIA.

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)**

Tabla 32. Costos fijos (expresado en Bs).

COSTOS FIJOS		
SERVICIO	CONSUMO MENSUAL	INVERSIÓN TOTAL
- Agua*.	180 m ³ ----- 787,8Bs	787,8
- Energía eléctrica**.	2238,2 KW/h ----- 863,2Bs	863,2
TOTAL		1651

FUENTE PROPIA.

* EPSAS.

** ENDE ANDINA.

Tabla 33. Costo total de producción del colorante natural de uva silvestre (expresado en Bs).

COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	
[Bs/mes]	
Costo Variable	384,240
Costo Fijo	1651
TOTAL	385,891 Bs/mes

FUENTE PROPIA.

Datos a considerar:

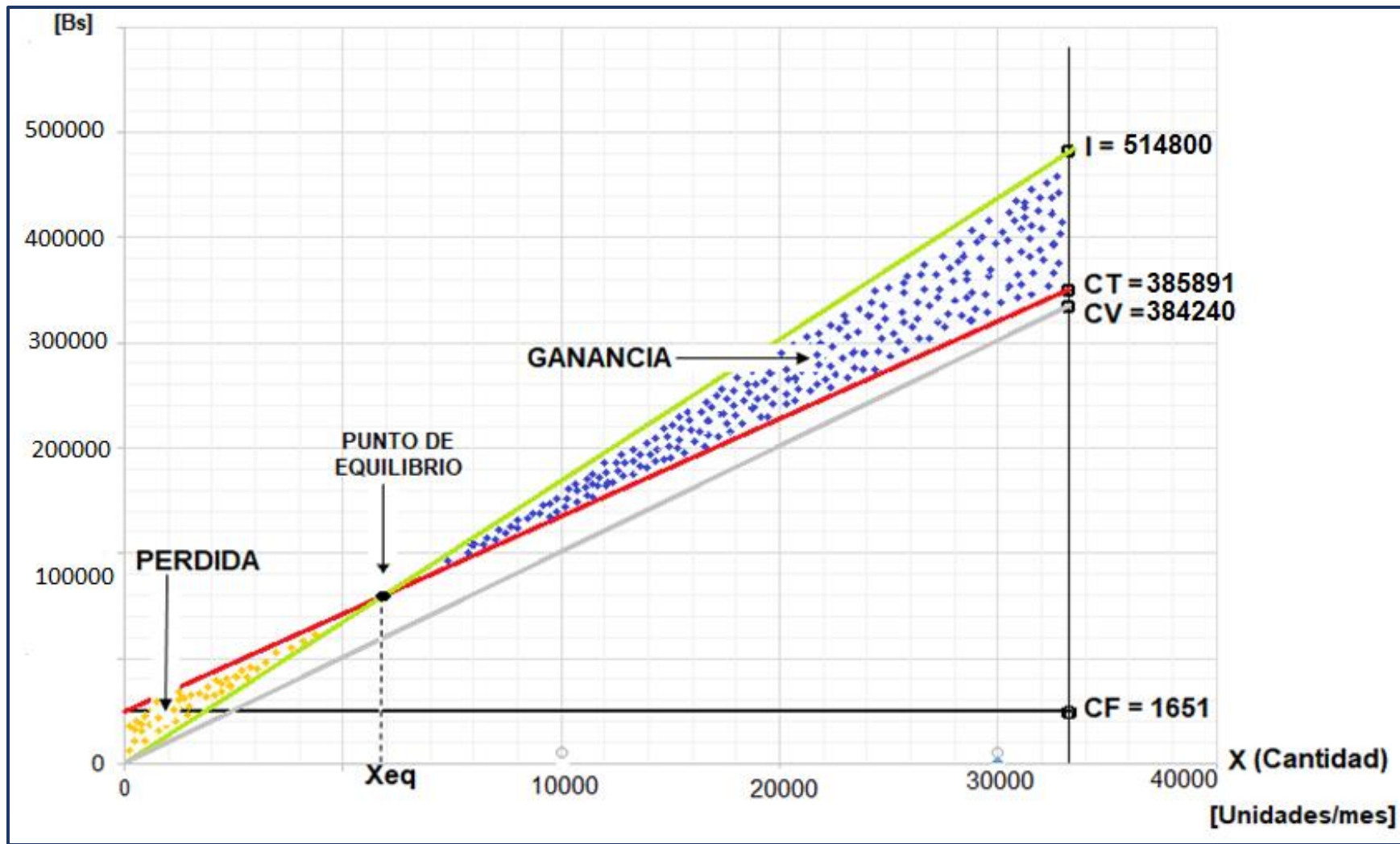
- Cantidad a producirse al mes: 3432000 ml
- Precio real: 11.24 Bs
- Utilidad: 30%

$$\text{Precio de venta} = \text{precio real} + (\text{precio real} * \text{utilidad})$$

$$\text{Precio de venta} = 11.24 + (11.24 * 0,30)$$

$$\text{Precio de venta} = 14.612 \text{ Bs}$$

Precio de venta ≈ 15 Bs



FUENTE PROPIA.

Gráfica 28. Determinación del punto de equilibrio.

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA UVA SILVESTRE (CISSUS VERTICILLATA)
PARA SU APLICACIÓN COMO COLORANTE NATURAL EN DERIVADOS LACTEOS (YOGURT)

5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE COSTOS

Se establece un costo total de producción de 385,891 Bs/mes para 34320 unidades/mes y un precio para la venta de 14.612 Bs/unidad con un margen de utilidad del 30%.

El punto de equilibrio, bajo las condiciones de trabajo ensayadas, muestra que se consigue alcanzar utilidades en la extracción del colorante. Por lo que se tiene más ganancia que pérdida.

✓ **Ganancia:** $I > CT$

$$514800 > 385891$$

✓ **Perdida:** $CT > I$

$$385891 > 514800$$

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES

- Para la obtención del colorante natural de uva silvestre, se determinó que el método más adecuado es el soxhlet por su rapidez, el empleo de bajas temperaturas y por la completa extracción del colorante. También se pudo determinar y optimizar los parámetros de funcionamiento del equipo Soxhlet los cuales son de importancia ya que nos permitirán realizar los respectivos cálculos.
- Mediante pruebas de identificación cualitativa se confirmó la presencia de Antocianinas, Flavonoles, Flavonas y Flavonoles en el extracto no concentrado de uva silvestre.
- Las antocianinas se cuantificaron por espectrofotometría UV-Visible en los extractos obtenidos de la uva silvestre (*Cissus verticillata*), donde la antocianina predominante es la cianidina-3-glucosido. Cabe recalcar que se identificó al mejor solvente, es decir al que extrajo más cantidad de antocianinas el cual fue el alcohol etílico y no así el alcohol etílico acidificado y el agua destilada, debido a este análisis se pudo determinar y comparar las concentraciones de antocianinas en cada prueba, estableciendo para nuestro estudio la concentración a considerar: 413,6314 mg/L.
- Tras el análisis de los resultados obtenidos de este trabajo se determinó los niveles aceptables de colorante en el yogurt de los tratamientos que se establecieron. Se determinó que la dosificación ideal es 8 ml de colorante natural (7,4%) en 100 ml de yogurt.

- Se determino la estabilidad del colorante natural de uva silvestre mediante pruebas fisicoquímicas, considerando parámetros como ser: pH, Acidez Titulable, Grados Brix y Análisis microbiológico después de la adición al yogurt natural.
- La vida útil del yogurt con dosis de colorante natural de uva silvestre (*Cissus verticillata*), fue de 30 días, tiempo en el que conservó las características para ser consumido.
- Se desarrollo un trabajo de comparación mediante pruebas fisicoquímicas, considerando parámetros como ser: pH, Acidez Titulable, Grados Brix, Análisis microbiológico y Análisis sensorial con el producto obtenido y muestras que están en el mercado interno que contienen colorante artificial y natural. Por lo que concluimos que el colorante natural de uva silvestre (*Cissus verticillata*) aplicado al yogurt posee una estabilidad de color durante un tiempo considerable de almacenamiento, lo cual es una alternativa aceptable para utilizarlo en derivados lácteos a nivel industrial.

