

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

PROYECTO DE GRADO



**OBTENCIÓN EXPERIMENTAL DE COLORANTE NATURAL
(ANTOCIANINAS) DE MORA (*Robus ulmifolius*) CULTIVADA EN
EL DEPARTAMENTO DE TARIJA**

Por:

CARMEN LISSET CUEVAS MERCADO

**Modalidad de graduación (investigación aplicada) presentado a consideración de
la “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO”, como
requisito para optar el grado académico de Licenciatura en Ingeniería Química.**

Marzo 2021

TARIJA-BOLIVIA

Dedicatoria

El presente proyecto de grado va dedicado especialmente a mi abuela Fidelina Ríos, a mi madre Neddy Mercado y a mi hermana Viviana Cuevas quienes siempre mostraron su apoyo incondicional en todos estos años, que me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

ÍNDICE.....	Pág
-------------	-----

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Usos y aplicaciones del colorante natural	3
1.3 Aspectos del Mercado	4
1.3.1 Oferta de colorantes naturales	4
1.3.2 Demanda de colorantes naturales.....	5
1.3.2 Precios de Antocianinas	7
1.4 Objetivos	8
1.4.1 Objetivo General.....	8
1.4.2 Objetivos específicos	8
1.5 Justificación	9
1.5.1 Justificación Económica	9
1.5.2 Justificación Tecnológica	9
1.5.3 Justificación Social	10
1.5.4 Justificación Ambiental.....	10

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Caracterización de la materia prima	11
2.1.1 Descripción Botánica de la Mora	11
2.1.1.1 Rubus ulmifolius.	11
2.1.2 Caracterización fisicoquímica de la materia prima	12
2.1.3 Propiedades de la mora	14
2.1.4 Disponibilidad Regional de Mora	15
2.2 Definición de Colorante	15
2.3 Clasificación de los Principales Colorantes Naturales	16
2.3.1 Carotenoides	16
2.3.2 Anticancerígenos	16

2.3.3 Flavonoides	17
2.3.4 Betalaínicos	17
2.3.5 Insectos	17
2.3.6 Organismos marinos	18
2.4 Definición de Antocianinas	18
2.4.1 Estructura de las Antocianinas	20
2.4.2 Biosíntesis de las Antocianinas.....	21
2.4.3 Factores que Afectan la Estabilidad de las Antocianinas	24
2.4.3.1 Temperatura	24
2.4.3.2 Iones metálicos	24
2.4.3.3 pH	24
2.4.3.4 Copigmentación	25
2.4.3.5 Agua	27
2.4.4 Determinación de las Antocianinas	27
2.4.4.1 Determinación de antocianinas de forma total	27
2.4.4.2 Ley de Lambert-Beer	28
2.4.4.3 Espectrofotometría	29
2.5 Métodos empleados para la Extracción de Colorante Natural (Antocianinas)	30
2.5.1 Extracción sólido-líquido	30
2.5.1.1 Extracción solido liquido por extractor Soxhlet	31
2.5.1.2 Extracción sólido líquido por maceración	32
2.5.1.3 Extracción sólido líquido con agitación	33
2.5.1.4 Extracción por cocciones	34
2.5.2 Extracción por compresión	34
2.6 Antecedentes de investigación respecto a extracción de colorantes naturales (Antocianinas)	34
2.7 Conservación del Extracto de Antocianinas	37
2.7.1 Encapsulación	37
2.7.2 Conservación de antocianinas en estado líquido	37

CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Descripción de la Metodología general del Estudio	37
3.2 Selección del Método a utilizar	38
3.3 Selección del solvente para la extracción de Colorante Natural	41
3.4 Selección de las variables del proceso de extracción de colorante natural (antocianinas)	42
3.4.1 Temperatura	42
3.4.2 Relación soluto-solvente	42
3.4.3 pH	43
3.4.4 Granulometría	43
3.4.5 Variable respuesta: Rendimiento	44
3.5 Diseño experimental para la obtención de colorante natural (Antocianinas)	44
3.5.1 Modelo del diseño factorial	44
3.6 Equipos materiales y reactivos necesarios	48
3.6.1 Equipos	48
3.6.2 Materiales de Laboratorio	48
3.6.3 Sustancias Reactivos empleados	50
3.7 Diseño del proceso experimental	50
3.7.1 Descripción del proceso	52
3.7.1.1 Recepción de materia prima.	52
3.7.1.2 Selección y lavado de la materia prima	52
3.7.1.3 Pesado	53
3.7.1.4 Triturado	53
3.7.1.5 Extracción	54
3.7.1.6 Filtración	55
3.7.1.7 Concentración.....	57
3.7.1.8 Almacenamiento	57
3.7.1.9 Cuantificación de antocianinas	57
3.7.2 Balance de Materia y Energía	58

3.7.2.1 Balance de Materia	58
3.7.2.1.1 Balance de materia en la etapa de lavado	64
3.7.2.1.2 Balance de materia en la etapa triturado	65
3.7.2.1.3 Balance de materia en la etapa de extracción y filtración	67
3.7.2.1.4 Balance de materia en la etapa de concentración	70
3.7.2.2 Balance de Energía	75
3.7.2.2.1 Balance de Energía Rota Evaporador	75
3.7.2.2.2 Balance de energía en el condensador	78

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Análisis de la materia prima	79
4.2 Análisis de Antocianinas en la materia prima	79
4.3 Datos y resultados de los extractos	80
4.4 Análisis de extracto de antocianinas de mora	82
4.5 Determinación de la Máxima Absorbancia	83
4.6 Análisis de la concentración de antocianinas	83
4.6.1 Método pH Diferencial	83
4.7 Rendimiento de Antocianinas	87
4.8 Análisis estadístico del diseño experimental	89
4.8.1 Análisis de varianza	90
4.8.2 Determinación del rendimiento de antocianinas y modelo matemático para diseño factorial 2 ⁴	91
4.8.3 Diagrama de pareto	93
4.9 Costos	94
4.10. Costo de producción	96

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones	99
5.2 Recomendaciones	102

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I- 1 Contenido de Antocianinas en Fuentes Naturales.....	3
Tabla I- 2 Precios de Antocianinas.....	7
Tabla II- 1 Clasificación taxonómica de la mora.....	12
Tabla II- 2 Características Organolépticas de la Mora.....	12
Tabla II- 3 Composición Química de la mora.....	13
Tabla II- 4 Superficie cultivada de Mora.....	15
Tabla II- 5 Principales colorantes naturales.....	18
Tabla II- 6 Sustituyentes de las Antocianinas.....	21
Tabla III- 1 Escala de Puntuación de 1 a 5.....	38
Tabla III- 2 Criterios y ponderación.....	39
Tabla III- 3 Matriz de decisión para la selección del método de extracción de colorante natural (Antocianinas).....	40
Tabla III- 4 Ventajas y desventajas de los solventes para la Extracción de colorante natural	41
Tabla III- 5 Factores y niveles.....	45
Tabla III- 6 Codificación de variables.....	46
Tabla III- 7 Matriz de diseño.....	46
Tabla III- 8 Plan de experimentación.....	47
Tabla III- 9 Material de Laboratorio.....	49
Tabla III- 10 Datos para el Balance de Materia y Energía.....	58
Tabla III- 11 Especificaciones de las corrientes.....	61
Tabla III- 12 Especificaciones Corriente másica.....	62

Tabla III- 13 Datos de Análisis fisicoquímicos de la materia prima y producto necesarios para el Balance de materia.....	63
Tabla III- 14 Resumen de balance de materia.....	74
Tabla IV- 1 Caracterización de la materia prima.....	79
Tabla IV- 2 Tabla análisis de antocianinas en la materia prima.....	80
Tabla IV- 3 Datos y resultados de los extractos.....	81
Tabla IV- 4 Características del extracto de antocianinas.....	82
Tabla IV- 5 Resultado de análisis de antocianinas en los extractos.....	86
Tabla IV- 6 Rendimiento de Antocianinas en los Extractos.....	88
Tabla IV- 7 Resumen del diseño.....	89
Tabla IV- 8 Análisis de varianza (ANOVA).....	90
Tabla IV- 9 Resumen del modelo variable respuesta.....	91
Tabla IV- 10 Variables para la relación.....	92
Tabla IV- 11 Costos Principales.....	94
Tabla IV- 12 Costo de materiales.....	95
Tabla IV- 13 Costo de análisis.....	95
Tabla IV- 14 Otros costos.....	96
Tabla IV- 15 Resumen -Costos total.....	96
Tabla IV- 16 Costo de funcionamiento de equipos.....	97
Tabla IV- 17 Costos materia prima e insumos.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- 1 Oferta de colorantes naturales.....	5
Figura 1- 2 Consumo Global de colorantes naturales.....	6
Figura 2- 1 Fruto de mora.....	13
Figura 2- 2 Estructura del 2-fenil benzopirilio y Antocianinas.....	19
Figura 2- 3 Estructura de las antocianinas.....	20
Figura 2- 4 Biosíntesis de las Antocianinas.....	23
Figura 2- 5 Estructura de antocianinas a diferentes pH.....	25
Figura 2- 6 Interacciones de Antocianinas.....	26
Figura 2- 7 Extracción Solido-Líquido por agitación y posterior reposo.....	31
Figura 2- 8 Extracción con equipo soxhlet.....	32
Figura 2- 9 Extracción por maceración.....	33
Figura 3- 1 Descripción de la Metodología del Estudio para la obtención de colorante natural (Antocianinas).....	37
Figura 3- 2 Esquema del proceso de obtención de colorante natural (antocianinas de mora).....	51
Figura 3-3 Balance de materia para la extracción de antocianinas de mora.....	60
Figura 3- 4 Resumen Balance de materia.....	73
Figura 4- 1 Determinación de máxima absorbancia.....	83
Figura 4- 2 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados.....	93

