



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS



**EXTRACCIÓN DE COLORANTE DE COL MORADA (*Brassica oleraceae*)
PARA SER USADO EN LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA**

Perfil de Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título
de Ingeniería en Alimentos .

Por: Geovanna Gabriela Castillo Burbano

Tutor: Ing. GLADYS NAVAS

Ambato- Ecuador

2006

ÍNDICE

PAGINAS

Carátula	i
Certificado	ii
Índice	iii

CAPITULO I EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Contextualización	3
1.2.1 Macro	3
1.2.2 Meso	7
1.2.3 Micro	7
1.2.4 Análisis crítico	8
1.2.5 Prognosis	9
1.2.6 Formulación del problema	9
1.2.7 Interrogantes	9
1.2.8 Delimitación	10
1.3 Justificación	10
1.4 Objetivos	12
1.4.1 <i>General</i>	12
1.4.2 <i>Específicos</i>	12

CAPITULO II MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes de investigación	13
2.2 Fundamentación filosófica	13
2.2.1 Antocianinas	13
2.2.1.1 Estructura	13
2.2.1.2 Influencia de la temperatura en las antocianinas	15
2.2.1.3 Copigmentación	16
2.3 Fundamentación legal	16
2.4 Categorías fundamentales	17

2.4.1 Extracción del Pigmento	17
2.4.1.1.Extracción por solventes (Wroslad 2001)	17
2.4.1.2 Extracción con enzima Pectinex Ultra SP	17
2.4.2 Preparación de la Bebida	21
2.5 Hipótesis	23
2.6 Señalamiento de variables	23
2.6.1 <i>Variable independiente</i>	23
2.6.2 <i>Variable dependiente</i>	23

CAPITULO III EL MARCO METODOLOGICO

3.1 Enfoque de la Investigación	24
3.2 Modalidad Básica de la Investigación	24
3.3 Nivel o tipo de investigación	24
3.4 Población y muestra	24
3.5 Operacionalización de variables	25
3.5.1 Técnicas e instrumentos	27
3.6 Recolección de datos	27
3.7 Tratamiento de datos	27

CAPITULO IV EL MARCO ADMINISTRATIVO

4.1 Recursos	28
4.1.1 Recurso Institucionales	28
4.1.2 Recurso Humanos	28
4.1.3 Recurso Materiales	28
4.1.4 Recurso Económicos	29
4.2 Cronograma de actividades	30
4.3 Bibliografía	31
Anexos	32

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 Monto de Exportaciones de colorantes naturales 1997-200)	5
Tabla 2 Variables Independientes	25
Tabla 3 Variables Dependientes	26
Tabla 4 Formato de evaluación sensorial	32
Tabla 5 Componentes de la col morada	33

LISTADO DE FIGURAS

Grafico 1. Evolución de las exportaciones anuales de colorantes de origen animal o vegetal	5
Fig 2. Estructura básica de las antocianinas	14
Fig 3 Diagrama de flujo de extracción del Pigmento por el Método de Solventes (Wrosltad 2001)	19
Fig 4 Diagrama de flujo de extracción del Pigmento por el método con enzimas pectinex Sp)	20
Fig 5 Diagrama de flujo para preparación de Bebida	22

INTRODUCCION

Los colorantes son aditivos, sustancias que adicionadas a los alimentos proporcionan, refuerzan o varían su color.

Del conjunto de los aditivos alimentarios, el grupo de los colorantes es, probablemente, el que mayor polémica ha originado entre los consumidores. Frecuentemente, se les considera aditivos de dudosa utilidad por cuanto no mejoran –ni tampoco empeoran– la calidad del producto con respecto a su conservación o calidad nutritiva. En consecuencia, y para que sean debidamente aceptados, el nivel de riesgo aceptable para un beneficio pequeño ha de ser forzosamente muy bajo.

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.

Los consumidores prefieren en determinados alimentos un color constante, que no varíe entre los diferentes lotes de fabricación de un producto. La variabilidad natural de las materias primas hace que este color normalizado solo pueda obtenerse modificándolo de forma artificial. Por otra parte, muchas sustancias colorantes naturales de los alimentos son muy sensibles a los tratamientos utilizados en el procesado (calor, acidez, luz, conservantes, etc.), destruyéndose, por lo que deben substituirse por otras más estables.. El coloreado también contribuye a la identificación visual del producto por parte del consumidor, y en muchos casos un buen proceso de coloreado puede condicionar el éxito o fracaso comercial de un producto. La práctica de colorear los alimentos tiene una larga tradición.

Los colorantes pueden clasificarse en tres grandes grupos: naturales, idénticos a naturales y sintéticos o artificiales. Actualmente existe una cierta tendencia a utilizar, cuando es posible, colorantes naturales en lugar de los sintéticos o artificiales ya que se cree que son inocuos y, por tanto, sin riesgo para la salud humana.

El estudio se enfoca en las antocianinas (griego = flor y kyanos= azul) que son pigmentos vegetales hidrosolubles que forman parte de la familia de los polifenoles y redefinen como flavonoides fenólicos (Ocultate,1984) ,se encuentran principalmente en la piel de frutas(uvas), flores(rosas) o verduras (col morada) presentan hermosos colores azules, púrpuras, violeta, malva, magenta, la mayoría de los rojos. y los matices de amarillo pálidos.

Las antocianinas son sensibles a la degradación debido a factores como la luz, pH, ácido ascórbico, temperatura, empareamiento enzimático, pero no todas presentan el mismo nivel de sensibilidad , es así que se ha descubierto que la copigmentación de las antocianinas con ellas mismas o con otros pigmentos afines les otorga mayor estabilidad e intensificación del color pudiendo se obtener de esta manera colorantes mas estables como es el color rojo para la utilización en productos como bebidas

La col morada es un alimento que se consume de forma fresca como parte de ensaladas, de sabor ligeramente dulce y muy apreciado, que se caracteriza por el atractivo de su color morado, magenta o púrpura oscuro de sus hojas, las mismas que contienen una gran cantidad de antocianinas por lo cual es de interés para nuestro estudio ya que nos permite obtener un colorante rojo natural que puede ser una nueva alternativa para la industria

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 CRITERIO DEL PLANTEAMIENTO

Los colorantes son sustancias de origen natural o artificial que se usan para aumentar el color de los alimentos, ya sea por que el alimento a perdido color en su tratamiento industrial o bien para hacerlo más agradable a la vista y más apetecible al consumidor.

Los colorantes se dividen en dos tipos: pigmentos que encuentran presente naturalmente y los que son adicionados. La FDA (Food and Drug Administration) han clasificado a los pigmentos añadidos en dos categorías: colorantes exentos de certificación y colorantes certificados. Los primeros se encuentran en fuentes naturales animal, vegetal o mineral, mientras los segundos se obtienen mediante síntesis son usados en lacas o tintes.

Los colorantes certificados tienen carias ventajas como es la estabilidad, la variedad de tonos, poder tintórico, la pureza. Sin embargo en los últimos años se ha discutido la seguridad de los colorantes sintéticos como el rojo N° 2, el rojo N° 4 y el rojo N°44 entre otros ya que se ha demostrado su toxicidad en muchas pruebas. Es así que las prohibiciones aplicadas al empleo de colorantes rojos certificados para alimentos a nivel mundial han provocado un aumento en el empleo de pigmentos rojos naturales como agentes colorantes. Por lo cual las fuentes naturales del color como son las botainas, el acido carmínico, ciertos carotenos y las antocianinas (Kira,1996)

En la actualidad los consumidores actuales exigen productos sin aditivos sintéticos, por lo que ha llevado a muchas empresas sustituir cuando es factible los colorantes artificiales por los naturales.