CAPÍTULO VII

7. RECOMENDACIONES

- Las muestras deben ser recolectadas con algún tiempo de anticipación previa a la extracción ya que esta es la materia prima esencial para este proceso y es necesario tener la cantidad suficiente para que el proceso sea continuo.
- Buscar mecanismos o alternativas de cosecha para la uva silvestre, por ser muy delicadas y se degradan en un corto tiempo, imposibilita a tener resultados óptimos.
- Realizar investigaciones similares, para determinar en que otro alimento se puede utilizar el colorante natural de uva silvestre (*Cissus verticillata*).
- Hacer uso de la planta de uva silvestre (*Cissus verticillata*) aprovechando las propiedades medicinales que presenta.
- Es recomendable evaluar otras alternativas de extracción del colorante que sean más económicas.
- El colorante resultante es líquido por lo que necesita un almacenamiento especial debido a que la temperatura y la luz pueden afectar a su estabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. AA., K. (2002). Tecnología poscosecha de cultivos hortícolas. Universidad de California: 3a ed. California.
2. Aguilera, M. R. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud.
3. Arena, I. L. (2004). Espectrofotometría de absorción. Obtenido de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf.
4. Astiazarán AI, L. H. (2003). Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
5. Badui, D. S. (1993). Química de los alimentos. México: Addison Wesley Longman de México, S. A. DE C. V. México D. F.
6. Bawerman, J. (1980). Introducción a la bioquímica de los alimentos. Mexico D.F.: Editorial El manual moderno.
7. Boulton, R. (2001). La copigmentación de antocianinas y su papel en el color del vino tinto.
8. Brennan JG, B. J. (1980). Las operaciones de la ingeniería de los alimentos. Zaragoza.
9. Brooker, D., Bakker-Arkema, F., & Hall, C. (1992). Secado y almacenado de granos y oleaginosas. Nueva York.
10. Cabrita, L., & Andersen, Ø. M. (2000). Trisacáridos antocianinas en los arándanos de *Vaccinium padifolium*.
11. Cacace JE, M. G. (2003). Optimización de la extracción de antocianinas de grosellas negras con etanol acuoso. Revista de ciencia de los alimentos.
12. Cano, P. A. (2011). <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/4929>.
13. Castañeda-Ovando A, P.-H. M.-H. (2009). Estudio químico de antocianinas. Una revisión. Química de Alimentos.
14. Cifuentes, L. A. (2011). Recuperado el 20 de Noviembre de 2014. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/5351/1/197518.2011.pdf>.

15. Connor AM, L. J. (2002). Cambios en la actividad antioxidante de la fruta entre cultivares de arándanos durante el almacenamiento de calor. *Diario de la química agrícola y alimentaria*.
16. Cooke D., S. W. (2005). Antocianos de frutas y verduras - el color brillante es señal de actividad quimiopreventiva del cáncer.
17. Craig-Lyman. (s.f.). Memoria bibliográfica. Obtenido de <https://es.m.wikipedia.org/wiki/Rotavapor.com>.
18. Delgado, V. F., Jiménez, A., & Paredes, L. O. (2000). Pigmentos Naturales: Carotenoides, Antocianinas, y Características de las Betalaínas, procesamiento de la Biosíntesis y Estabilidad.
19. Díaz, A. B. (18 de Julio de 2007). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimetría de biomoléculas. Obtenido de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fap821c/doc/fap821c.pdf>.
20. Durst, R., & Wrolstad, R. (2004). Separación y caracterización de antocianinas por HPLC. Nueva York: Manual de química analítica de alimentos, pigmentos, colorantes, sabores, textura y componentes de alimentos bioactivos.
21. Es-Safi NE, C. V. (2002). Interacciones entre cianidina derivados 3-O-glucidos y furfural y su impacto en los cambios de color de los alimentos. *J Agric Comida Química*.
22. Estévez, L. y. (2009). Efectos conformacionales y de sustitución en la distribución de electrones en una serie de antocianinas. *Revista de química física*.
23. Faria A, O. J.-B. (2005). Propiedades antioxidantes del arándano preparado (*Vaccinium myrtillus*) Extractos. *Diario de la química agrícola y alimentaria*.
24. Fennema, O. (2000). *Química de los Alimentos*. Zaragoza, España.: Acribia, S.A. .
25. Ferreira Ozela E, S. C. (2007). Estabilidad de la antocianina en la vid de espinacas (*Basella rubra*) frutas. *iencia e Investigación Agrari*.
26. Fresno, A. M. (1999). Farmacognosia. General. En www.flaqt.com/conferenciasXVI/congreso/americas.htm (págs. 66-67, 83-85, 90-91, 209-217, 219-233). España: Editorial Síntesis.
27. <ftp://ftp.mmm.com/pub/Mx/PYM.pdf>. (s.f.).

28. <ftp://mmm.com/pub/Mx/PEC.pdf>. (s.f.).
29. Fuleki, T. y. (1968). Métodos cuantitativos para antocianinas. Extracción y determinación de antocianinas totales en arándanos.
30. G., M. (1995). Antocianinas en productos de uva. Revisión crítica en ciencia de los alimentos y nutrición.
31. Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos. Colombia: Acta Biológica Colombiana.
32. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. (2003). Antocianinas aciladas de fuertes comestibles y su aplicación en los sistemas alimentarios.
33. Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Antocianinas. Caracterización y medición con espectroscopia UV-visible. En los protocolos actuales en química analítica de alimentos. Nueva York.
34. Gould K., D. K. (2009). Biosíntesis de Antocianinas, Funciones, y Aplicaciones. Nueva Zelanda.
35. HGC., K. (1962). Compuestos fenólicos de germen comercial de trigo.
36. <http://www.esmas.com>. (s.f.).
37. [http://es.wikipedia.org/wiki/Etanol_\(combustible\)#Efectos_del_etanol_en_la_agricultura](http://es.wikipedia.org/wiki/Etanol_(combustible)#Efectos_del_etanol_en_la_agricultura). (s.f.).
38. http://es.wikiversity.org/wiki/Extracci%C3%B3n_en_fase_s%C3%B3lida#Ventajas_del_extractor_Soxhlet. (s.f.).
39. <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>. (s.f.).
40. <http://raulalberto.tripod.com.co/paginadealimentos/id57.html>. (s.f.).
41. <http://www.Cienciaahora.cl/Revista23/11BASAEZ.pdf>. (s.f.).
42. <http://www.basktek.com.mx/Microbiologia-de-Alimentos.html>. (s.f.).
43. <http://www.infoagro.com/instrumentosmedida/docrefractometriarefracción.asp?k=20>. (s.f.).
44. <http://www.lavet.com.mx/analizando-alimentos-analisis-bromatologicos/>. (s.f.).
45. <http://www.pasqualinonet.com.ar/Colorantes.htm>. (s.f.).
46. <http://www.portalalimentos.com.ar/colorantes/>. (s.f.).

47. [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642007000100009&script=sci_arttext/Informaion Tecnológica](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642007000100009&script=sci_arttext/Informaion+Tecnológica). (s.f.).
48. <http://www.tecnologia-de-la-leche-y-sus-derivados/.htm>. (s.f.).
49. <https://www.botanical-online.com/medicinalssauco.htm>. (s.f.).
50. <https://www.botanical-online.com/medicinalssauco.htm>. (s.f.).
51. https://www.características_de_calidad_química_de_leche_cruda_del_distrito_perijá/.htm. (s.f.).
52. https://www.ciencia_de_la_leche/principios_de_técnica_lechera/.htm. (s.f.).
53. [https://www.curso de Industrias Lácteas/.htm](https://www.curso+de+Industrias+Lácteas/.htm). (s.f.).
54. https://www.google.com/search?tbm=isch&sa=1&ei=MctRXe7rlobl_QbcrJO4Bg&q=mapa+politico+de+achocalla&oq=mapa+politico+de+achocalla. (s.f.).
55. https://www.manual_del_ingeniero_industrial/.htm. (s.f.).
56. https://www.manuales_para_el_control_de_los_alimentos/análisis_microbiológico/.htm. (s.f.).
57. https://www.principios_de_la_tecnología_de_lácteos/.htm. (s.f.).
58. https://www.química_analítica/.htm. (s.f.).
59. https://www.tecnología_de_la_leche/procesamient_manufactura_y_análisis/.htm. (s.f.).
60. Ibarz A, B.–C. G. (2005). Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos. España.
61. Ibarz Ribas A, B. C. (2000). Métodos experimentales en la ingeniería alimentaria. España.
62. IESN. (2011). Lista de aditivos alimentarios: Instituto de estudios salud natural de chile. Obtenido de <http://www.oocities.org>.
63. J.A., L. (2007). Sistema de Vitaceae de Sur América. Diario Canadiense Botánico, 712-721.
64. Joaquín Ocón García, G. T. (1970). Problemas de Ingeniería Química, Operaciones Básicas II. Santiago.