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1- 1 Antocianinas.....	8
Fotografía 2- 1 Anatomía de la mora.....	14
Fotografía 3- 2 Selección y lavado de la mora.....	52
Fotografía 3- 3 Pesado de la mora.....	53
Fotografía 3- 4 Triturado de la materia prima.....	54
Fotografía 3- 5 Extracción del colorante natural, mediante agitación.....	55
Fotografía 3- 6 Filtración al vacío.....	55
Fotografía 3- 7 Residuos primera y segunda Extracción.....	56
Fotografía 3- 8 Concentración del extracto.....	57

RESUMEN

Las antocianinas son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios.

El color de un alimento es una de las primeras características de calidad que el consumidor percibe y que más influye en la elección del mismo.

El presente proyecto de investigación aplicada, que tiene como principal objetivo la extracción experimental de colorante natural (Antocianinas) de mora cultivado en el departamento de Tarija.

El proceso de Extracción de Antocianinas de Mora se realiza en dos etapas mediante agitación magnética con etanol acidulado con ácido cítrico como solvente y filtración al vacío, para después realizar el concentrado al vacío del Extracto de Antocianinas en un Rota Evaporador.

Los factores evaluados en el proceso de extracción de antocianinas son: temperatura; 25°C y 50°C, pH; 3,1 y 4, estado de la materia prima; mora licuada y mora cortada por la mitad, relación soluto-solvente; 1:5 y 1:10 g/ml.

La concentración de antocianinas se realiza mediante el método de pH diferencial utilizando soluciones buffer de pH 1 y pH 4,5 y realizando las lecturas de cada muestra en un espectrofotómetro UV-VISIBLE esto con la finalidad de determinar el experimento con mayor rendimiento.

El análisis estadístico de los resultados se realiza mediante el programa SPSS 18,0, a través de un diseño factorial de 2⁴. Como variable respuesta se toma el rendimiento porcentual de Antocianinas obtenidas en el proceso de extracción.

El mejor rendimiento se obtiene trabajando con pH 4, con mora licuada, temperatura de 25°C y una relación soluto/solvente de 1:10 g/ml, la concentración del extracto es: 92,34mg de antocianinas/100 ml de extracto. Una vez determinado el mayor rendimiento se realiza el balance de materia y energía. Con los datos respectivos, donde se obtiene 19 g de extracto a partir de 50,006 g de mora.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla I- 1 Contenido de Antocianinas en Fuentes Naturales

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

Fuente: Pascual Teresa, 2010.

1.2 Usos y aplicaciones del colorante natural

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

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

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

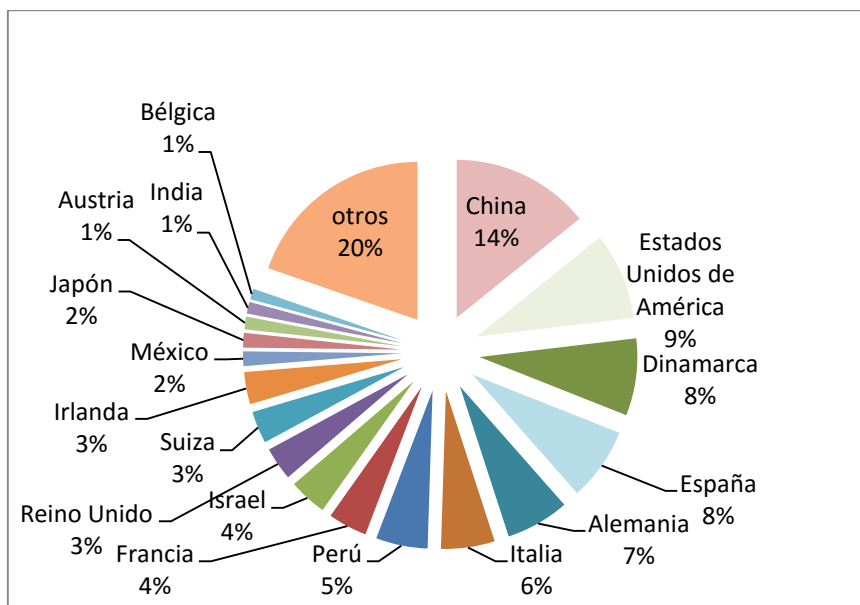
1.3 Aspectos del Mercado

1.3.1 Oferta de colorantes naturales

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

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

Figura 1- 1 Oferta de colorantes naturales



Fuente: (TRADE-MAP, 2018)

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

1.3.2 Demanda de colorantes naturales

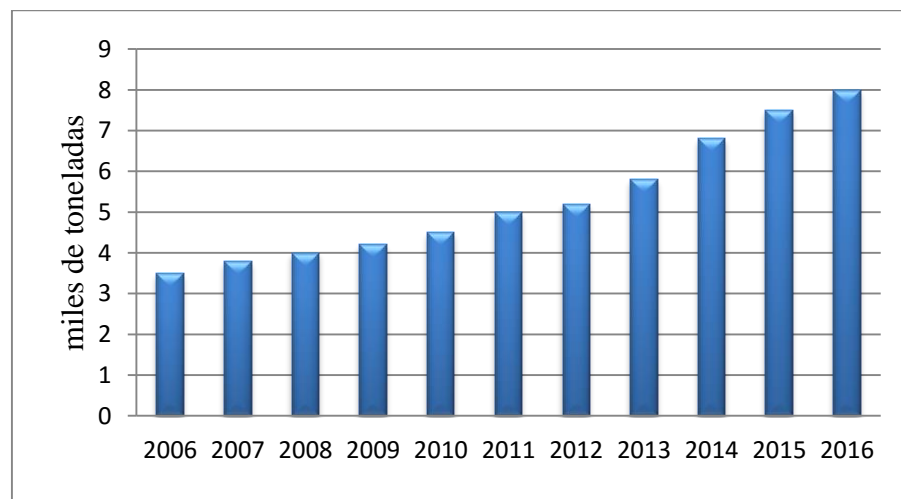
El segmento objetivo para la comercialización del producto son industrias alimenticias y aquellas que son proveedoras de los aditivos para comercializar los productos finales en el departamento de Tarija y el resto del país.

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

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

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

Figura 1- 2 Consumo Global de colorantes naturales



Fuente: (Analytics, 2016)

1.3.2 Precios de Antocianinas

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

Tabla I- 2 Precios de Antocianinas

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

Fuente (Cruz, 2019)

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

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

Fotografía I- 1 Antocianinas



Fuente: Elaboración propia 2020

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

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

1.4.2 Objetivos específicos

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

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

1.5 Justificación

1.5.1 Justificación Económica

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

1.5.2 Justificación Tecnológica

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

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

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

1.5.3 Justificación Social

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

1.5.4 Justificación Ambiental

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

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

CAPÍTULO II
MARCO TEÓRICO

2.1 Caracterización de la materia prima

2.1.1 Descripción Botánica de la Mora

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

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

2.1.1.1 Rubus ulmifolius

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

Tabla II- 1 Clasificación taxonómica de la mora

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

Fuente: (Anónimo, 2015)

Tabla II- 2 Características Organolépticas de la Mora

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

Fuente: (CIPLANE, 2008)