La col morada es un vegetal que contiene muchas antocianinas la cuales se convierte en un alternativa como colorante natural

El objetivo de este proyecto es el de estudiar, la extracción de colorante de colorada (*Brassica oleraceae*) para ser usado en la elaboración de bebidas, por medio de dos métodos distintos de extracción por el método de solventes de (Wrolstad 2001) y método de enzimas Pectinex Ultra SP. Esto será la diferencia de los estudios realizados anteriormente. Para aprovechar de esta manera los recursos que no han sido utilizados como una nueva alternativa para la extracción de colorante rojo.

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA CONTEXTUALIZACIÓN

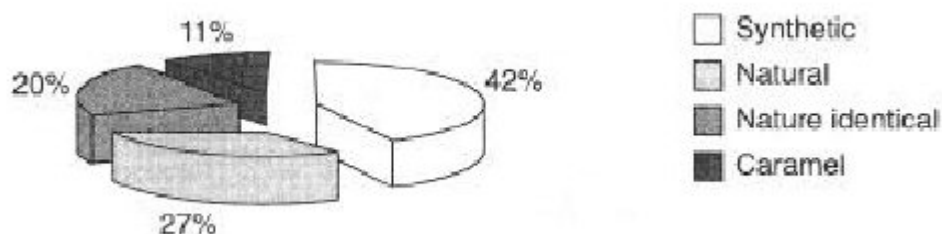
1.2.1 MACRO

COLORANTES NATURALES A NIVEL MUNDIAL

En la industria alimenticia existe una tendencia creciente en la utilización de los colorantes naturales en lugar de los sintéticos o artificiales; esta tendencia es mayor en los países más industrializados debido a que la legislación de estos países ha restringido e incluso prohibido la utilización de diversas sustancias químicas sintéticas colorantes para alimentos, debido a su alta toxicidad.

Una estimación razonable del mercado de colorantes le asigna un tamaño aproximado de 940 millones de dólares, distribuidos en los porcentajes que se observan en la figura 1 siguiente:

Figura 1. Distribución mundial del mercado de colorantes



En términos de tamaños sectoriales según esta estimación:

- Colores sintéticos - 400 Millones de dólares
- Colores naturales - 250 Millones de dólares
- Colores idénticos a naturales - 100 Millones de dólares
- Caramel colours – 100 Millones de dólares

La presión de los consumidores, cambios sociológicos y avances tecnológicos han conducido avances en la industria alimenticia incrementando el mercado de colorantes. El más significativo desarrollo lo han tenido los colorantes naturales en cuanto a su mejoramiento en la incorporación al proceso además del aumento en la percepción de los consumidores de que “lo natural es mejor”. Se estima un desarrollo futuro de los colorantes naturales estimado en un 5-10% anual. (International Journal of Food Science, 2001)

Se espera que la demanda de colorantes naturales se incremente en la Unión Europea. De igual manera se prevé que la participación de mercado de las importaciones crezcan aproximadamente 2.7% cada año, como resultado del aumento de la demanda de ingredientes naturales para la preparación de alimentos

Estados Unidos también existe una demanda creciente de colorantes naturales, la cual se demuestra en los crecimientos de las importaciones de este país. Durante el 2004 las importaciones de colorantes naturales, crecieron en comparación al año anterior, alcanzando valores de US\$54 millones de dólares.

De acuerdo a los datos proporcionados por la oficina de ProChile, las exportaciones mundiales el año 2002 fueron de 331 millones de dólares. Este año se exportaron al mundo un total de 48.389 toneladas de materiales colorantes de origen vegetal.

Los principales proveedores mundiales fueron España, Alemania, Dinamarca y China. Estos países contaron con una cuota de mercado equivalente al 40%.

España contribuyó al abastecimiento del 15% del mercado mundial, Alemania en un 8,4%, Dinamarca un 8,3% y China con un 8,2%

El precio promedio de exportación fue de 6,86 US\$/kilo de colorante, con un mínimo de 0,43 US\$/kilo y un máximo de 87,39 US\$/kilo. Este amplio rango de precios sería explicado por una alta variedad de productos según disponibilidad mundial, tecnología aplicada, complejidad de procesos productivos, etc.

España concretó exportaciones por 49,6 millones de dólares durante el año 2002, las cuales consistieron en 5.716 toneladas de colorantes naturales. El precio unitario resultante fue de 8,68 US\$/kilo. Sus embarques tuvieron un destino final diverso que alcanzó a 60 países. Dentro de los principales destinos de las exportaciones de España están Japón con un 16,7%, Estados Unidos con un 12,9%, Alemania con un 9,6%, Italia con un 7%, Corea del Sur con un 5,9% y Francia con un 5,7% (Prochile, 2004).

La exportaciones chilenas de materias colorantes de origen vegetal o animal el año 2003 alcanzaron a 1,59 millones de dólares. Entre el año 1997 y 2003 se observa un comportamiento cíclico de los envíos (Gráfico 1).

Gráfico 1. Evolución de las exportaciones anuales de colorantes de origen vegetal o animal y precio anual promedio – Años 1997-2004 (US\$ v/s US\$/KgN)

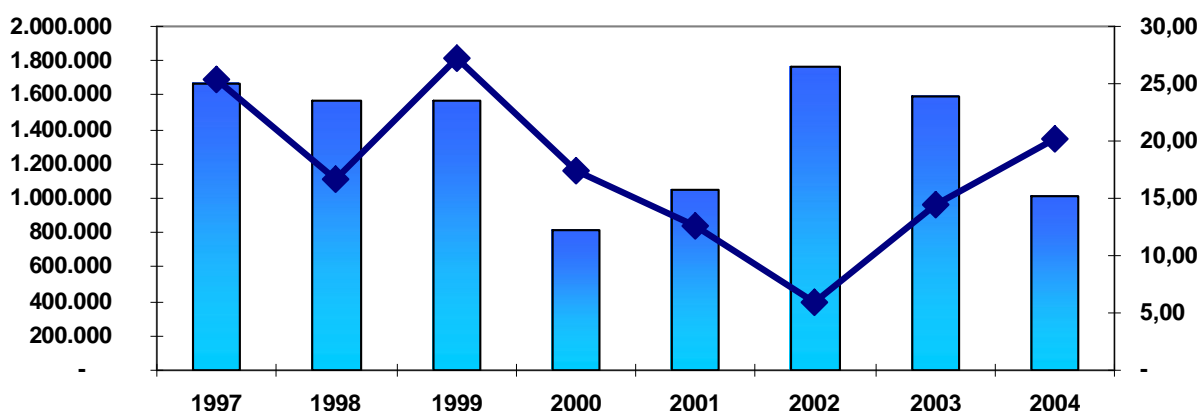


Tabla 1. Montos de Exportaciones de colorantes naturales 1997-2004

Totales Anuales			
Producto(s): 3203.00 – materiales colorantes de origen vegetal o animal			
Año	US\$ FOB	Cantidad (KgN)	Precio US\$/KG
1997	1.672.124	65.906	25,37
1998	1.565.987	94.203	16,62
1999	1.573.872	57.801	27,23
2000	810.571	46.798	17,32
2001	1.050.567	83.451	12,59
2002	1.760.057	300.000	5,87
2003	1.587.872	109.971	14,44
2004*	1.006.567	49.947	20,15

El año 2002 las importaciones mundiales de colorantes naturales totalizaron 420 millones de dólares, registrándose un total de 132 países involucrados en las importaciones de materias de colorantes de origen vegetal o animal.