65. Kopjar M, P. V. (2009). Efecto de la copigmentación de los compuestos fenólicos sobre las antocianinas del jugo de grosella roja durante el almacenamiento. *Diario croata de ciencia y tecnología*.
66. Laleh GH, F. H. (2006). El efecto de la luz, temperatura, pH y especies en estabilidad de pigmentos antocianicos en cuatro especies berberís. *Pakistán: Revista de nutrición*.
67. Lanceta. (2007). El diablo en el chocolate oscuro.
68. Lewis C, W. J. (1995). Efecto del polisacarido son del color de las antocianinas. *Química de alimentos*.
69. Leyva, D. (2009). Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. *Oaxaca, Mexico*.
70. Lombardi, J. A. (2000). Vitaceae - géneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus. *Monografía Flora Neotrópica, 1-250*.
71. M., R. (2005). Reacciones de copigmentación y estabilidad del color de las antocianinas de bayas. *Disertación académica. Universidad de Helsinki. Departamento de química aplicada y división de química alimentaria de microbiología*.
72. Manach C, W. G. (2005). Biodisponibilidad y bioeficacia de polifenoles en humanos. Obtenido de <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/81/1/230S>.
73. Mariora. (2011). Historia de los colorantes. Obtenido de <http://www.buenastareas.com/ensayos/Historia-De-Los-Colorantes/1846692.html>.
74. Martínez-Flórez S, G.-G. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*.
75. Mazza, G., & Miniati, E. (1993). *Antocianinas en Frutas, Vegetales y Granos*. Florida.
76. Menéndez, W. “. (2008). Recuperado el 15 de 10 de 2014. Obtenido de <http://www.dspace.espol.edu.ec/hand>.
77. Miller NJ, R.-E. C. (1997). Las contribuciones relativas del ácido ascórbico y los antioxidantes fenólicos a la actividad antioxidante total de jugos de naranja y manzana y la bebida de grosella negra.

78. Min-Sheng S, P.-J. C. (2007). Actividad antioxidante, Antocianinas, y fenólicos de arándanos rabbiteye (*Vaccinium ashei*) productos fluidos como afectados por fermentación. *Química de alimentos* .
79. Mireles, E. (. (s.f.).
<http://www.monografias.com/trabajos99/colorantes/colorantes.shtml>.
80. MN., C. (2000). Antocianinas - naturaleza, ocurrencia y carga dietética. Obtenido de <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/72502495/HTMLSTART>.
81. Moldovan B, D. L. (2012). Cinética de degradación de antocianinas de Europa uvas (*vitis*) extractos de frutas. Efectos de la temperatura, pH y solvente de almacenamiento.
82. N., P. N. (1973). *La ciencia de los alimentos*. Mexico: Primera edición. Editorial Harla.
83. Nicolson, D. H. (1984). https://www.ecured.cu/Bejuco_ub%C3%AD.
84. NORMA BOLIVIANA NB 319002, (2006). *Frutas - Determinación de humedad*. La Paz, Bolivia.
85. NORMA BOLIVIANA NB 32005, (2002). *Ensayos microbiológicos, recuento de bacterias coliformes*. La Paz, Bolivia.
86. NORMA BOLIVIANA NB 32006, (2003). *Ensayos microbiológicos, recuento de mohos y levaduras. (Primera revisión)*. Bolivia. Bolivia.
87. NORMA BOLIVIANA NB 229, (1998) *Productos lácteos - Determinación de la acidez titulable (Primera revisión)*. La Paz, Bolivia.
88. NORMA BOLIVIANA NB 33016, *Productos Lácteos – Yogurt – Requisitos*. (2006). La Paz, Bolivia.
89. Nunes, M. (2008). *Color atlas de calidad de frutas y verduras*. USA: 2a ed. USA.
90. Nuñez, C. (2008). Sitio Personal de Carlos Eduardo Nuñez. Obtenido de <http://www.cenunez.com.ar>.
91. OR., F. (2000). *Química de los Alimentos*. Acribia SA: 2a ed. Zaragoza.
92. Pasotti, G. y. (2006). *Espectrofotometría Visible – Ultravioleta*.
93. PG., U. (2010). *Transporte de masa en extracción fase sólido – líquido*. Quito.

94. Prado-Lobato SC, H.-C. M.-d.-M.-M. (2012). Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. Mexico.
95. Prior RL, C. G. (1998). Capacidad antioxidante influenciada por la madurez y variedad total fenólica y antociánica de especies *Vaccinium*. Diario de agricultura y Química de alimentos.
96. Pritts M, H. J. (1992). Crecimiento y desarrollo de frutas y verduras. Guía de producción de frutas silvestres.
97. Quiroz, E. (. (s.f.). Obtenido de <http://es.scribd.com/doc/235046896/Los-Colorantes-y-Pigmentos>.
98. Ramírez, M. G. (2007). Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la región de Boyacá. Obtenido de <http://www.utp.edu.co/php/revistas/ScientiaEtTechnica/docsFTP/02537415-417.pdf>.
99. Ranken, M. D. (1993). Manual de industrias de los alimentos. Zaragoza, España: Segunda edición. Editorial Acribia.
100. Rebolledo, F. (2007). Determinación del Potencial de Coloración en Alimentos de un Concentrado de Jugo de Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Obtenido por Nanofiltración. Chile.
101. Rodríguez, M. C. (29 de Octubre de 2002). Ciencia y tecnología de los alimentos. Obtenido de <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnología/2002/10/29/3885.php>.
102. Rusznyak SP, S.-G. A. (1936). Vitamina P: flavonoides como vitaminas.
103. Sapers G, B. A. (1984). Color y composición de los cultivares de arándano Highbush. Revista de la sociedad americana para la ciencia de la horticultura.
104. Sari P, W. C. (2012). Propiedades de color, estabilidad y actividad de captación de radicales libres de jambolan (*Syzygium cumini*) antocianinas de frutas en un sistema modelo de bebida: Antocianinas naturales y copigmentadas. Química de alimentos.
105. Sartelet H, S. S. (1996). Flavonoides extraídos del mijo fonio (*Digitaria exilis*) revelar potentes propiedades antitiroideas.

106. Sax NI, L. R. (1993). Diccionario de química y de productos químicos. 2ª ed. Barcelona.
107. Scheffeldt, P., & Hrazdina, G. (1978). Copigmentación de antocianinas en condiciones fisiológicas. Ciencia de los alimentos.
108. Sousa, E., Pessanha, M., Alves, R., Colleen, C., Clevidence, Y., & Novotny. (2005). Antocianinas presentes en frutas tropicales seleccionas: acerola, jambolão, jussara y guajiru.
109. Stintzing FC, S. A. (2002). Color y propiedades antioxidantes de pigmentos de antocianinas basados en cianidina.
110. Visible Ivanovic, I. (Enero de 2014). "El color es luz".proyectacolor. Obtenido de <http://teoriadelcolor2014.blogspot.com/2014/01/espectro-cromatico.html?m=1>.
111. Wang WD, X. S. (2007). Cinética de degradación de antocianinas en jugo de mora y concentrado. Diario de alimentos.
112. Yoshico, S. (1996). Clasificación de Colorantes Naturales. Obtenido de http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/meiq/perez_l_oa/capitulo4.pdf.

ANEXO 1

Tabla 34. Preparación de Reactivos.