2.1.2 Caracterización fisicoquímica de la materia prima

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

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

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

Figura 2- 1 Fruto de mora



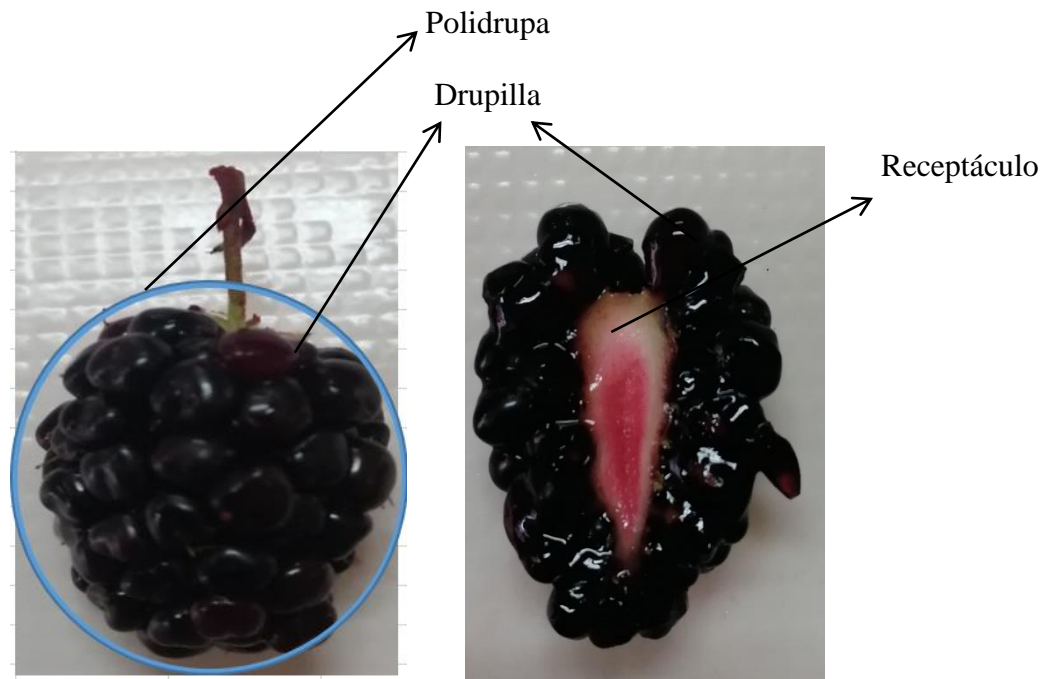
Fuente: (moreu, 2014)

Tabla II- 3 Composición Química de la mora

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

Fuente: (Anónimo, 2015)

Fotografía 2- 1 Anatomía de la mora



Fuente: Elaboración propia 2020

2.1.3 Propiedades de la mora

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

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

2.1.4 Disponibilidad Regional de Mora

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

El rendimiento de la mora en el año 2 013 alcanzó 9,2 hectáreas de superficie cultivada. tal como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla II- 4 Superficie cultivada de Mora

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

Fuente: (INE, 2013)

La producción que se obtiene por hectárea cultivada de Mora.

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

2.2 Definición de Colorante

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

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

2.3 Clasificación de los Principales Colorantes Naturales

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

2.3.1 Carotenoides

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

2.3.2 Anticánónicos

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

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

2.3.3 Flavonoides

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

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

2.3.4 Betaláinicos

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

2.3.5 Insectos

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

2.3.6 Organismos marinos

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

Tabla II- 5 Principales colorantes naturales

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

Fuente: (Flavorix, 2012)

2.4 Definición de Antocianinas

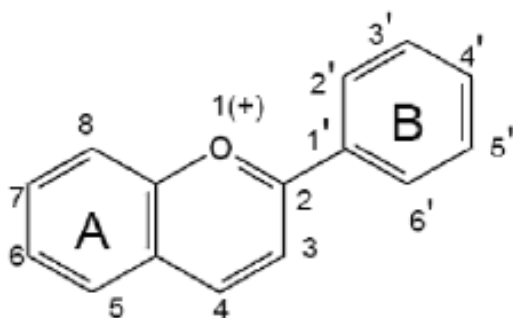
Las antocianinas son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen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

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

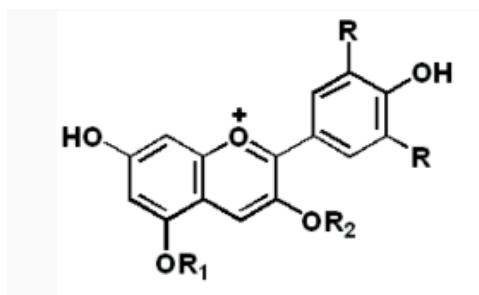
Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano.

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

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



2-fenil benzopirilio



Antocianinas

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

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

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

2.4.1 Estructura de las Antocianinas

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

Figura 2- 3 Estructura de las antocianinas

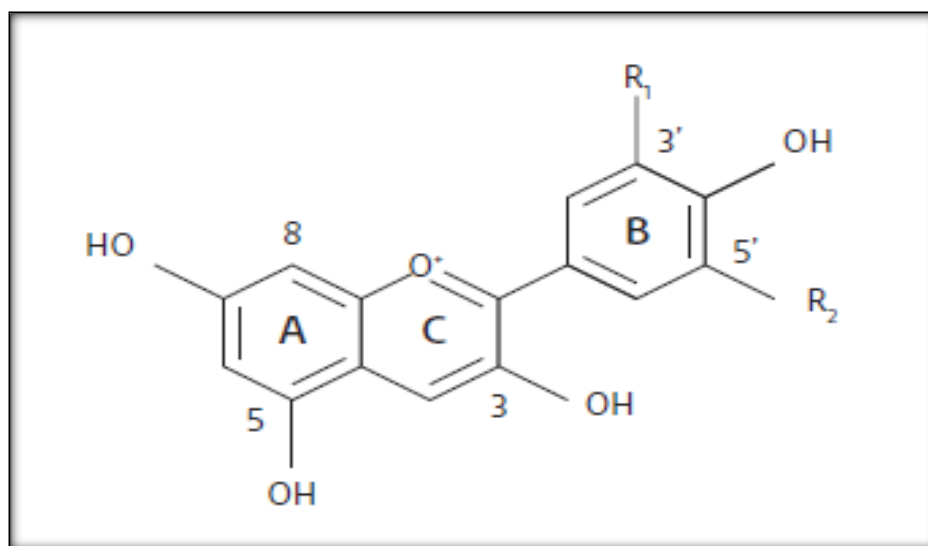


Tabla II- 6 Sustituyentes de las Antocianinas

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

Fuente: (GARZÓN, 2008)

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

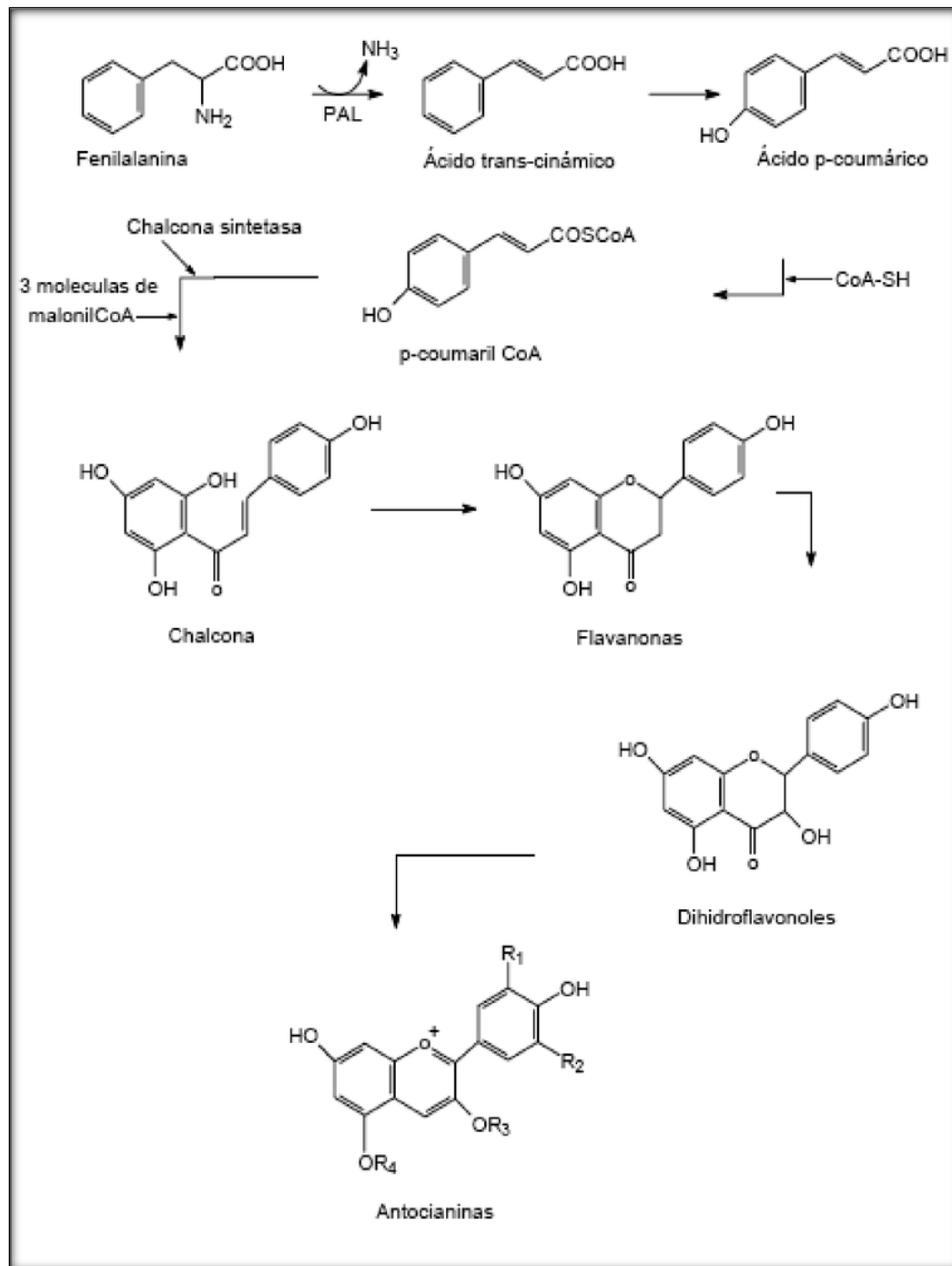
2.4.2 Biosíntesis de las Antocianinas

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

da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido p-coumárico (Figura 2-4).