Los volúmenes importados el año 2002 alcanzaron las 66.238 toneladas. De los 132 mercados registrados como importadores de este producto, un 50% de la demanda se concentró en solo siete países. Destacándose la demanda de Japón que representó el 12,3% de los montos mundiales generados ese año. En segundo lugar se ubica Estados Unidos con una participación de 10,8% sobre la demanda mundial y Alemania con un 8,8% de participación

1.2.2 MESO

COLORANTES NATURALES A NIVEL DE AMERICA LATINA

Los colorantes naturales en la oferta mundial esta dada en especial por Brasil el cual es un proveedor para la Comunidad Europea desde la década de los ochenta siendo el tercer mayor exportador de colorantes naturales , al igual Argentina y Paraguay.

Se exporta a Estados Unidos y Europa sin realizar tramites legales por vía aérea o marítima por lo que los comerciantes y empresas no pueden dar cifras sobre las exportaciones o importaciones de los colorantes locales por lo que argumentan que el comercio es solamente local.

1.2.3 MICRO

COLORANTES NATURALES EN ECUADOR

En el país los productos naturales se han empezado a exportar con mayor eventualidades , ya que en la actualidad los cuidados de saludase basan en los compuestos provenientes de plantas y gran parte de la población mundial depende de las propiedades de estos productos tradicionales para el requerimiento diario esto ocurre con mayor frecuencia en los países que se encuentran en desarrollo (OMS 1985, Internet)

Hay 500 especies de plantas medicinales y con otras propiedades de colorantes conocidos en donde 125 de ellas son comercializadas, considerando solo una fracción de lo que se estima que se da en el país (<http://www.IICA.com.gov.ec>)

En realidad no existen cifras exactas de las importaciones y exportaciones que se dan en el país de colorantes de origen natural

1.2.4 ANÁLISIS CRÍTICO

La extracción de colorante de col morada es un proyecto de gran importancia ya que las hojas de col morada son una fuente abundante de antocianinas por lo cual son una posible alternativa para el uso como colorante natural

Los riesgos que presentan los colorantes sintéticos para la salud del consumidor son variados por que al ser artificiales contienen sustancias químicas que producen a largo enfermedades terminales como el cáncer .

Los colorantes artificiales pueden ser causantes de alergias, intoxicaciones. Los factores alimentarios pueden ser responsables de un 40% de cáncer, pero la relación causal no esta tan establecida y no se conocen exactamente los constituyentes de la dieta que son responsables de esta enfermedad.

Esta información ayudaría a los fabricantes a producir un colorante natural como alternativa para la utilización en la elaboración de bebidas

El estudio de la extracción de colorante de col morada tiene como finalidad obtener una posible alternativa de colorante natural dando un valor adicional a las bebidas que se elaboren, ya que esto permite disminuir la utilización de colorantes artificiales y por lo tanto aumentar la calidad de vida del consumidor al igual que para las empresas productoras de bebidas

1.2.5 PROGNOSIS

Al no realizarse este proyecto, no se incentivaría a la investigación de extracción de colorantes naturales que permitan remplazar a los artificiales, se privaría de los siguientes beneficios como son :

- Disminución de los efectos en la salud que produce el consumo de colorantes artificiales.
- Obtención fácil de colorantes de buena calidad, en la industria de alimentos, farmacéutica.

- Dar lugar a fuentes de trabajo en el sector agrícola y en la industria esto permitirá obtener mejores ingresos económicos y mejorar la calidad de vida.

1.2.6 LA FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿La variación de la temperatura influye en la estabilidad de las antocianinas en la extracción del pigmento a usarse como colorante ?

1.2.7 INTERROGANTES

¿La extracción de colorante de la col morada será un proyecto rentable en la industria alimentaría?

¿Las variación de la temperaturas influirá significativamente en la estabilidad de las antocianinas extraídas a usarse como colorante ?

¿La producción del colorante rojo de la col morada será factible con rendimientos que cubran las necesidades del mercado en nuestro país?

¿Hay estabilidad de las antocianinas como colorantes en la elaboración de una bebida?

1.2.8 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Campo : Alimentario.
Área : Agroindustrial
Sub – Área : Investigación
Sector : Extracción de antocianinas como colorante
Tema : Extracción de colorante de la col morada (*Brassica oleraceae*)
para ser usado en la elaboración de una bebida

1.3 JUSTIFICACIÓN

El uso de colorantes en la actualidad 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 por parte del consumidor depende en buena medida de su apariencia y, por tanto, también de su color. Esta es la principal razón para el uso de colorantes en alimentos, productos con un valor subjetivo del que se espera que no genere riesgos para la salud. Por lo cual el consumidor a 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

El método de obtención es de fácil aplicación similar al que se utiliza para la extracción colorantes naturales, pero la investigación se basa en la extracción de colorante de col morada para ser usado en la elaboración de una bebida y observar la influencia este colorante en el tono del producto elaborado

La realización de este trabajo trae consigo el aprovechamiento de los recursos con los que cuenta nuestro país como es la col morada en especial el desperdicio de las hojas de col morada la cuales en muchas ocasiones son desechadas por pequeños daños que sufren después de la cosecha, y de esta manera dar lugar a un colorante natural que influye de manera importante en la aceptación de una bebida.

Al obtener un colorante natural se beneficiaría el sector agrícola ya que la col morada podrá ser utilizada no de la forma convencional que es de consumo fresco, si no que se le dará una nueva alternativa como es la extracción de un colorante natural para bebidas.

Al introducir en el mercado un colorante natural que cumpla con las características apropiadas para el uso en bebidas se fomentaría la industria y se realizarán investigaciones que permitan el mejor aprovechamiento de los recursos que tiene nuestro país.

1.4 Objetivo General

- Extracción de colorante de col morada (*Brassica oleraceae*) para ser usado en la elaboración de una bebida.

Objetivos Específicos

- Extraer las antocianinas (cianidina- 3- saporósido- 5 glucósido) presentes en la col morada usando el método de solventes (Wrosltd 2001)
- Extraer las antocianinas (cianidina- 3- saporósido- 5 glucósido) presentes en la col morada usando el método con enzimas Pectinex Ultra SP
- Conocer el efecto que produce la temperatura en la estabilidad de las antocianinas extraídas de la col morada (*Brassica oleraceae*)
- Determinar en una bebida el efecto de la tonalidad del colorante rojo obtenido de la col morada (*Brassica oleraceae*)
- Realizar un análisis sensorial para estudiar la aceptabilidad del color al comparar con el uso de colorante artificial

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

En la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos se ha realizado tres tipos de extracciones de colorante de achiote, de curcuma, remolacha, y una tesis de grado "Extracción, identificación y cuantificación de pigmentos totales del colorante obtenido de la col morada (*Brassica oleraceae*) realizada por Ing. Aida M. Caisaguano e Ing. Maria Sanchez. Pero no se ha realizado nada con respecto a extracción de colorante de col morada utilizando dos métodos diferentes: método de (Wrolstad 2001) y método de enzimas Pectinex Ultra SP. Las dos primeras extracciones se disuelven en aceite, el de remolacha se disuelve fácilmente en agua, por tanto el proceso de extracción es distinto ya que se realiza tanto por el método con solventes como con el uso de enzimas.