REACTIVO	COMPONENTES	PROCEDIMIENTO
Alcohol Etílico	125 ml de Alcohol Etílico	-
Alcohol Etílico Acidificado	125 ml de Alcohol Etílico 1,025 g de Ácido Cítrico	Adicionar Ácido cítrico al Alcohol Etílico y disolver completamente
Agua destilada	125 ml de Agua destilada	-

FUENTE PROPIA.

ANEXO 2. Tablas de identificación para flavonoides

Tabla 35. Identificación para Flavonoides.

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Ensayo de Shinoda	Magnesio metálico, Ácido Clorhídrico concentrado	Coloración Amarilla-Roja	Flavonas y Flavonoles
		Coloración Roja	Flavononoles
		Coloración de Rojo-Violeta-Azul	Flavanonas
		Negativo	Isoflavonas, Chalconas y Auronas

FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

Tabla 36. Identificación para Flavonoides.

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Ensayo Zinc/HCl	Zinc metálico, Ácido Clorhídrico concentrado	Coloración Rojo-Violeta	Flavononoles
		Incolora o Rosado débil	Flavanonas y Flavonoles

FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

Tabla 37. Identificación para Flavonoides.

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Prueba con NaOH 1N	Hidróxido de Sodio 1N	Coloración Amarilla	Flavonas y Flavonoles
		Diferentes tonos de Rojo	Flavanonas e Isoflavononas
		Coloración Púrpura Rojiza	Chalconas
		Coloración Café Anaranjado	Flavononoles
		Coloración Azul	Antocianinas

FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

Tabla 38. Identificación para Antocianinas.

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Identificación para Antocianinas con pH ácido	Ácido Clorhídrico Concentrado	Coloraciones Rojas, Violetas y Moradas	Antocianinas
Identificación para Antocianinas con pH alcalino	Hidróxido de Sodio 1N (NaOH)	Coloración Verde y Azul	Antocianinas

FUENTE: (Durst & Wrolstad, 2004) (20).

ANEXO 3

Tabla 39. Datos experimentales para la determinación de la humedad.

N°	Muestra (g)	Humedad (%)	Humedad		$(\bar{x} \pm \alpha)$	CV %
			X	X ²		
1	10,20	85,78	0,8578	0,7358	0,86 ± 0,02	1,20
2	10,16	87,01	0,8701	0,7571		
3	10,05	86,57	0,8657	0,7494		
4	10,07	84,61	0,8461	0,7159		

FUENTE PROPIA.

Tabla 40. Datos experimentales para la determinación de cenizas.

N°	Muestra (g)	Ceniza (%)	Ceniza		$(\bar{x} \pm \alpha)$	CV %
			X	X ²		
1	3,37	2,94	0,0294	8,6436*10 ⁻⁴	0,028 ± 0,004	8,36
2	3,32	2,46	0,0246	6,0516*10 ⁻⁴		
3	3,35	2,78	0,0278	7,7284*10 ⁻⁴		
4	3,35	2,97	0,0297	8,8209*10 ⁻⁴		

FUENTE PROPIA.

Tabla 41. Datos experimentales para la determinación de la materia orgánica.

N°	Materia Orgánica (%)	Materia Orgánica		$(\bar{x} \pm \alpha)$	CV %
		X	X ²		
1	11,28	0,1128	0,0127	0,11 ± 0,01	8,41
2	10,53	0,1053	0,0111		
3	10,64	0,1064	0,0113		
4	12,42	0,1242	0,0154		

FUENTE PROPIA.

ANEXO 4

Tabla 42. Datos experimentales para la determinación de solidos totales en el colorante natural.

N°	Muestra de colorante (ml)	Solidos Totales %	Solidos Totales		$(\bar{x} \pm \alpha)$	CV %
			X	X ²		
1	20	3,7760	0,0378	1,4288*10 ⁻³	0,0374 ± 0,0008	0,89
2	20	3,7255	0,0372	1,3838*10 ⁻³		
3	20	3,7255	0,0372	1,3838*10 ⁻³		

FUENTE PROPIA.

Tabla 43. Resultados de la cantidad de soluto presente en la uva silvestre (Cissus verticillata).

UNIDAD	SOLUTO TOTAL	SOLUTO EN EL EXTRACTO	SOLUTO RETENIDO
%	16,77	3,7425	12,42
Kg/L	0,1617	0,0374	0,1242

FUENTE PROPIA.

Tabla 44. Resultados de pruebas experimentales en distintas cantidades de muestras para la construcción de la curva de retención.

N° de Muestras	Muestra (Kg)	Disolvente total (Kg)	Disolvente en el extracto (Kg)	Disolvente retenido (Kg)	Masa del Inerte (Kg)
1	$70,03 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-4}$	0,2596	0,0166	0,0700
2	$60,01 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$	0,1752	0,0158	0,0357
3	$40,08 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-4}$	0,1436	0,0142	0,0286
4	$30,03 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,1026	0,0158	0,0214
5	$20,02 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	0,0615	0,0174	0,0143
6	$16,09 \cdot 10^{-3}$	$8 \cdot 10^{-4}$	0,0489	0,0142	0,0115
7	$12,01 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-4}$	0,0339	0,0134	0,0086
8	$8,1 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	0,0197	0,0118	0,0058
9	$6,07 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-4}$	0,0134	0,0102	0,0043

FUENTE PROPIA.

Tabla 45. Datos experimentales para la construcción de la curva de retención.

$X, Y; \frac{S}{D + S}$	$N, \frac{I}{D + S}$
0,0000	0,2357
0,1443	0,1679
0,2066	0,1580
0,2671	0,1528
0,3782	0,1446
0,4334	0,1332
0,5245	0,1206
0,6550	0,1016
0,7362	0,0846

FUENTE PROPIA.

ANEXO 5

Tabla 46. Volumen gastado de NaOH para su estandarización.

N° DE REPETICIONES	VOLUMEN GASTADO NAOH (ml)
1	38,55
2	37,95
3	39,50
Promedio	38,67

FUENTE PROPIA.

ANEXO 6

Tabla 48. Análisis de la cantidad total de colorante natural concentrado de uva silvestre (*Cissus verticillata*). Utilizado en la práctica.

TRATAMIENTO	PARÁMETROS	CANTIDAD DE YOGURT	CANTIDAD DE COLORANTE UTILIZADO
T1	<ul style="list-style-type: none"> - pH. - Acidez titulable. - °Brix. - Análisis microbiológico. 	100 ml para cada parámetro	6 ml de colorante * 4 análisis (parámetros) = 24 ml de colorante
T2	<ul style="list-style-type: none"> - pH. - Acidez titulable. - °Brix. - Análisis microbiológico. 	100 ml para cada parámetro	7 ml de colorante * 4 análisis (parámetros) = 28 ml de colorante
T3	<ul style="list-style-type: none"> - pH. - Acidez titulable. - °Brix. - Análisis microbiológico. 	100 ml para cada parámetro	8 ml de colorante * 4 análisis (parámetros) = 32 ml de colorante
T1	Análisis sensorial	250 ml para el análisis sensorial	15 ml de colorante
T2		250 ml para el análisis sensorial	17,5 ml de colorante

T3		250 ml para el análisis sensorial	20 ml de colorante
T1	Muestras netamente para observación	100 ml de yogurt	6 ml de colorante
T2		100 ml de yogurt	7 ml de colorante
T3		100 ml de yogurt	8 ml de colorante
Sólidos Totales			20 ml de colorante para cada caja petri * 4 repeticiones = 80 ml de colorante
TOTAL			237,5 ml de colorante natural

FUENTE PROPIA.