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

Figura 2- 4 Biosíntesis de las Antocianinas



Fuente: (Delgado-Vargas, 2000)

2.4.3 Factores que Afectan la Estabilidad de las Antocianinas

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

2.4.3.1 Temperatura

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

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

2.4.3.2 Iones metálicos

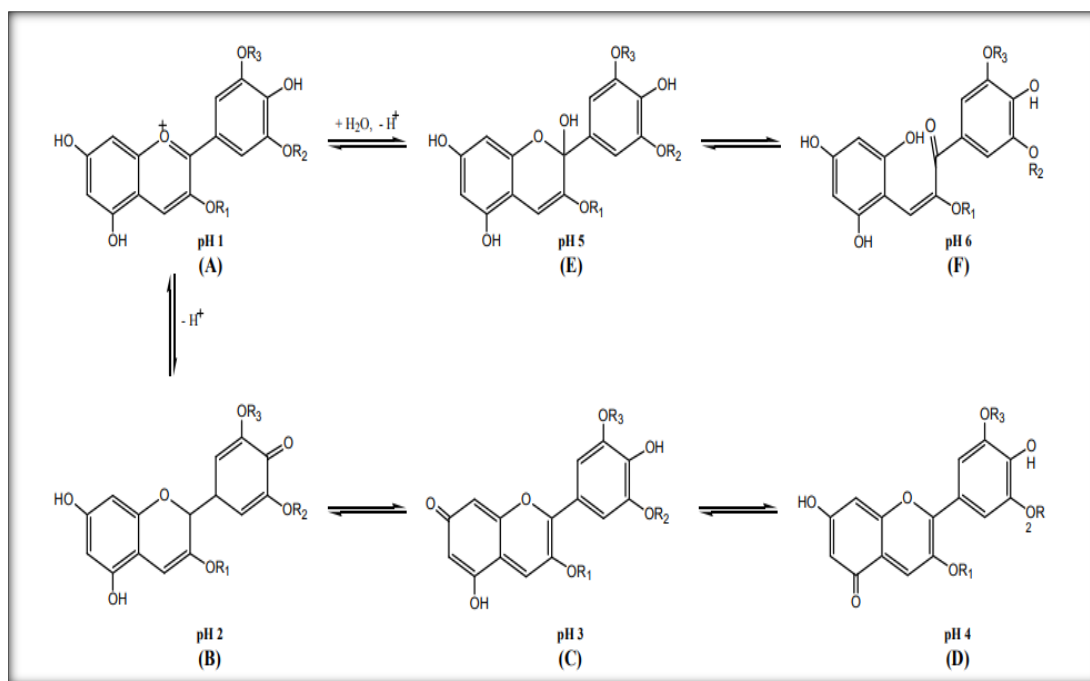
Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que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

2.4.3.3 pH

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

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

Figura 2- 5 Estructura de antocianinas a diferentes pH



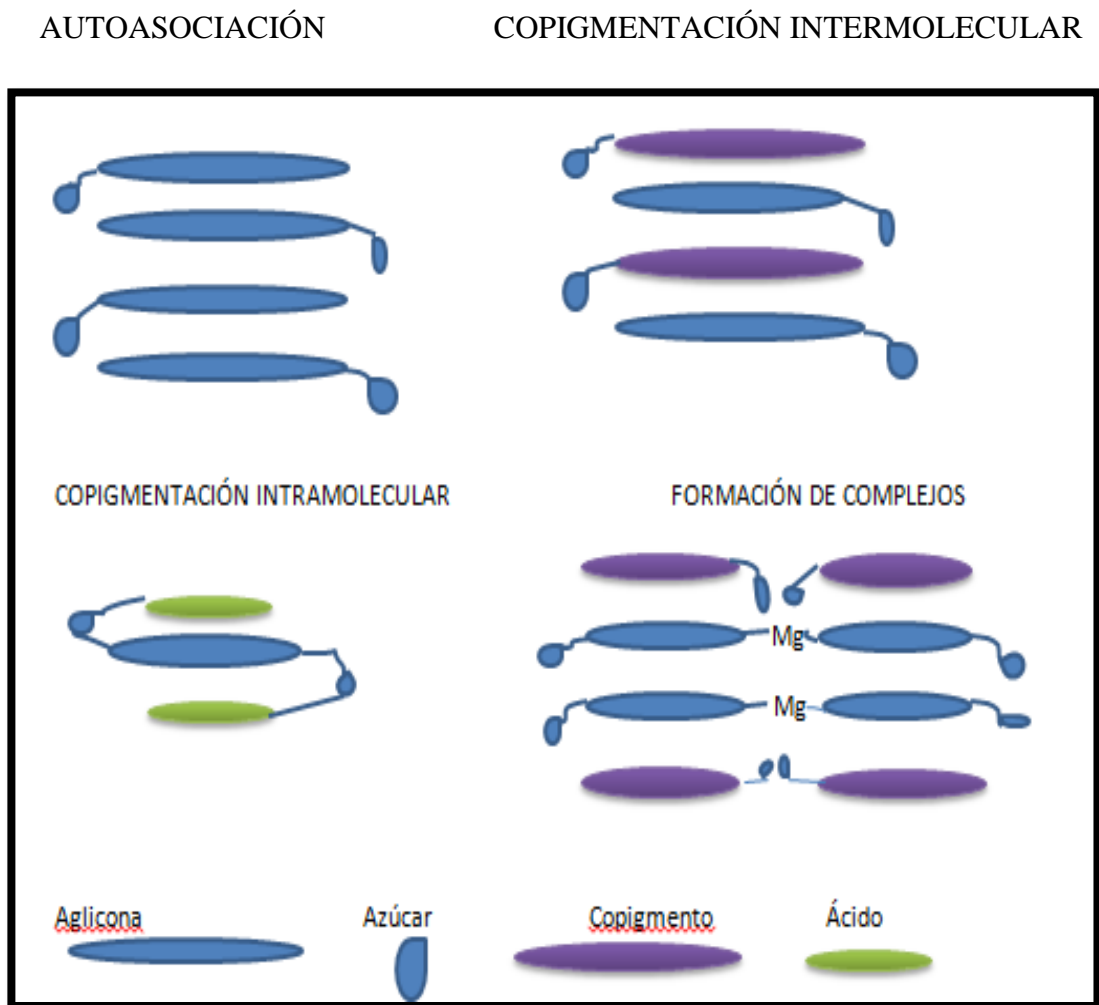
Fuente: (Aliaga, 2017)

2.4.3.4 Copigmentación

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

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

Figura 2- 6 Interacciones de Antocianinas



Fuente: (Zapata, 2014)

2.4.3.5 Agua

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

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

2.4.4 Determinación de las Antocianinas

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

2.4.4.1 Determinación de antocianinas de forma total

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

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

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

2.4.4.2 Ley de Lambert-Beer

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

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

Donde:

A=Absorbancia

ε =coeficiente de absorción (m)

L= longitud de la celda (cm)

c=concentración de la sustancia absorbente en el medio

I=Intensidad de la luz incidente

I_0 =intensidad de la luz que atraviesa en el medio

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

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

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

2.4.4.3 Espectrofotometría

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

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

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

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

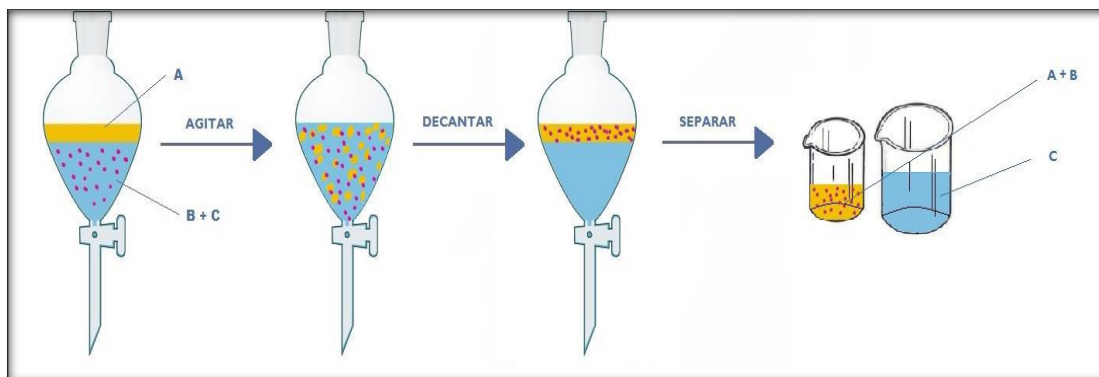
Se han desarrollado diferentes tecnologías de extracción de colorantes naturales.