2.2 FUDAMENTACIÓN FILOSÓFICA

2.2.1 ANTOCIANINAS

2.2.1.1. Estructura

Los flavonoides son compuestos de 15 carbonos que se encuentran en todo el reino vegetal. La estructura básica de los flavonoides, comúnmente se ve modificada de tal forma que se presentan aún más enlaces dobles, lo que hace que los compuestos absorban luz visible, dándoles color. Los dos anillos de carbono en los extremos izquierdo y derecho de la molécula se designan A y B, respectivamente. El anillo A y el oxígeno del anillo central se derivan por completo de unidades acetato proporcionadas por el acetil CoA. En los flavonoides casi siempre se presentan grupos hidroxilo, sobre todo unidos al anillo B en las posiciones 3' y 4' o en las posiciones 5 y 7 del anillo A, o en la posición 3 del anillo central. (Biochemistry & Molecular Biology of Plants", Buchanan B, Grissem W y Jones R. (Editors). American Society of Plant Biology Publisher, USA, 2000).

La estructura química de la antocianinas se caracteriza por poseer dos anillos aromáticos, unidos por un puente de tres carbonos a los cuales pueden estar unidos a uno o más grupos hidroxilo, siendo esta la estructura básica de todo polifenol (Badui,1987).

Lo que las caracteriza a las antocianinas es que poseen un oxígeno protonado; y que presenta uno o más grupos azúcar unidos al carbono 3 del anillo C.

La capacidad antioxidante tiene directa relación el número de grupos hidroxilos unidos a los carbonos de los anillos, entre mayor numero de grupos -OH mayor capacidad antioxidante.(Gross, 1987).

Los monosacáridos que se encuentran son D-Glucosa, D. Galactosa, L-Ramnosa, D-arabinosa, D-xilosa, también se pueden contener oligosacaridos como gentobiosa, rutinosa y soforosa, Por los generar los monosacáridos se unen con los grupos hidroxilos de la posición 3 de la antocianidina, mientras que los disacáridos lo hacen con hidroxilos 3 y 5 o bien con las posiciones 3 y 7 (Badui,1987). El azúcar presente en la molécula otorga mayor estabilidad y solubilidad (Gross, 1987)

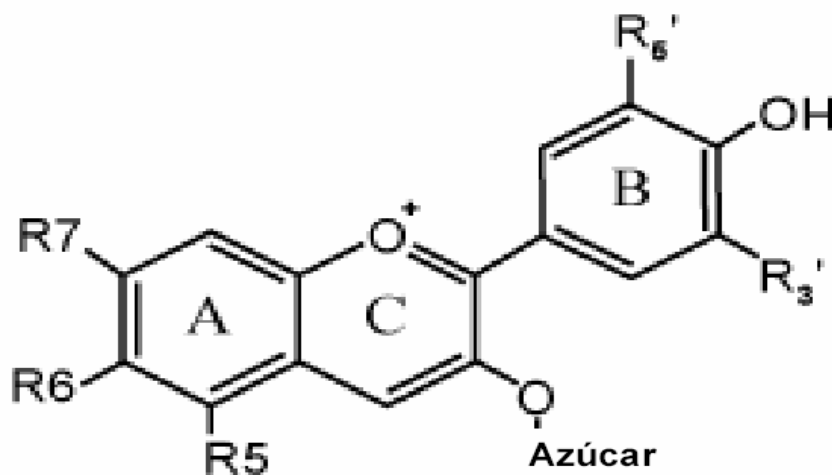


Fig2 . Estructura de las antocianinas

Por lo general es probable que la misma antocianina interaccione con mas de una clase de carbohidratos para formar diferentes antocianinas, es a si que la

pelagodina es la que a el color rojo escarlata de algunas flores y frutos como las fresa (Badui 1981).

En las berenjenas se encuentra la delfinidina, en la col roja, ciruelas entre otros se encuentra la cianidina (Badui 1981)

2.2.1.2 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas son relativamente inestables, siendo únicamente su comportamiento aceptable cuando se encuentran en medio ácido, se degradan cambiando el color durante el almacenamiento sobretodo cuando es mas elevada la temperatura. En general los pigmento antocianinicos son notoriamente destruidos por el calor durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos, existe un incremento logarítmico con un incremento aritmético de la temperatura (Markakis 1982)

El tono y la estabilidad tienen una fuerte influencia de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo. La degradación no solo ocurre durante la extracción del tejido de la planta sino también durante el proceso y almacenaje de alimento o bebida (Markakis 1982)

Los grupos hidroxilo, metoxilo, azucres y azucres asiladas tienen un efecto marcado en el color y la reactividad de las antocianinas. El color es influido por los rangos fisicoquímicos. Generalmente conforme se incrementa el grupo hidroxilo fenolitos, el color se transforma de rosa a azul, observándose el efecto inverso con los grupos metoxilo (Mazza y Broullard 1987).

Un estudio de la estabilidad de col morada mostró que cuando se calienta 5 horas la absorbancia de la muestra decrece significativamente en los 30 minutos, luego sigue un decremento mas gradual al parecer lineal (Sapers 1981)

En general, las características estructurales que llevan a una estabilidad en un pH mayor, le da también estabilidad térmica (Fenenman 1996)

Sipson e investigadores(1976) nombran dos mecanismos para la degradación térmica de las antocianinas:

- Hidrólisis del enlace 3- glicosídico que produce más alicano disponible
- Ruptura hidrolítica del anillo pirilio, que degrada a un compuesto café insoluble por su naturaleza polifenólica

Cabe tener en cuenta que las soluciones de antocianinas se secan por aspersión, a temperaturas mayores a 100 °C, donde ocurre degradación del color, mientras que las temperatura por debajo de 90 °C la degradación es menor.

2.2.1.3.LA COPIGMENTACION

Por medio de la copigmentación se obtiene un color mas intenso, brillante y estable de las antocianinas, ya que en la naturaleza las antocianinas se encuentran asociadas a ciertos compuestos mediante interacciones débiles. (Mazza1995)

El efecto principal de los copigmentos es producir junto con las antocianinas, bajo condiciones deseables, un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda y un incremento en la absorbancia de la banda en el espectro visible, por lo que se obtiene soluciones de mayor color (efecto hiperocrómico) (Scheffeld y Hrazdina 1978)

Dentro de los copigmentos se incluyendo los flavonoides, alcaloides , aminoácidos, nucleótidos, así como también las mismas antocianinas pueden servir como de copigmento para otras antocianinas (Markakis 1982).

2.3 FUNDAMENTACION LEGAL

El estudio a realizarse se apegara a Fracciones del Reglamento de Preservativos de 1925- 1927 y a las actualizaciones e innovaciones que ha tenido este reglamento que ha sido , establecido por la Comunidad Europea,

así como también a las Normas de Aditivos Alimentarios permitidos por el Codex Alimentario .