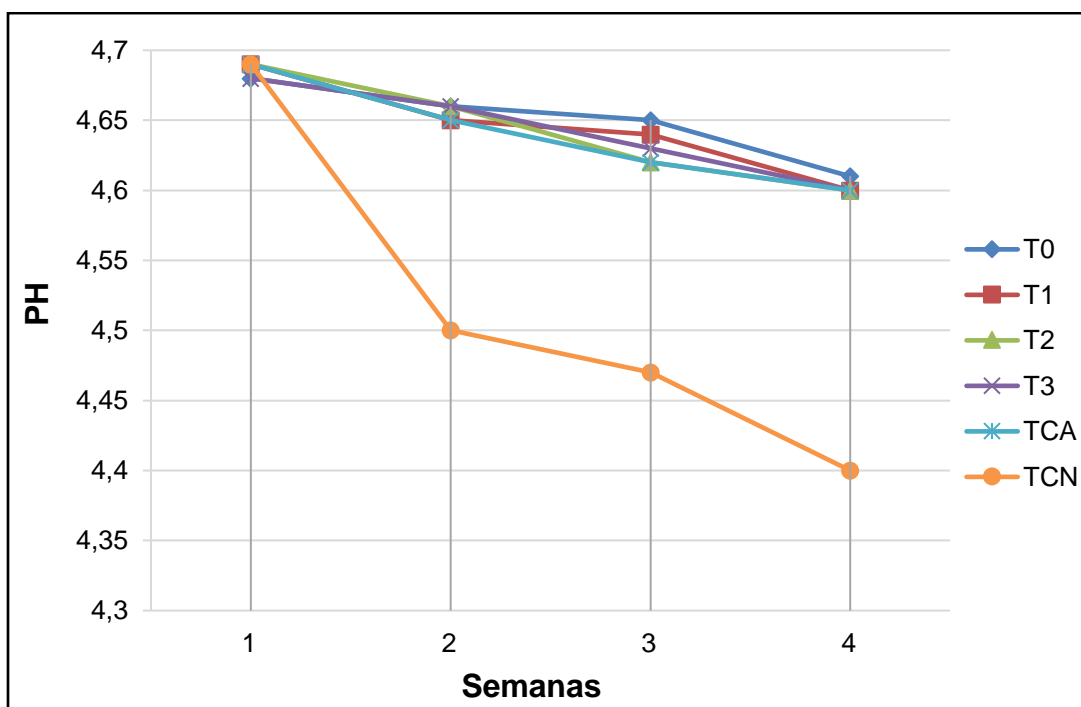
ANEXO 7

Tabla 49. Variación de pH, datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	SEMANA			
	1	2	3	4
T0	4,68	4,66	4,65	4,61
T1	4,69	4,65	4,64	4,6
T2	4,69	4,66	4,62	4,6
T3	4,68	4,66	4,63	4,6
TCA	4,69	4,65	4,62	4,6
TCN	4,69	4,5	4,47	4,4

FUENTE PROPIA.

Gráfica 29. Variación semanal de pH en el yogurt, en los distintos tratamientos.



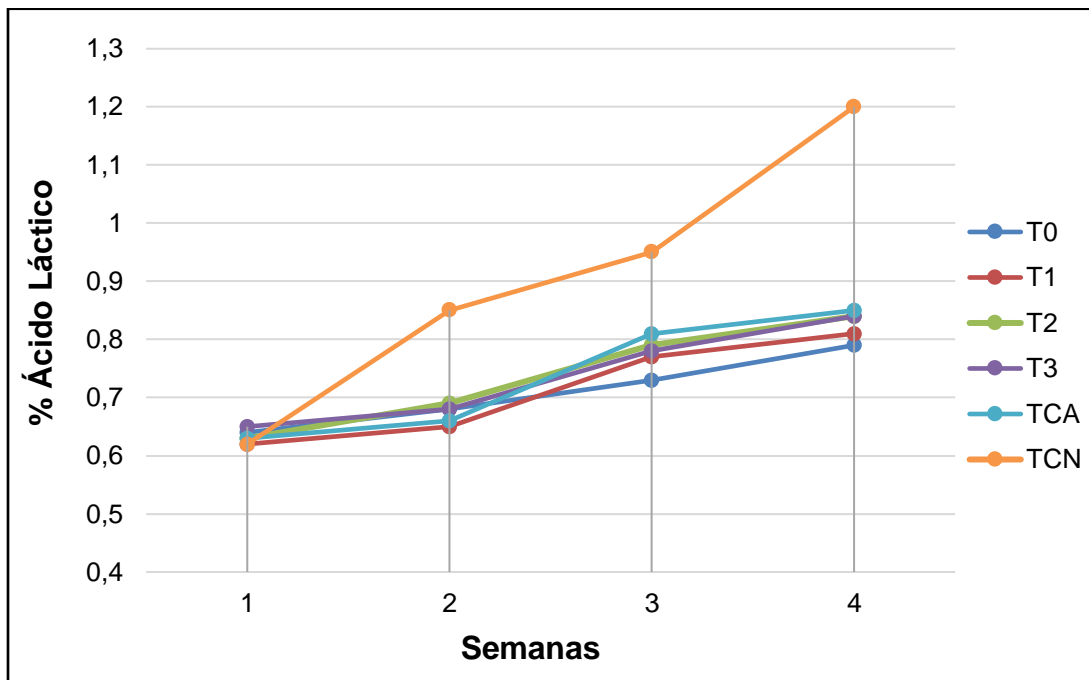
FUENTE PROPIA.

Tabla 50. Variación del porcentaje de acidez titulable, datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	SEMANA			
	1	2	3	4
T0	0,64	0,68	0,73	0,79
T1	0,62	0,65	0,77	0,81
T2	0,63	0,69	0,79	0,84
T3	0,65	0,68	0,78	0,84
TCA	0,63	0,66	0,81	0,85
TCN	0,62	0,85	0,95	1,2

FUENTE PROPIA.

Gráfica 30. Variación semanal del porcentaje de acidez titulable en el yogurt, en los distintos tratamientos.



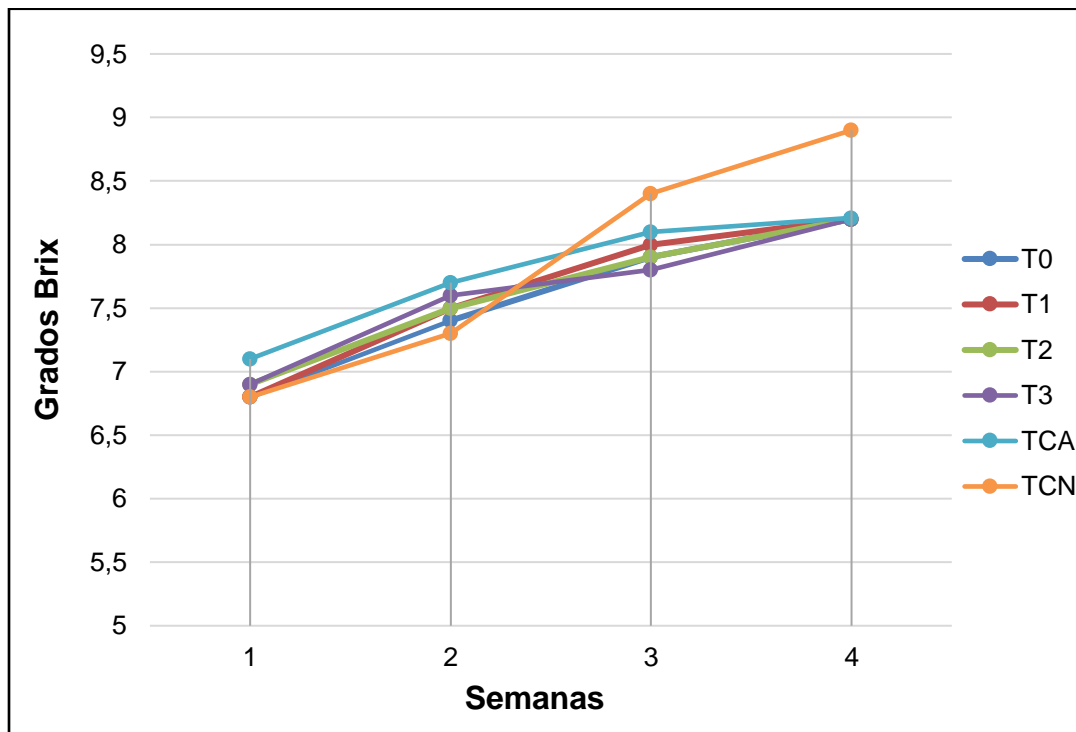
FUENTE PROPIA.

Tabla 51. Variación de los grados brix (°Brix), datos semanales durante el almacenamiento a 5°C en los diferentes tratamientos.