2.5.1 Extracción sólido-líquido

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

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

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



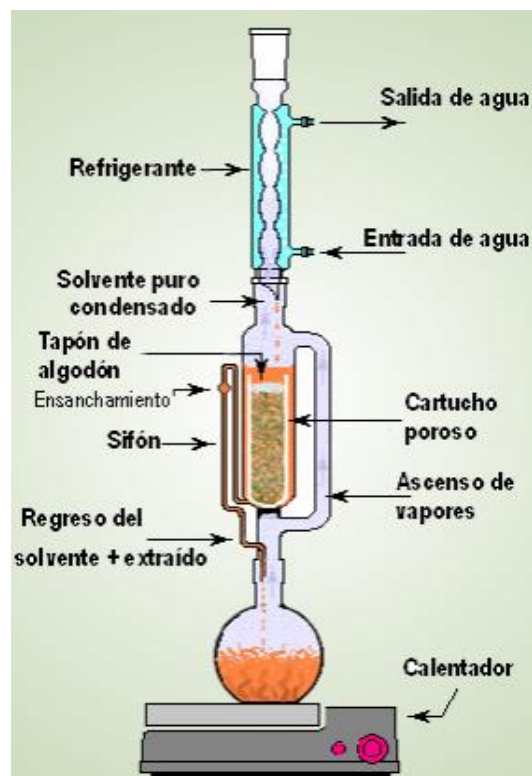
Fuente: (Ortega P. O., 2016)

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

2.5.1.1 Extracción sólido líquido por extractor Soxhlet

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

Figura 2- 8 Extracción con equipo soxhlet



Fuente: (Elena & Castillo, 2012)

2.5.1.2 Extracción sólido líquido por maceración

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

- Influencia del tiempo y temperatura de maceración.

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

Figura 2- 9 Extracción por maceración



Fuente: (CÁRDENAS, 2018)

2.5.1.3 Extracción sólido líquido con agitación

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

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

2.5.1.4 Extracción por cocciones

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

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

2.5.2 Extracción por compresión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.7 Conservación del Extracto de Antocianinas

Existen diversos métodos para la conservación de antocianinas

2.7.1 Encapsulación

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

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

2.7.2 Conservación de antocianinas en estado líquido

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

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

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

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

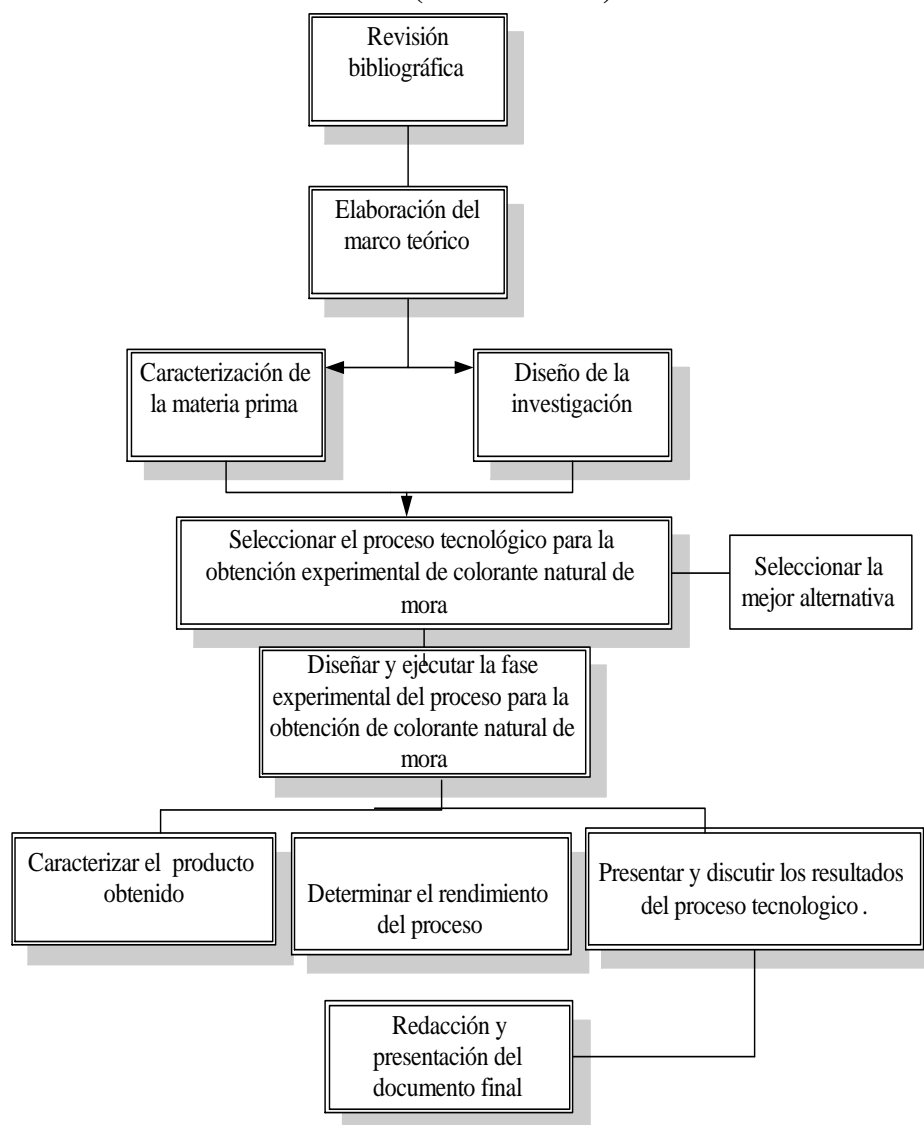
CAPÍTULO III
PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Descripción de la Metodología general del Estudio

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

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

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



Fuente: Elaboración propia 2019

3.2 Selección del Método a utilizar

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

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

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

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

Tabla III- 1 Escala de Puntuación de 1 a 5

Escala de Puntuación	Puntuación
Excelente	5
Muy Bueno	4
Buena	3
Regular	2
Mala	1

Fuente: Elaboración propia 2019

Tabla III- 2 Criterios y ponderación

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

Fuente: Elaboración propia 2019

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

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

Fuente: Elaboración propia 2019

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

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

3.3 Selección del solvente para la extracción de Colorante Natural

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

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

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

Fuente: (Cruz, 2019)

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

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

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

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

Las variables seleccionadas para el proceso son las siguientes:

3.4.1 Temperatura

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

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

3.4.2 Relación soluto-solvente

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

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

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

3.4.3 pH

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

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

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

3.4.4 Granulometría

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

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

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

3.4.5 Variable respuesta: Rendimiento

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

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

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

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

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

3.5.1 Modelo del diseño factorial

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

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

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

$$\text{Subniveles} = 2$$

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

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

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

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

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

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

Despejando el número de repeticiones

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

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

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

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

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

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

Del cálculo se concluye que se realizan 32 experimentos.

Tabla III- 5 Factores y niveles

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

Fuente: Elaboración propia (2019)