2.4 CATEGORIAS FUNDAMENTALES

La extracción de colorante de col morada permitirá a la industria alimenticia tener una alternativa para la elaboración de un colorante natural que permita disminuir el consumo de productos sintéticos , para realizar la investigación se utilizara como materia prima la col morada(*Brassica oleraceae*) de fácil obtención en los mercados nacionales, así como también se utilizará solventes para el primer método de extracción y las enzimas Pectinex Ultra SP para el segundo método de extracción

2.4.1 EXTRACCION DE PIGMENTO

2.4.1.Primer Método por solventes (Wrolstad 2001)

- Recepción de la materia prima
- Lavar las hojas de col morada
- Cortar las hojas de col morada
- Mezclar 600g de col con 1 litro de agua acidificada con acido cítrico por cada 100g de col
- Calentar hasta llegar a una temperatura de 93 C por 5 minutos
- Enfriar y dejar reposar 24h
- Filtrar en un embudo Buchner con papel filtro whatman usando 1.5 cm de una resina absorbente de grupos fenolicos de polivinilpoli- pirrolidona (PVPP), la cual se activara con etanol acidificado y agua acidificada para atrapar el pigmento cianidina- 3- saporósido- 5 glucósido.
- Obtención las antocianinas con el etanol acidificado.
- Concentrar las antocianinas en alcohol acidificado en un rotavapor Buche 461 en condiciones de vacío(20 in Hg) a una temperatura de 50C durante 35 minutos para de esta manera poder eliminar la porción alcohólica
- Realizar una prueba de transmisión y absorbancia de luz con un espectrofotómetro diluyendo 0.1 ml de colorante en 19 ml de agua destilada, se trabaja a longitud de onda de 540 nm

- Mantener el extracto del pigmento en un frasco de vidrio bien tapada a temperatura de 5 °C hasta su uso

2.4.1.2 Segundo Método con uso de enzimas Pectinex Ultra SP

- Recepción de la materia prima
- Lavar las hojas de col morada
- Cortar las hojas de col morada
- Mezclar 600g de col con 1 litro de agua acidificada con ácido cítrico por cada 100g de col
- Calentar hasta llegar a una temperatura de 93 C por 5 minutos
- Enfriar y dejar reposar 24h
- Acondicionar el jugo a 50 C y luego adicionar la enzima Pectinex Ultra SP a una concentración de 0.02 ml/ lt
- Dejar reposar por dos horas
- Tomar 3 lt de jugo adicionado enzima con 1.5 lt de etanol a 65 %
- Filtrar en un embudo Buchner con papel filtro whatman usando 1.5 cm de una resina absorbente de grupos fenólicos de polivinilpoli- pirrolidona (PVPP), la cual se activara con etanol acidificado y agua acidificada para atrapar el pigmento cianidina- 3- saporósido- 5 glucósido.
- Obtener las antocianinas con el etanol acidificado.
- Concentrar las antocianinas en alcohol acidificado en un rota vapor Buche 461 en condiciones de vacío (20 in Hg) a una temperatura de 50C durante 35 minutos para de esta manera poder eliminar la porción alcohólica.
- Realizar una prueba de transmisión y absorbancia de luz con un espectrofotómetro diluyendo 0.1 ml de colorante en 19 ml de agua destilada, se trabaja a longitud de onda de 540 nm.
- Mantener el extracto del pigmento en un frasco de vidrio bien tapada a temperatura de 5 °C hasta su uso.

Fig.3 DIAGRAMA DE FLUJO DE EXTRACCION DEL PIGMENTO POR EL METODO DE SOLVENTES (Wrolstad 2001)