TRATAMIENTOS	SEMANA			
	1	2	3	4
T0	6,8	7,4	7,9	8,2
T1	6,8	7,5	8	8,2
T2	6,9	7,5	7,9	8,2
T3	6,9	7,6	7,8	8,2
TCA	7,1	7,7	8,1	8,21
TCN	6,8	7,3	8,4	8,9

FUENTE PROPIA.

Gráfica 31. Variación semanal de los grados brix (°Brix) en el yogurt, en los distintos tratamientos.



FUENTE PROPIA.

ANEXO 8

Tabla 52. Datos experimentales del pH en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana).

TRATAMIENTO	pH ₁	pH ₂	pH ₃	($\bar{x} \pm \alpha$)	CV %	N.B.
T0	4,61	4,6	4,62	4,61 ± 0,02	0,22	NC
T1	4,6	4,6	4,59	4,6 ± 0,01	0,12	C
T2	4,6	4,6	4,59	4,6 ± 0,01	0,12	C
T3	4,6	4,6	4,59	4,6 ± 0,01	0,12	C
TCN	4,6	4,6	4,59	4,6 ± 0,01	0,12	C
TCA	4,4	4,3	4,5	4,4 ± 0,2	2,27	NC

FUENTE PROPIA.

N.B. = Norma Boliviana.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Tabla 53. Datos experimentales del porcentaje de acidez titulable en él yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana).

TRATAMIENTO	Acidez titulable ₁ g/L	Acidez titulable ₂ g/L	Acidez titulable ₃ g/L	($\bar{x} \pm \alpha$)	CV %	N.B.
T0	0,79	0,78	0,79	0,79 ± 0,01	0,73	C
T1	0,81	0,80	0,82	0,81 ± 0,02	1,23	C
T2	0,85	0,85	0,84	0,84 ± 0,01	0,71	C
T3	0,83	0,84	0,84	0,84 ± 0,01	0,69	C
TCN	0,85	0,85	0,84	0,85 ± 0,01	0,68	C
TCA	1,2	1,1	1,2	1,2 ± 0,14	4,81	C

FUENTE PROPIA.

N.B. = Norma Boliviana.

C = Cumple.

NC = No cumple.

Tabla 54. Datos experimentales de los grados brix (°Brix) en el yogurt en los distintos tratamientos, durante el almacenamiento a 5 °C (última semana).

TRATAMIENTO	°Brix ₁	°Brix ₂	°Brix ₃	($\bar{x} \pm \alpha$)	CV %	N.B.
T0	8,2	8,2	8,3	8,2 ± 0,1	0,70	C
T1	8,2	8,2	8,3	8,2 ± 0,1	0,70	C
T2	8,2	8,2	8,3	8,2 ± 0,1	0,70	C
T3	8,2	8,2	8,3	8,2 ± 0,1	0,70	C
TCN	8,2	8,21	8,22	8,21 ± 0,02	0,12	C
TCA	8,9	8,91	8,93	8,9 ± 0,06	0,17	NC

FUENTE PROPIA.

N.B. = Norma Boliviana.

C = Cumple.

NC = No cumple.

ANEXO 9

Tabla 55. Análisis de costos.

CONCEPTO	VALOR	SÍMBOLO
Producción	34320 unidad/mes	X
Costos Fijos	1651 Bs/mes	CF
Costo Variable	384,240 Bs/mes	CV
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	385,891 Bs/mes	CT
Costo unitario variable o Costo de fabricación	14,612 Bs/unidad	Cuv
30% Utilidad		
PRECIO DE VENTA O PRECIO UNITARIO	14,612 ≈ 15 Bs/unidad	Pu
Ingreso	514800 Bs/mes	I
PUNTO DE EQUILIBRIO	412,75 unidad/mes	Xeq

FUENTE PROPIA.

ANEXO 10

Le solicitamos que califique las diferentes muestras de yogurt que se está presentando. Por favor tómese su tiempo para contestar con sinceridad todas las preguntas.

1. Observe el color del yogurt. ¿Cómo le parece?

- a) Muy bueno
- b) Bueno
- c) Agradable
- d) Malo
- e) Muy malo

2. ¿Cómo le parece el aroma del yogurt?

- a) Muy bueno
- b) Bueno
- c) Agradable
- d) Malo
- e) Muy malo

3. Califique en forma general al producto.

- a) Muy bueno
- b) Bueno
- c) Agradable
- d) Malo
- e) Muy malo

ANEXO 11

Norma Boliviana

NB 33016

Productos lácteos – Yogur- Requisitos

Tercera revisión

ICS 67.100.10 Leche y Productos lácteos

Julio 2006

**Productos lácteos – Determinación de la acidez
Titulable**

ICS 19.020 Condiciones y procedimientos
de ensayo en general

ICS 67.100.10 Leche. Productos lácteos

Primera revisión

Octubre 1998

Norma Boliviana

NB 32005

**Ensayos microbiológicos - Recuento de bacterias
coliformes**

Primera revisión

Diciembre 2002

Norma Boliviana

NB 32006

**Ensayos microbiológicos - Recuento de mohos y
levaduras**

Primera revisión

2003

Norma Boliviana

NB 319002

Frutas - Determinación de humedad

Primera revisión

2006

ANEXO 12. Trabajo desarrollado en el laboratorio.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 19. Muestras para la determinación de Humedad.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 20. Muestras para la determinación de cenizas.



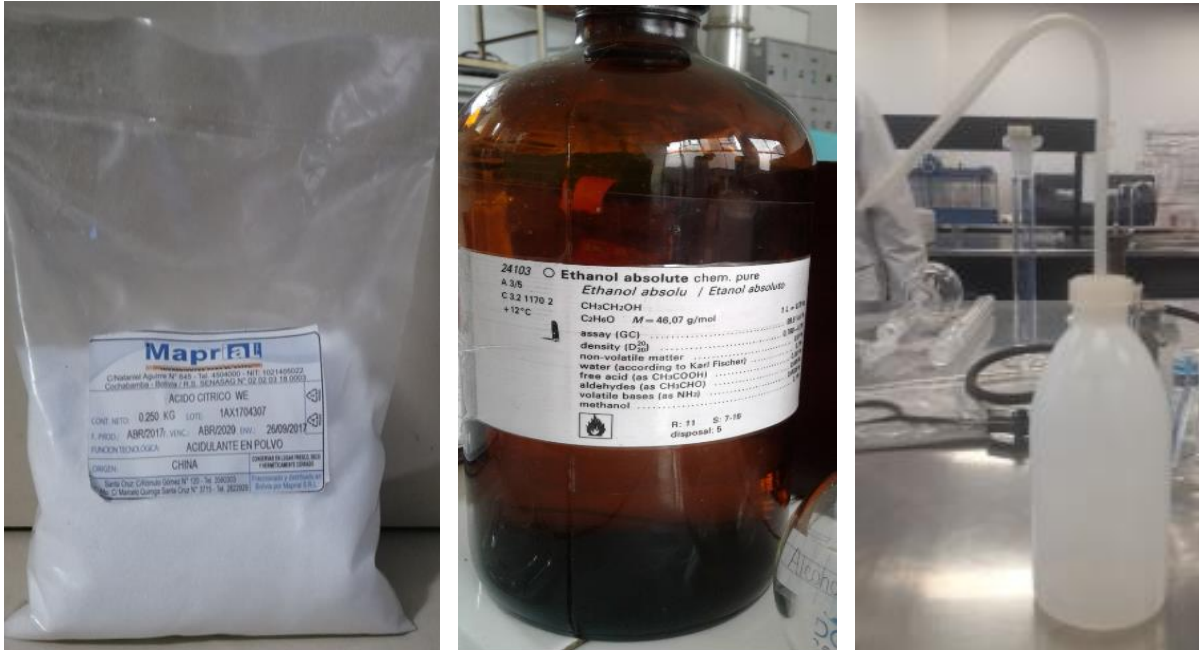
FUENTE PROPIA.

Fotografía 21. Bayas frescas de uva silvestre.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 22. Preparación de las muestras después del pesado.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 23. Ácido cítrico, alcohol etílico al 96° y agua destilada empleados para la extracción del colorante de uva silvestre.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 24. Armado del equipo Soxhlet.