Tabla III- 6 Codificación de variables

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

Fuente: Elaboración propia

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

Tabla III- 7 Matriz de diseño

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

Fuente: Elaboración propia 2019

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

Tabla III- 8 Plan de experimentación

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

Fuente: Elaboración propia 2019

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

3.6 Equipos materiales y reactivos necesarios

3.6.1 Equipos

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

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

3.6.2 Materiales de Laboratorio

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

Tabla III- 9 Material de Laboratorio

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

Fuente: Elaboración propia 2020

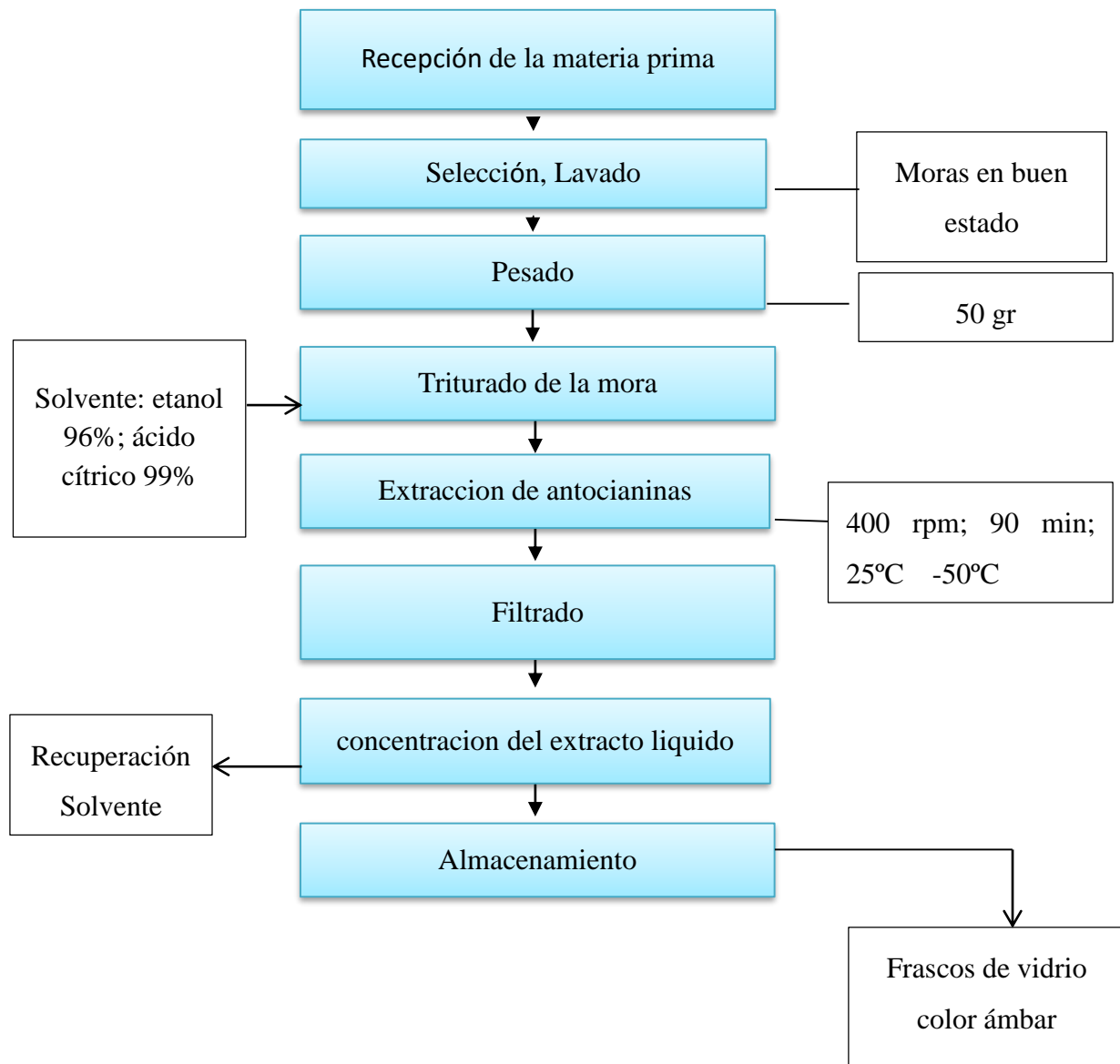
3.6.3 Sustancias Reactivos empleados

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

3.7 Diseño del proceso experimental

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

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



Fuente: Elaboración propia 2019

3.7.1 Descripción del proceso

4.7.1.1 Recepción de materia prima.

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

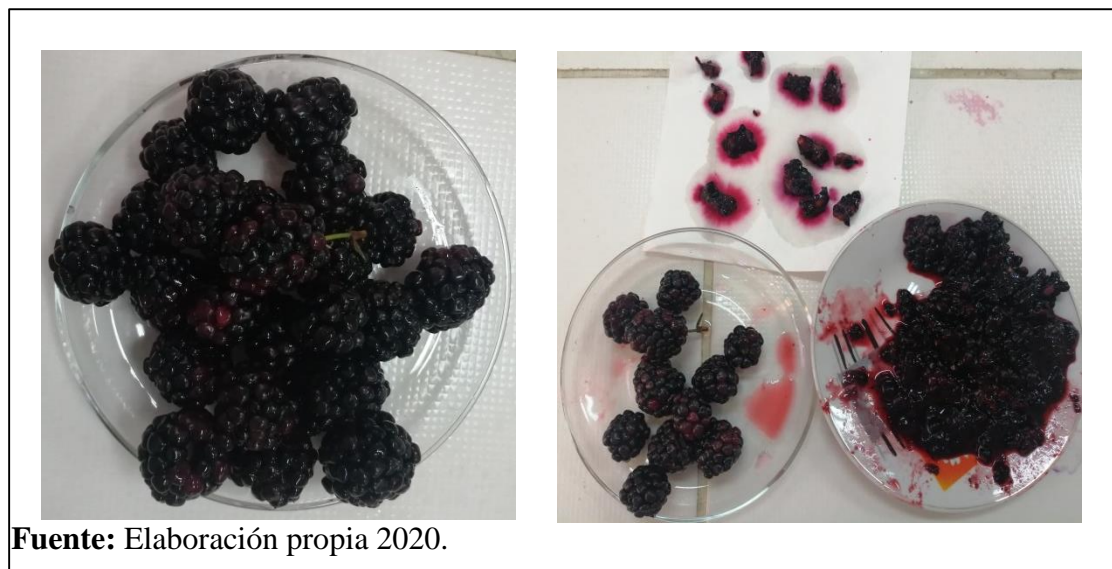
La procedencia de la materia prima es de la localidad de Turumayo perteneciente al departamento de Tarija.

3.7.1.2 Selección y lavado de la materia prima

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

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

Fotografía 3- 1 Selección y lavado de la mora



3.7.1.3 Pesado

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

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

Fotografía 3- 2 Pesado de la mora



Fuente: Elaboración propia 2020

3.7.1.4 Triturado

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

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

Fotografía 3- 3 Triturado de la materia prima



Fuente: Elaboración propia 2020

3.7.1.5 Extracción

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

Fotografía 3- 4 Extracción del colorante natural, mediante agitación



Fuente: Elaboración propia 2020

3.7.1.6 Filtración

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

Fotografía 3- 5 Filtración al vacío



Fuente: Elaboración propia 2020

Fotografía 3- 6 Residuos primera y segunda Extracción

MORAS LICUADAS (ML)	
Residuo primera Extracción	Residuo segunda Extracción
	
MORAS CORTADAS POR LA MITAD (MCM)	
Residuo primera extracción	Residuo segunda extracción
	

Fuente: Elaboración propia 2020

3.7.1.7 Concentración

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

Fotografía 3- 7 Concentración del extracto



Fuente: Elaboración propia 2020.

3.7.1.8 Almacenamiento

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

3.7.1.9 Cuantificación de antocianinas

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

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

3.7.2 Balance de Materia y Energía

3.7.2.1 Balance de Materia

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

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

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

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

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

Fuente: Elaboración propia 2021

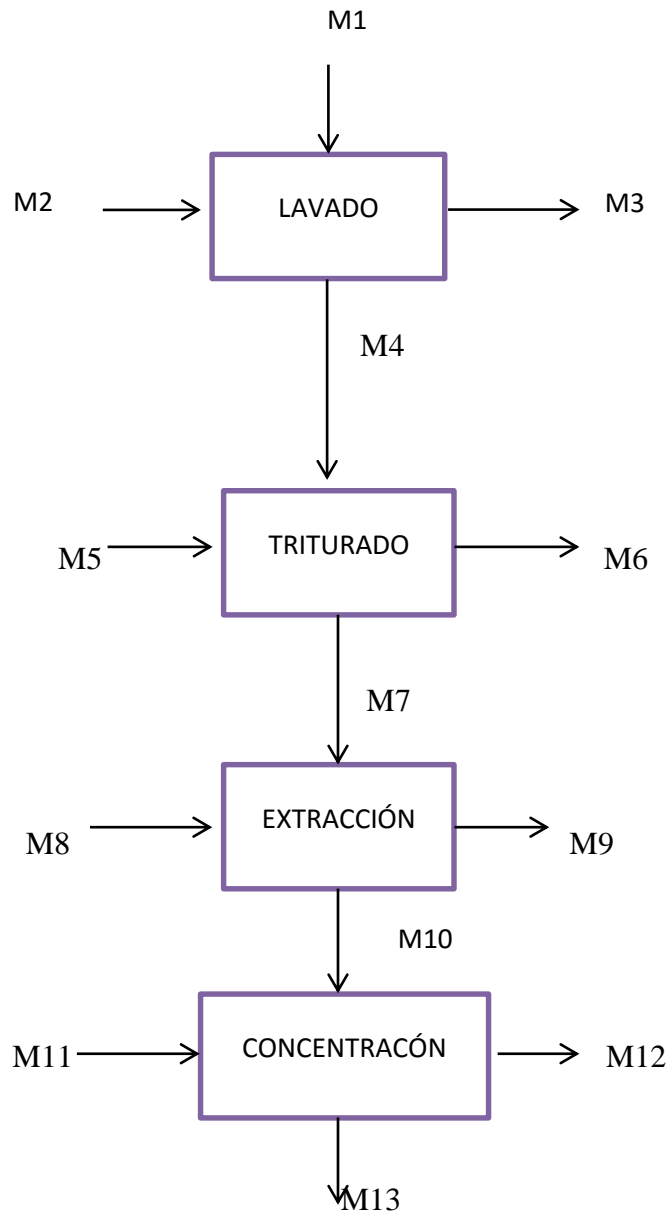
Figura 3- 3 Balance de materia para la extracción de antocianinas de mora