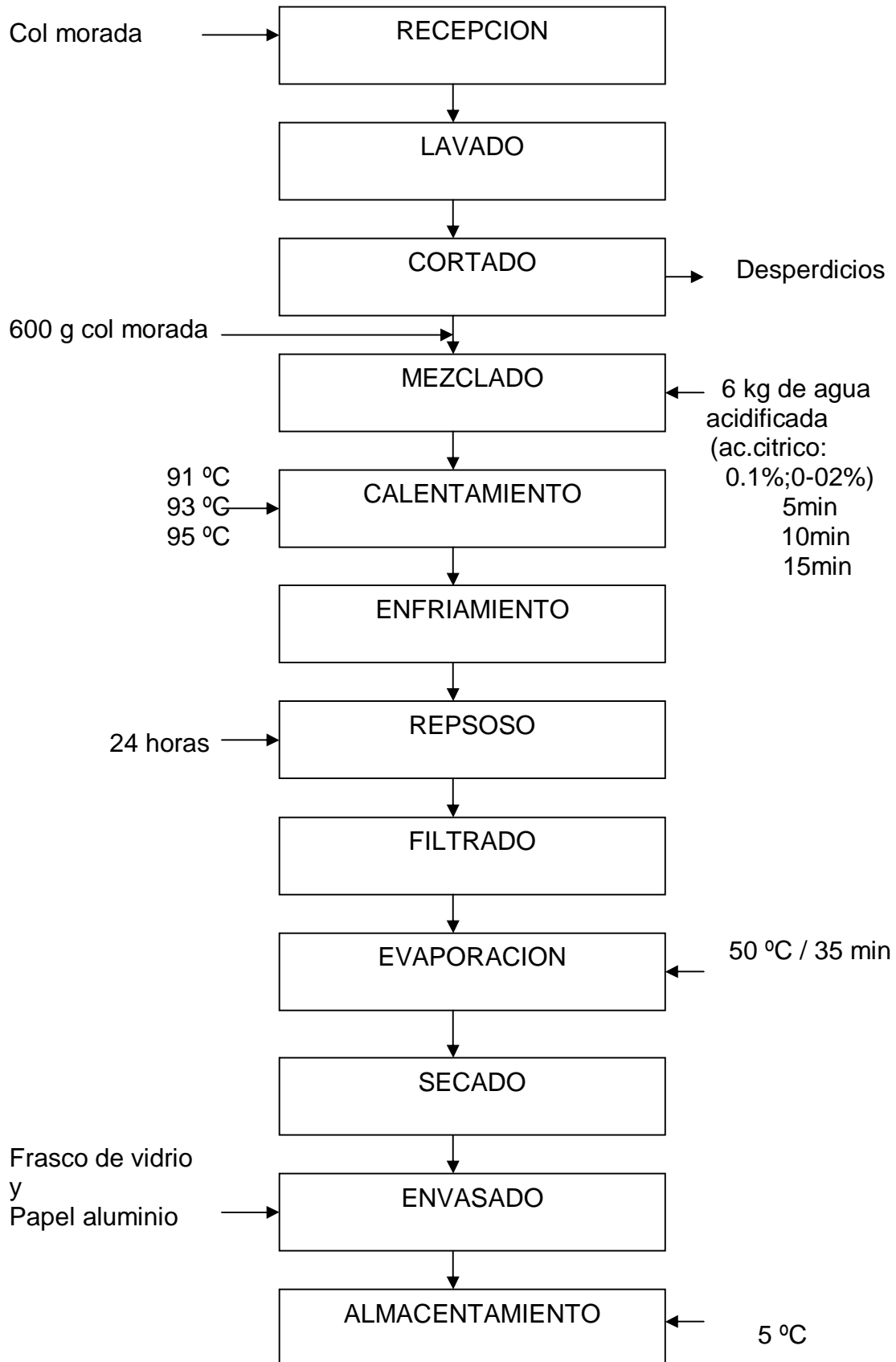
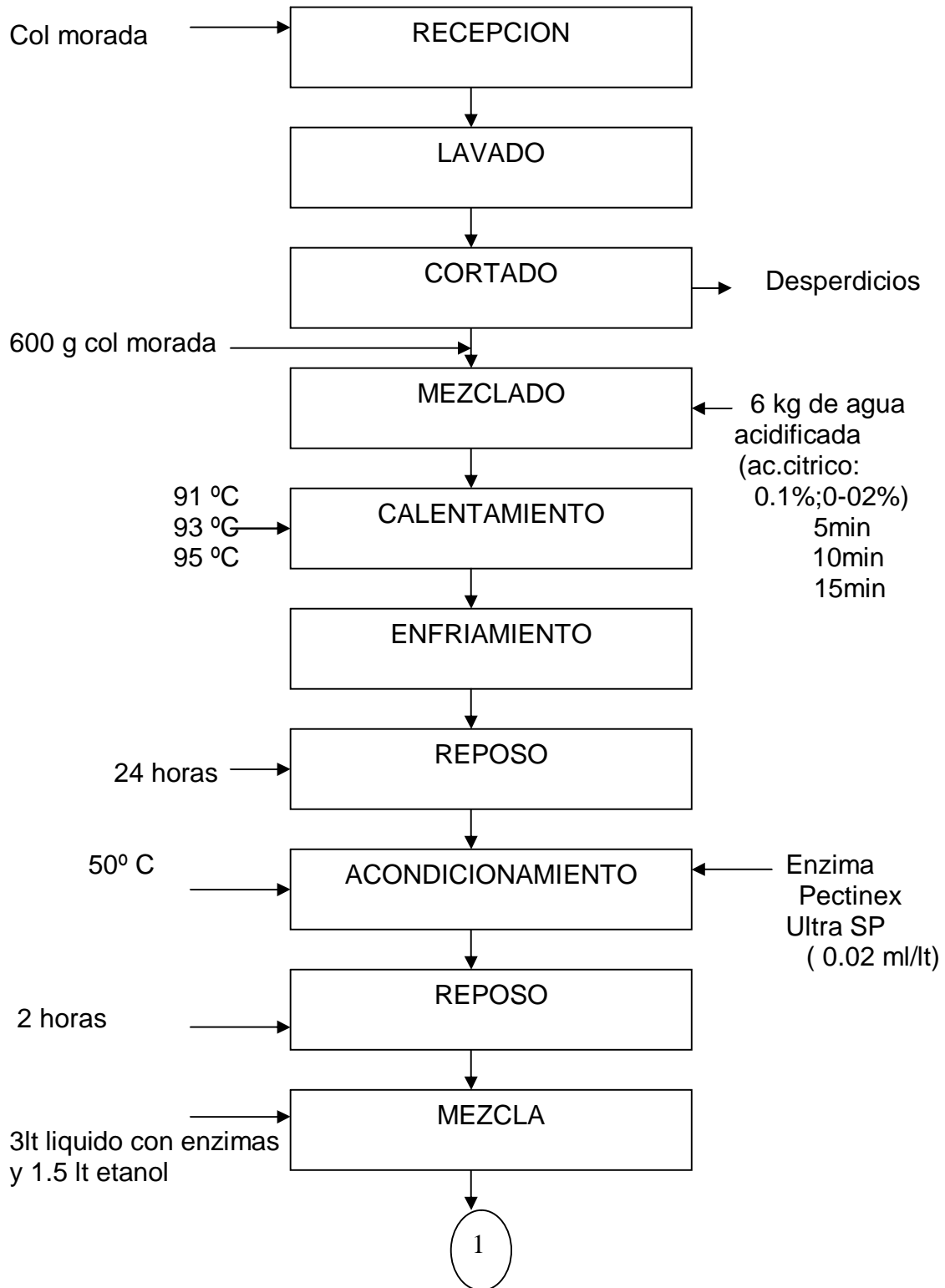
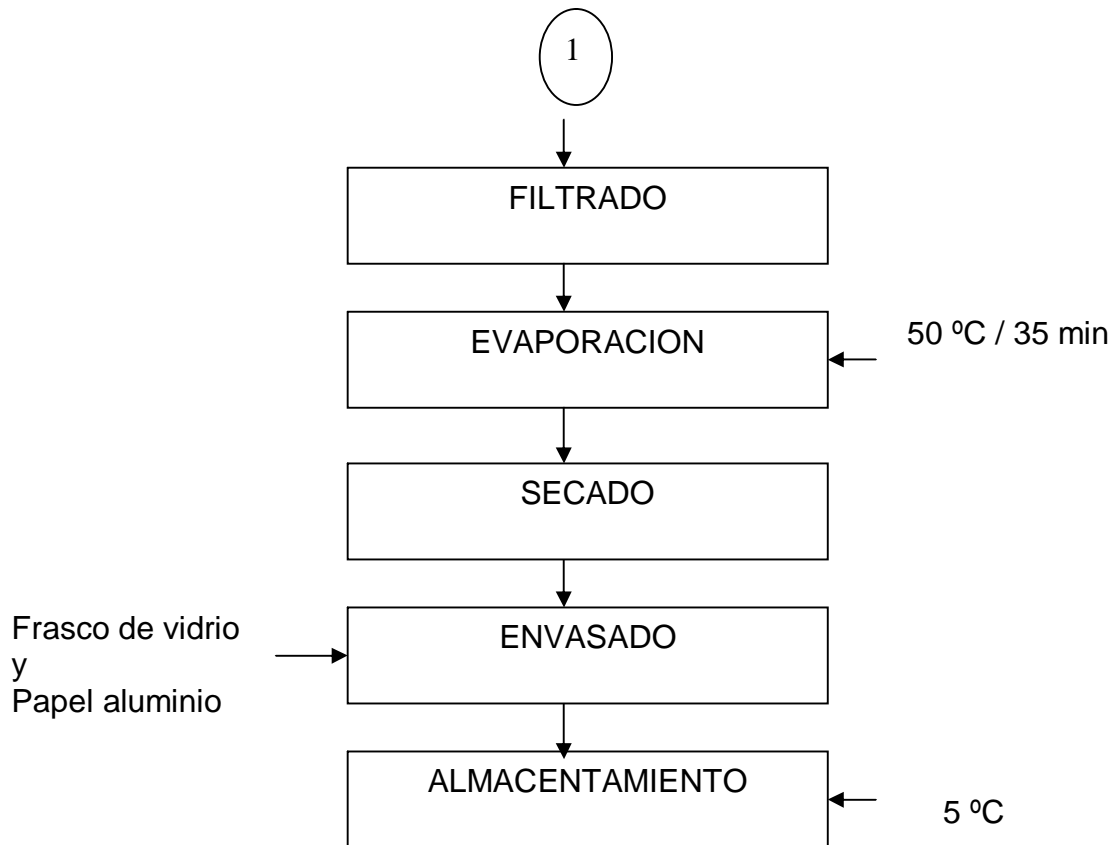