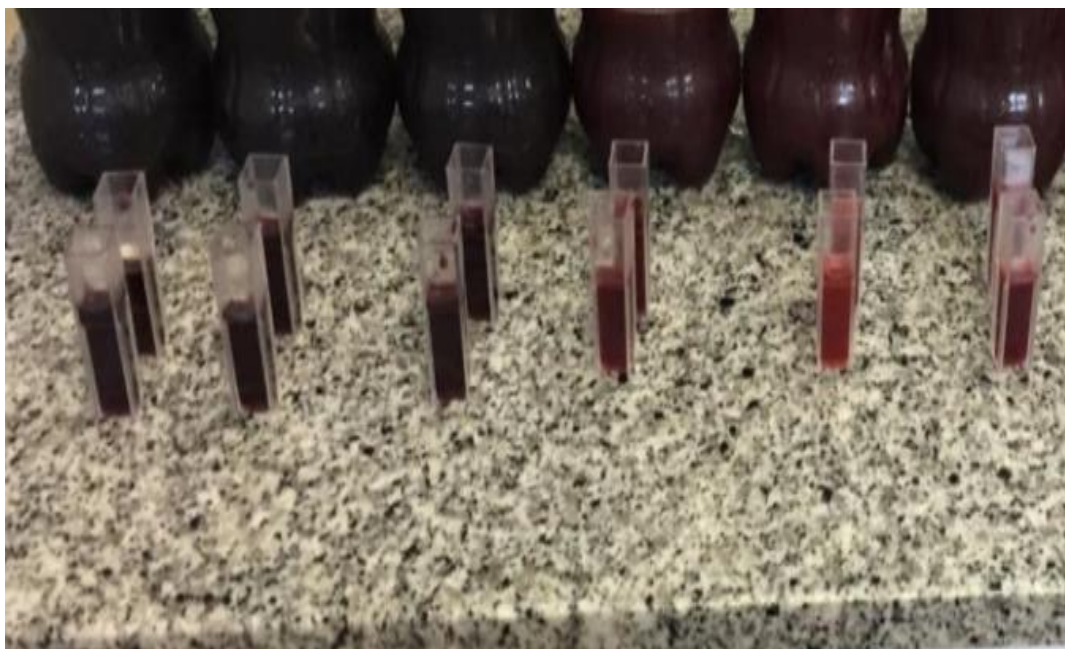
FUENTE PROPIA.

Fotografía 25. Extracción del colorante de uva silvestre por el Método Soxhlet.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 26. Extracto del colorante en soluciones de alcohol etílico, agua destilada y alcohol etílico acidificado (alcohol etílico-ácido cítrico).

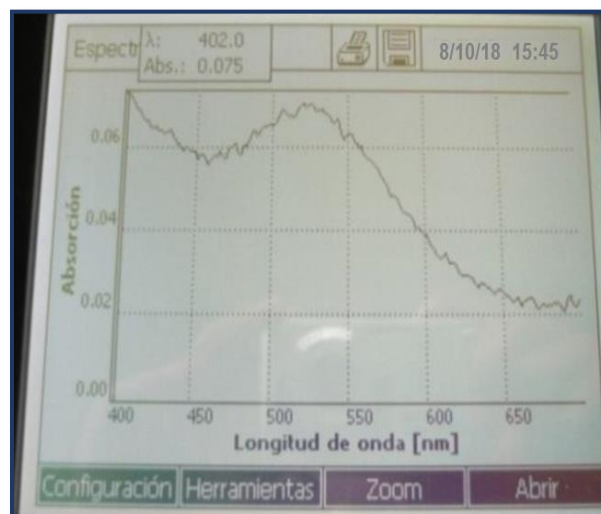
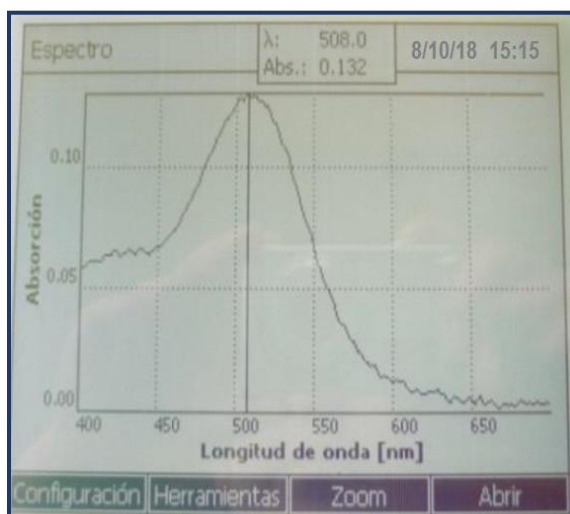


FUENTE PROPIA.

Fotografía 27. Análisis de absorbancia de las distintas muestras de uva silvestre.

pH 1

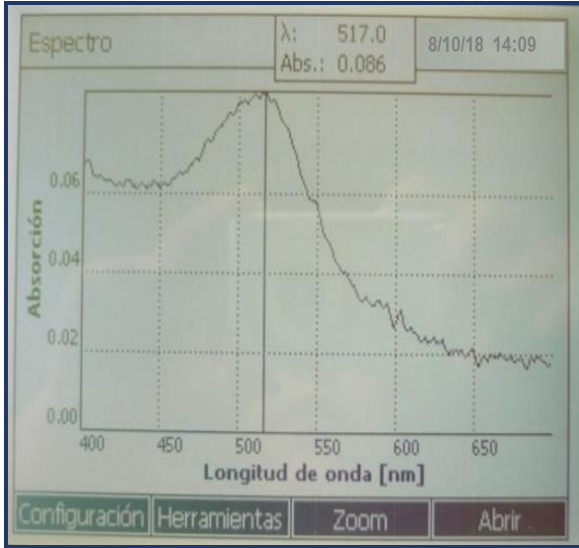
pH 4,5



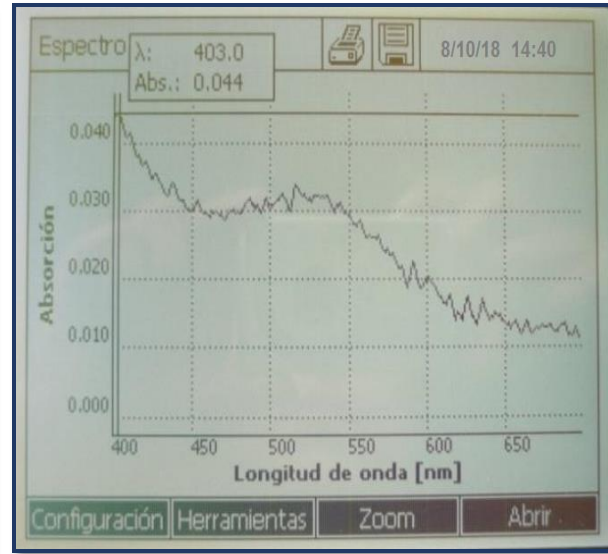
FUENTE PROPIA.

Fotografía 28. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente alcohol etílico.

pH 1



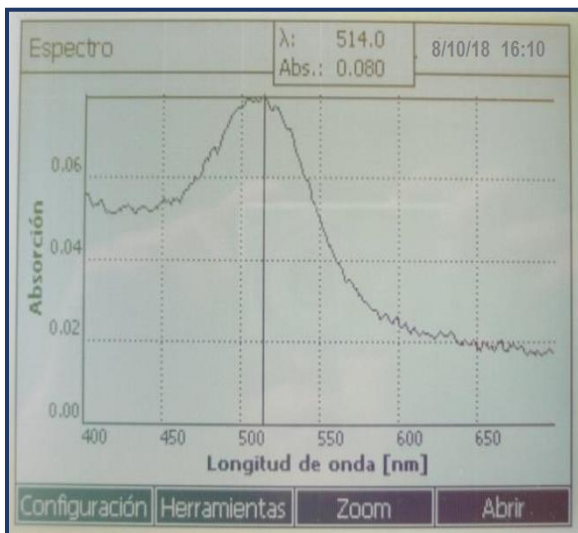
pH 4,5



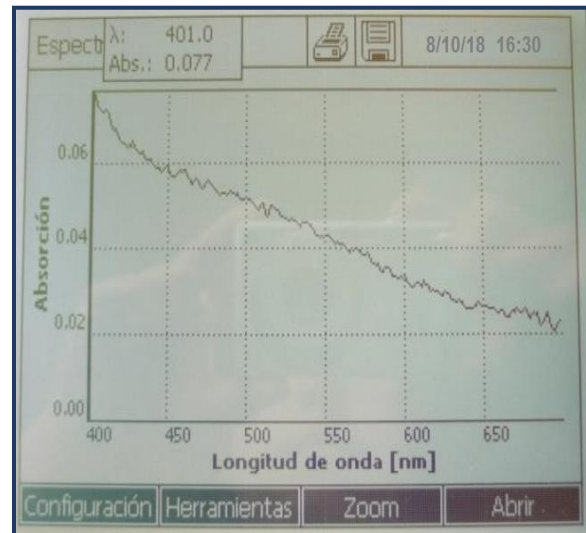
FUENTE PROPIA.