FIG 4. DIAGRAMA DE FLUJO DE EXTRACCION DEL PIGMENTO POR EL METODO CON ENZIMAS PECTINEX ULTRA SP





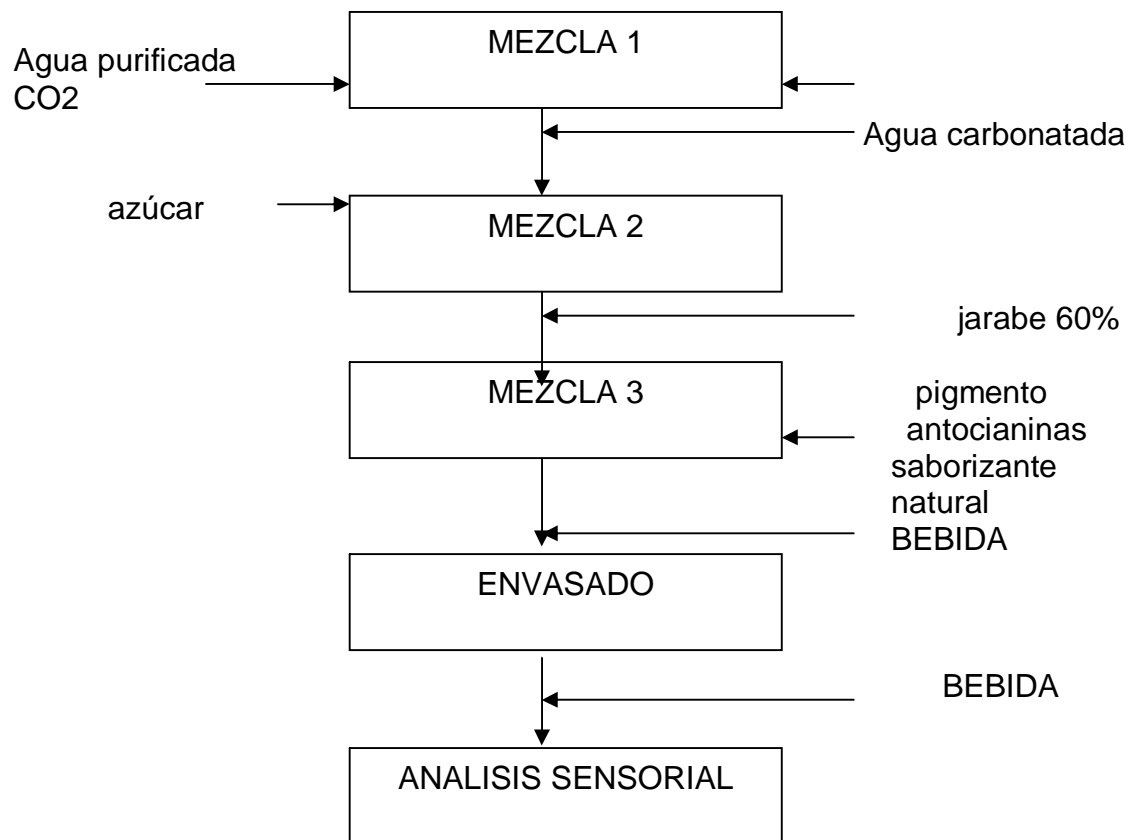
2.4.2 PREPARACION DE LA BEBIDA

Se elaboran 3 bebidas de sandía para compararlas; la primera se elabora sin añadir ningún colorante, la segunda y tercera se le añade el pigmento extraído de color rojo por los diferentes métodos para lo cual se tomaran las concentraciones necesarias de antocianinas de col morada, a la cuarta bebida se le añade colorante artificial. Luego se realizará un análisis sensorial.

La elaboración de la bebida es similar con el pigmento extraído por el método de solventes y el método con enzimas

- Mezclar agua purificada
- Mezclar el agua carbonatada con azúcar (jarabe)
- Añadir colorante al jarabe
- Obtener la bebida
- Realizar un análisis sensorial

Fig 5. DIAGRAMA DE FLUJO PARA PREPARACION DE BEBIDA



2.5 HIPOTESIS

Ho: El método de extracción, la temperatura, el tiempo no afectan a la extracción del un colorante natural

Hi: El método de extracción, la temperatura, el tiempo afectan a la extracción del un colorante natural

2.6 SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES

2.6.1 Variable Independiente

Método de extracción

Temperatura

Tiempo

2.6.2 Variable Dependiente

Rendimiento del colorante en una bebida

CAPITULO III METODOLOGIA

3.1 ENFOQUE

La investigación tendrá un enfoque bibliográfico, para luego llevarla a un aspecto cuantitativo y cualitativo.

3.2 MODALIDAD BASICA DE LA INVESTIGACIÓN

En el estudio se utilizará la bibliografía para la parte teórica, y para la descripción de los métodos a emplear se utilizaran todos los recursos presentes en la Biblioteca de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, así como el uso de Internet.

Se realizará una investigación de campo en laboratorios equipados con los instrumentos adecuados.

3.3 NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación se llevará a un nivel asociativo de variables ya que se relacionará cuatro variables: tres independientes(método de extracción de las antocianinas , temperatura, tiempo) y una dependiente (rendimiento del colorante en una bebida)

3.4 POBLACION Y MUESTRA

El diseño experimenta a utilizarse será de tipo A*B*C con 18 tratamientos con una sola replica

FACTORES DE ESTUDIO

A= METODOS DE EXTRACCION

Ao = método de Wrolstad

A1= método de extracción con enzimas(Pectinex Ultra SP)

B= TEMPERATURA

Bo = 91 C

B1= 93 C

B2= 95 C

C = Tiempo de calentamiento

Co = 5 min

C1= 10 min

C2= 15 min

Se realizará un análisis sensorial con la bebida obtenida

(formato de evaluación sensorial anexo 1)

3.5 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLES INDEPENDIENTES

TABLA 2 Variables Independientes

Conceptualización	categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas e instrumentos
Métodos de extracción	Extracción de antocianinas	Método de extracción del pigmento	Ao = método de Wrolstad A1= método de extracción con enzimas(Pectinex Ultra SP)	Espectrofotómetro Longitud de onda 540 nm
Temperatura	Variación de la temperatura	Efecto de la temperatura en la estabilidad	Bo = 91°C B1= 93 °C B2= 95 °C	Termómetros a escala de -10 a 250 C

		del pigmento		
Tiempo	tiempo optimo	Influencia del tiempo en la extracción del pigmento	Co = 5 min C1= 10 min C2= 15 min	Cronómetro

VARIABLE DEPENDIENTE

TABLA 3 Variables

Conceptualización	categorías	Indicadores	Ítems	Técnicas e instrumentos
Uso del colorante en una bebida	Tecnología de alimentos	Eficiencia de la extracción	Relación peso final y peso inicial determinará el rendimiento del colorante	
	Análisis	Análisis físico químico	Determinar el contenido de antocianinas	Método de pH diferencial (wrolstad 2001)
		Análisis de colorimetría	Influencia del colorante en la tonalidad de la bebida	
		Análisis sensorial	Determinar las características organolépticas del pigmento en la bebida	Formato de análisis sensorial

3.5.1 Técnicas e Instrumentos

Determinación del contenido de antocianina

La determinación se la puede realizar mediante el método de pH diferencial reportado por Wrolsta (2001), de la siguiente forma

Concentración de antocianina (mg/l) = (Ax MWx DF x 100) / (ε x1)

$A = (A_{\lambda_{vis - max}} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{\lambda_{vis - mas}} - A_{700})_{pH4,5}$

$A_{\lambda_{vis - mas}} - A_{700}$ = absorbancia máxima del pigmento

ε = Absorbancia molar en referencia a la cianidia – 3- glucosido que es 37150

Mw = peso molécula de la antocianina en referencia a la cianidia –3- glucosido que es 611,4

DF = factor de dilución empleado

Procedimiento :

Tomar de 2 ul de muestra Beida, agregarle 700 ul de buffer ph 1

Tomar de 2 ul de muestra Beida, agregarle 700 ul de buffer ph 4,5

Usar un espectrofotómetro para ambas muestra en rango de luz visible (400-800 nm)

Con los valores de $A_{\lambda_{vis - max}}$ obtenidos anteriormente del pigmento a dos distintos pH se calcula la concentración del pigmento

3.6 RECOLECCION DE LA INFORMACION

Se recolectara la información necesaria con el uso de laboratorio para todas las muestras plateadas en el Diseño Experimental, obtenidas por media de las personas adecuadas. Se trabajará con 2 métodos de extracción, 3 temperaturas y 3 tiempos, la variable de respuesta será el rendimiento.

3.7 PROCESAMIENTO Y ANALISIS

En el procesamiento y análisis de datos se utilizará programas de cálculo como Excell, para datos teóricos Word, y para el análisis estadístico se usara paquetes estadísticos STATGRAPHICS, SPS

CAPITULO IV

MARCO ADMINISTRATIVO

4.1 RECURSOS

4.1.1 RECURSOS INSTITUCIONALES

- Laboratorio de Análisis de Alimentos de la F.C.I.A.L
- Laboratorio de Físico – Química de la F.C.I.AL
- Laboratorio de Informática y Estadística de la F.C.I.AL

4.1.2 RECURSOS HUMANOS

- Tutor del Proyecto: Profesor F.C.I.A.L (Ing. Gladys Navas)
- Trabajo personal: Giovanna Gabriela Castillo Burbano
- Coordinación: Ing. Aníbal Saltos

4.1.3 RECURSOS MATERIALES

Materia Prima

- Col morada

Equipos

- Frascos de vidrio
- Erlenmeyers
- Vasos de precipitación
- Embudo Buchner
- Rota vapor Buche 461
- Estufa
- Refrigeradora
- Enzimas
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Computador
- Material de escritorio
- Material bibliográfico
- Otros

4.1.4 RECURSOS ECONOMICOS

RUBROS	LOS QUE APORTAN	
	UTA	GRADUANDOS
Personal	1100	900
Bibliografía	20	70
Materia prima		280
Equipos	160	170
Uso laboratorio	120	
Material de escritorio		130
Pasajes		30
Imprevistos		100
Publicacion		200
SUMA	1400	1880
	TOTAL	3280

El total será financiado por el graduando

3 BIBLIOGRAFIA

- Badui. D.S:1981 "Química de los Alimentos", Tercera Edición, Alambra Mexicana, México
- Beristáin,L: "Estudio de la reacción de copolimerización de antocianinas provenientes de la col morada con catequiza y acetaldehído en sistemas modelo", Tesis de Grado. Departamento de Ingeniería Química de Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas, Puebla México
- Coulate,T.P:1984" Alimentos": Química de sus componentes, Editorial Acribia, Zaragoza-España
- Eiro, M , HEINONE M: 2002" Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage", Effect of Intermolecular Copigmentation, Journal of Agricultural Food Chemistry: 50)25=, 7461-7466
- Francis,F.J: 1989" Food colorants:Anthocyanis. Crit.Rev.Food Sci .Nut, 28, 273-314
- Harbone,J.B:1989."Plant Phenolics in Methods in Plant Biochemistry", Academic Press.London
- Huerres, Consuelo,1991 " Horticultura";Editorial Pueblo y educación; Primera Edición; México D.F; México; Pág. 105-110
- Markakis,P.: 1982"Anthocyanins as Food Colors.Academic Press, NY.USA
- Mazza.G. 1995: "Anthocyanins in fruits, vegetables and grains.CRC Press. London
- Wroslad,R.. 2001 " Extraction, Insolation, and Purification of Anthocyanins, Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Copyright 2001 by John Wiley ans Sons. Inc
- Wroslad,R.E 2001 "Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV- Visible Spectroscopy.Current Protocols in Food Analytical Chemistry Copyright 2001 by John Wiley and Sons.Inc

- <http://www.botoard.ucla.edu/html/botanytextbooks/generalbotany/shootfaatures/generalstructure/leafcolor/a0897tx.html>
- <http://www.2k-software.de/ingo/farbe/nflavon.html>
- <http://www.h.chiba-u.ac.jp/florista/monotoricho/ando-iro/petuina-iroE.htm>
- <http://www.loonevware.com/press/phytochemistry/aboutflavonoids.php>
- <http://www.verdurasconsumer.es.htm>
- <http://www.iica.com.gov.ec>

ANEXO 1

Tabla 4.FORMATO DE EVALUACION SENSORIAL

CARACTERISTICAS	ALTERNATIVAS	MUESTRA Nº		
		1	2	3
COLOR	Agradable			
	Caracteristico			
	Normal			
	Ligeramente coloreado			
	Desagradable			
OLOR	Agradable			
	Normal			
	Ligeramente coloreado			
	Desagradable			
	Sin olor			
SABOR	Agradable			
	Normal			
	Ligeramente Perceptible			
	Desagradable			
	Insipido			
ACEPTABILIDA	Agrada mucho			
	Agrada poco			
	Ni agrada ni desagrada			
	Desagrada poco			
	Desagrada mucho			

Nota

muestra 1 bebida con colorante sintético

muestra 2 bebida con colorante natural por método de solventes

muestra 3 bebida con colorante natural con método con enzimas

Tabla 5. Componentes de la col morada

Componentes	Cantidad
Agua	91%
Hidratos de carbono	5% (fibra 1%)
Proteínas 2	6%
Lípidos 0	2%
Potasio	210 mg/100 g
Sodio	28 mg/100 g
Fósforo	23 mg/100 g
Calcio	42 mg/100 g
Hierro	5 mg/100 g
Vitamina C	46 mg/100 g
Vitamina A	6 mg/100 g

Fuente: **INFOAGRO.COM - Portal líder en agricultura.**

GLOSARIO

Antocianina: (del griego: *anthos*= flor, y *kyáneos*= azul) Cada uno de los pigmentos que se encuentran disueltos en el citoplasma de las células de diversos órganos vegetales, y a los cuales deben su color las corolas de todas las flores azules y violadas y de la mayoría de las rojas, así como también el epicarpio de muchos frutos.

Carotenoides: Pigmentos ampliamente distribuidos en plantas y animales, y que incluyen a carotenos y xantofilas.

Cianidina: antocianinas que confieren el color rojo

Colorantes: Los colorantes son sustancias de origen natural o artificial que se usan para aumentar el color de los alimentos, ya sea por que el alimento a perdido color en su tratamiento industrial o bien para hacerlo más agradable a la vista y más apetecible al consumidor.

Colores sintéticos: colorantes que son obtenidos químicamente

Colores naturales: pigmentos extraídos de plantas

Delfinidina: antocianinas que confieren el color azul

Enzima.- es una biomolécula capaz de catalizar (aumentar la rapidez) una reacción química. Su nombre proviene del griego *énsymo* (dentro de la levadura). Las enzimas tienen una estructura tridimensional sin la que no pueden desarrollar su actividad. En esa estructura poseen un centro activo al que se unen los sustratos y en el que se produce la reacción catalítica

Flavonoides: son los pigmentos más comunes y contribuyen a un amplio rango de colores que va desde el amarillo hasta el rojo y el azul. Los flavonoides que más contribuyen a la formación de colores son las antocianinas, entre ellas el color anaranjado está dado por la pelargonidina, el rojo por la cianidina y el azul por la delfinidina.

Grupos hidroxilo.- Se utiliza el término **grupo hidroxilo** cuando el grupo funcional -OH se cuenta como un sustituto de un compuesto orgánico. Las moléculas orgánicas que contienen el grupo hidroxilo son conocidas como alcoholes.

Hidrólisis: Rotura de un enlace por adición de los elementos del agua, dando dos o más productos

Monosacáridos: .Glúcido formado por una sola unidad de azúcar

Pelargonidina: antocianinas que confieren el color anaranjado

Pigmento: Sustancia colorante que, disuelta o en forma de gránulos, se encuentra en el citoplasma de muchas células vegetales y animales.

Polifenol: Compuesto orgánico de naturaleza glucídica con poder antioxidante

Xantófilas: Grupo de carotenoides amarillos o pardos, que son derivados oxigenados de los carotenos y que están ampliamente distribuidos en plantas.