Fotografía 29. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente alcohol etílico acidificado.

pH 1



pH 4,5



FUENTE PROPIA.

Fotografía 30. Espectros de absorción de la uva silvestre a pH1 y pH4,5, con disolvente agua destilada.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 31. Realización de Pruebas de Identificación para Flavonoides y Antocianinas.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 32. Rotavapor eliminando la parte alcohólica del colorante de uva silvestre.





FUENTE PROPIA.

Fotografía 33. Concentrado del colorante obtenido de uva silvestre (*Cissus verticillata*).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 34. Yogurt con diferentes dosis de colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*) al día 1.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 35. Yogurt con las diferentes dosis de colorante uva silvestre (*Cissus verticillata*), almacenado a 5°C.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 36. Titulación del yogurt con las diferentes dosis de colorante uva silvestre (*Cissus verticillata*), para la determinación de la acidez.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 37. Yogurt con diferentes dosis de colorante de uva silvestre (*Cissus verticillata*), al día 30.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 38. Colorante artificial rojo arrulla.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 39. Yogurt con colorante rojo arrulla (colorante artificial) al día 1.



FUENTE PROPIA.

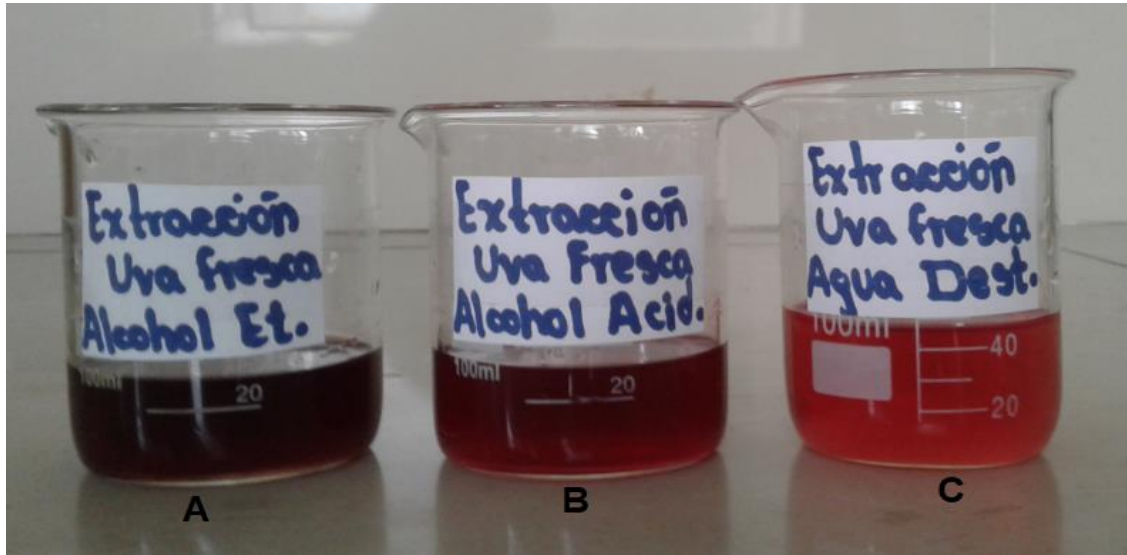
Fotografía 40. Yogurt con colorante rojo arrulla (colorante artificial), al día 30.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 41. Yogurt de frutilla con colorante carmín de cochinilla (colorante natural), del día 1 y 30.

ANEXO 13



FUENTE PROPIA.

Fotografía 42. Extractos de uva silvestre por el método soxhlet en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) (B) y Agua destilada (C).



FUENTE PROPIA.

Fotografía 43. Prueba de Shinoda en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet.



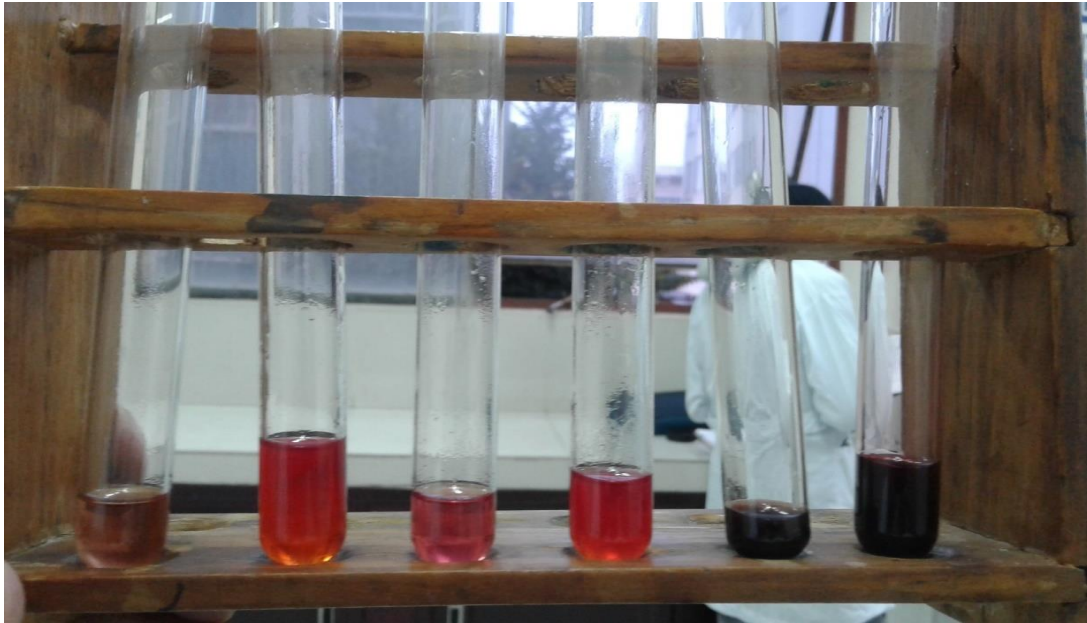
FUENTE PROPIA.

Fotografía 44. Prueba con Zn/HCl en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 45. Prueba con NaOH 1N en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 46. Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 47. Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de uva silvestre en Alcohol Etílico, Alcohol Etílico Acidificado (Alcohol Etílico-Ácido Cítrico) y Agua destilada por el método soxhlet.

ANEXO 14

Especificaciones:

Es un producto lácteo, acidificado por acción biológica de bacterias lácticas específicas. Es elaborado con leche controlada y seleccionada, homogeneizada y pasteurizada, leche descremada en polvo, estabilizantes (440ii y 1404) y conservante (202). Es un producto lácteo de mediana vida.

NO CONTIENE AZÚCAR, SABORIZANTES, COLORANTES NI EDULCORANTES.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 48. Yogurt natural PIL, empleado para la adición del colorante natural de uva silvestre a diferentes dosis.

Especificaciones:

Es un producto lácteo, acidificado por acción biológica de bacterias lácticas específicas. El producto es elaborado con leche pasteurizada controlada y seleccionada, con azúcar, leche descremada en polvo, pulpa molida de frutilla, estabilizantes (440ii y 1404), conservante (202), esencia idéntica a natural de frutilla y colorante (120). Es un producto lácteo de mediana vida.



FUENTE PROPIA.

Fotografía 49. Yogurt de frutilla PIL que contiene colorante carmín de cochinilla, empleado para la comparación frente al yogurt con colorante natural de uva silvestre obtenido.