Tabla III- 11 Especificaciones de las corrientes

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

Fuente: Elaboración propia 2021

Tabla III- 12 Especificaciones Corriente másica

CORRIENTE MASICA	ESPECIFICACION
<p>M# Corriente másica global</p>	<p>M = Corriente másica #= Número de corriente, toma valores de 1,2,3,4....13</p>
<p>M#E Corriente másica de cada componente</p>	<p>M = Corriente másica # = Número de corriente, toma valores de 1,2,3,4....13</p> <p>E = Abreviatura del componente de la corriente, sus significados son: Ac=Ácido Ant=Antocianinas, H₂O=Agua OH=Etanol S=Sólidos.</p> <p>M#Ac =Masa de ácido M#H₂O= Masa de agua M#Ant= Masa de Antocianinas M#S=Masa de sólidos M#OH= Masa de Alcohol</p>

Fuente: Elaboración propia 2021

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

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

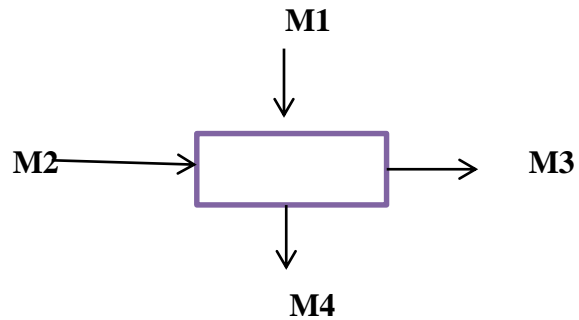
Fuente: Elaboración Propia 2021

Preparación del solvente acidificado

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

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

3.7.2.1.1 Balance de materia en la etapa de lavado



M_1 (Mora) = 50,186 g

M_2 (Agua) = 250g

M_3 (Agua + impurezas)

M_4 (Mora lavada) = 50,006 g

Balance Global

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

$$M_3 = M_1 + M_2 - M_4$$

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

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

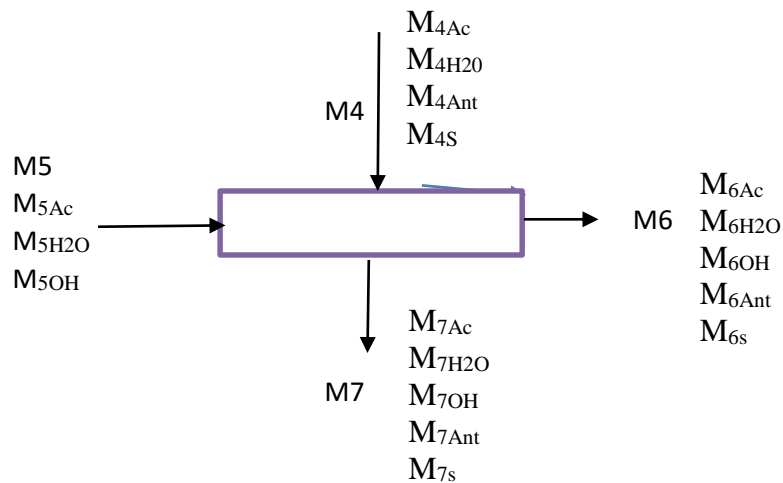
Determinación de impurezas

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

$$I = 250,18 - 250$$

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

3.7.2.1.2 Balance de materia en la etapa triturado



M_4 (Mora lavada) = 50,006 g

M_5 (Etanol acidificado) = 400 g

M_6 (Pérdidas por triturado) =

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

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

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

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

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

Balance para M4: Mora lavada = 50,006 g

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

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

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

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

Balance para M₅: 400 g

Para determinar la masa del alcohol se toma en cuenta que está a una concentración de 96°GL por lo que en 100 ml de alcohol hay ml de agua, entonces la masa de agua y alcohol en la corriente M₅ es:

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

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

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

Balance para M₇: Mora total triturada

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

Según cálculo de la Ec. 3.5

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

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

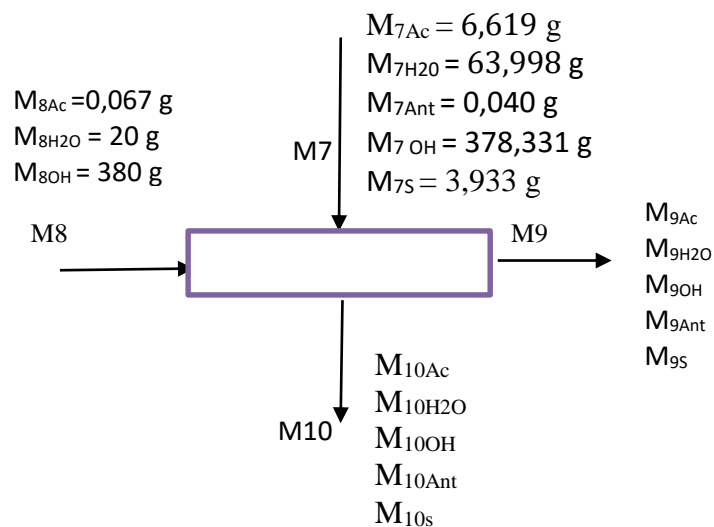
$$M_{7\text{Ac}} = (0,555 \text{ g} + 0,067) \text{ g} * \frac{448,03 \text{ g mora triturada}}{450,006 \text{ g mezcla}} = 0,619 \text{ g}$$

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

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

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

3.7.2.1.3 Balance de materia en la etapa de extracción y filtración



Donde:

M_7 : Mezcla de mora triturada = **448,03 g**

M_8 : Etanol acidulado = 400g

M_9 : Pérdidas + Residuo

M_{10} : Extracto bruto = 705 g

Calculo para corriente M_9 :

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

Despejando la ecuación 3. 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asumiendo una extracción del 90% entonces:

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

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

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

129 g ----- X=0,021 g de ácido en OH

Entonces:

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

Balance para M₁₀ : extracto bruto = 705 g

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

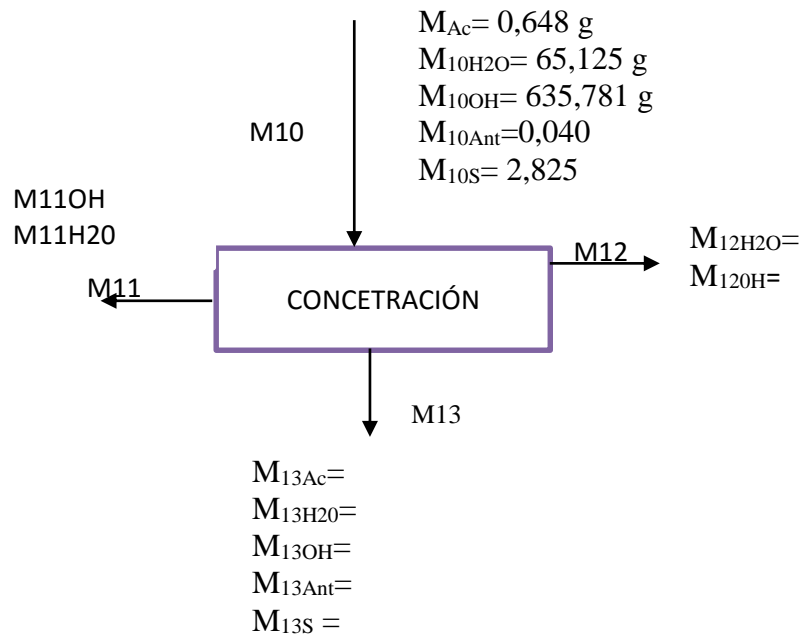
$$M_{10S} = 2,825 \text{ g}$$

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

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

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

3.7.2.1.4 Balance de materia en la etapa de concentración



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

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

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

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

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

Despejando la ecuación 3.13

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

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

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

Balance para M11: Etanol recuperado

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

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

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

Balance para M13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Balance para M₁₂:

Balance para etanol en M₁₂

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

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

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

Balance para el agua en M₁₂

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

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

Rendimiento del proceso de extracción

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

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

Figura 3- 4 Resumen Balance de materia

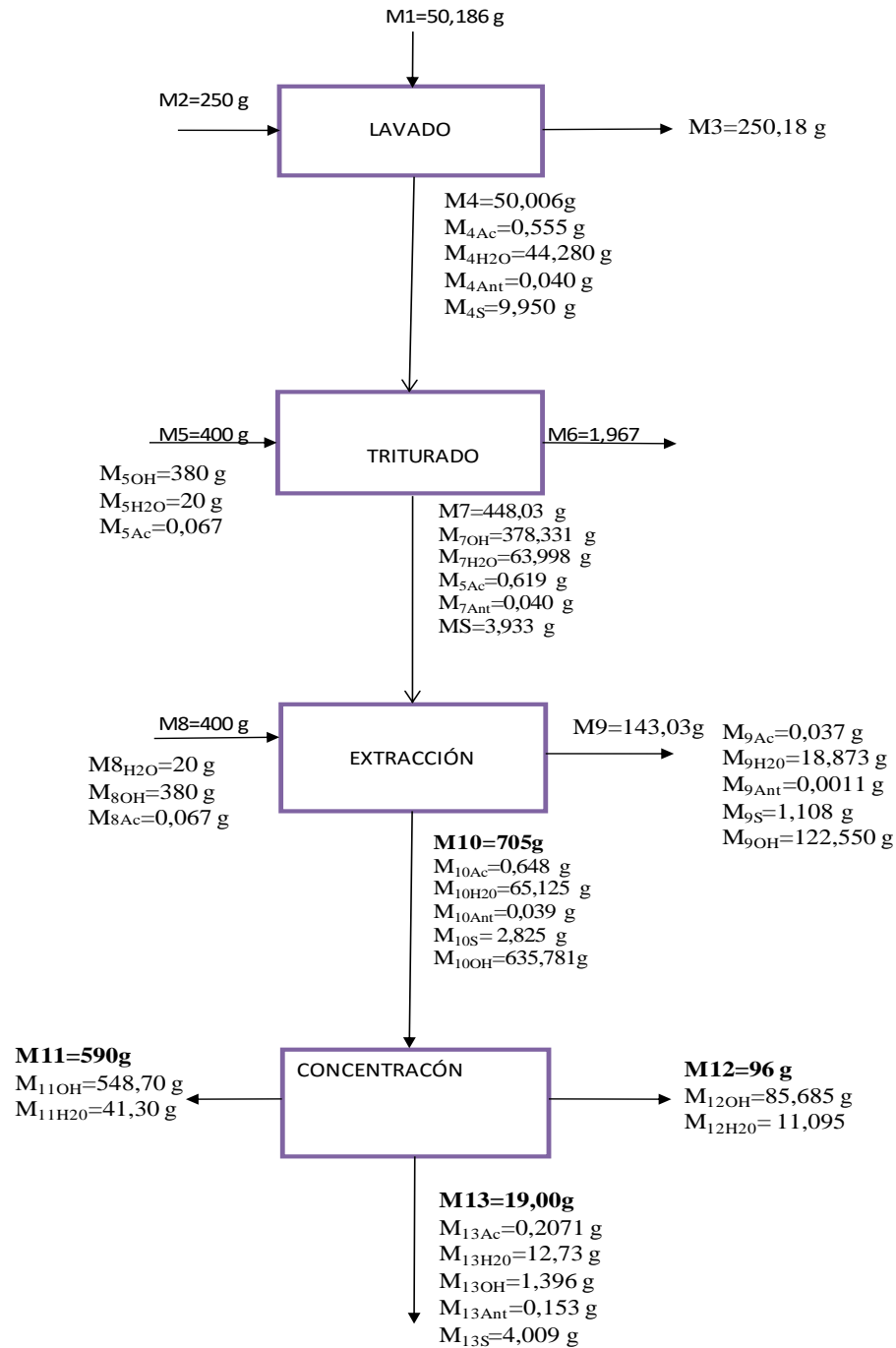


Tabla III- 14 Resumen de balance de materia

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

			M _{13s}	4,009
			M _{13OH}	1,396

Fuente: Elaboración propia 2021

3.7.2.2 Balance de Energía

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

Balance en el agitador magnético

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

Potencia = 80W

Velocidad =1500 rev/min

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

3.7.2.2.1 Balance de Energía Rota Evaporador

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

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

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

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

A esta presión la temperatura de ebullición del etanol es:

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

Datos

T baño: 50 °C

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

T inicial: 20 °C del agua

Masa Extracto=19 g=0,0019kg

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

Masa de Etanol = 0,63578 Kg

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

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

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

Balance en el sistema de evaporación

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

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

$$\begin{aligned} Q_{Sensible} = & (0,63578 \text{ Kg} * 0,60 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20)) + \\ & (0,0019 \text{ Kg} * 0,85 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20)) + \\ & (0,065 \text{ Kg} * 1 \text{ Kcal/Kg}^\circ\text{C} * (34-20)) \end{aligned}$$

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

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

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

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

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

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

Llevando de gramos a mol

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

X-----635,781 g

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

Por lo tanto:

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

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

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

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

Llevando masa de agua a mol

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

X-----52,395 g

X= 2,908 mol = 0,002908 Kmol

Por lo tanto:

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

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

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

3.7.2.2.2 Balance de energía en el condensador

El agua necesaria para condensar el etanol es:

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

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

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

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

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Análisis de la materia prima

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

Tabla IV- 1 Caracterización de la materia prima

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

Fuente: CEANID 2020

4.2 Análisis de Antocianinas en la materia prima

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

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

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

AM=Antocianinas manométricas

ΔA = Variación de absorbancia

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

4.3 Datos y resultados de los extractos

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

Tabla IV- 3 Datos y resultados de los extractos

Nº Exp	Masa de muestra	Masa extracto (g)	volumen extracto (ml)
1,00	50,05	30,00	34,39
2,00	50,15	20,00	22,93
3,00	50,00	22,00	25,22
4,00	50,01	17,00	19,49
5,00	50,01	19,00	21,78
6,00	50,00	18,00	20,63
7,00	50,01	22,00	25,22
8,00	50,04	18,00	20,63
9,00	50,12	18,00	20,63
10,00	50,01	18,00	20,63
11,00	50,02	16,00	18,34
12,00	50,01	22,00	25,22
13,00	50,01	23,00	26,36
14,00	50,02	19,00	21,78
15,00	50,01	27,00	30,95
16,00	50,02	18,00	20,63
17,00	50,01	25,00	28,66
18,00	50,15	19,00	21,78
19,00	50,01	22,00	25,22
20,00	50,01	15,00	17,19
21,00	50,01	20,00	22,93
22,00	50,00	20,00	22,93
23,00	50,01	22,00	25,22
24,00	50,04	19,00	21,78
25,00	50,01	18,00	20,63
26,00	50,01	19,00	21,78
27,00	50,02	18,00	20,63
28,00	50,01	21,00	24,07
29,00	50,00	21,00	24,07
30,00	50,03	22,00	25,22
31,00	50,02	26,00	29,80
32,00	50,02	18,00	20,63

Fuente: Elaboración propia 2021

4.4 Análisis de extracto de antocianinas de mora

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

Tabla IV- 4 Características del extracto de antocianinas

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

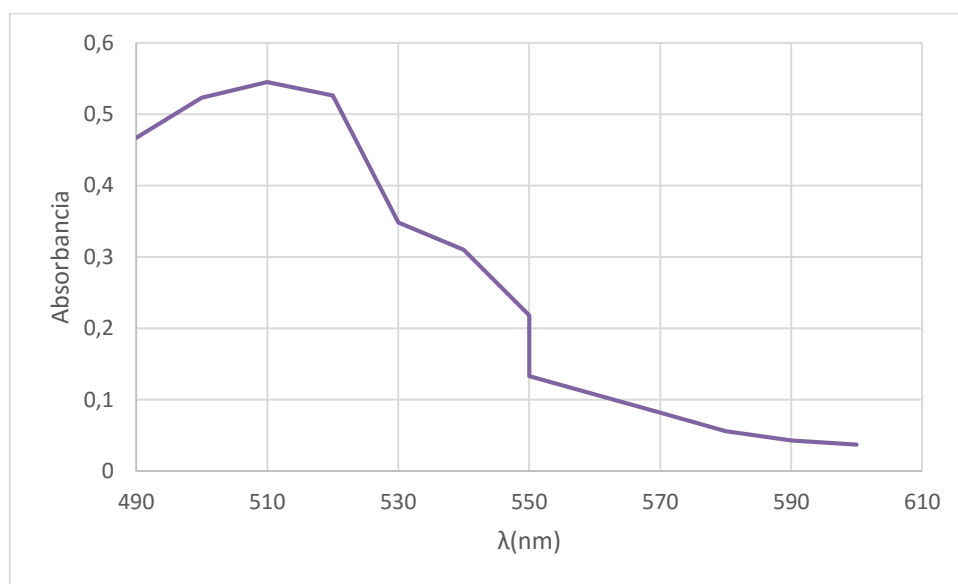
Fuente: CEANID

4.5 Determinación de la Máxima Absorbancia

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

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

Figura 4- 1 Determinación de máxima absorbancia



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

4.6 Análisis de la concentración de antocianinas

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

4.6.1 Método pH Diferencial

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

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

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

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

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

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

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

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

Donde:

AT: Antocianinas totales.

ΔA : Cambio en la Absorbancia.

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

FD: Factor de dilución.

ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido = 26900.

l: Longitud de paso de celda, 1cm.

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos.

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

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

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

La fórmula queda de la siguiente manera:

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

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

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

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

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

Fuente: Elaboración propia 2021

4.7 Rendimiento de Antocianinas

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

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

Tabla IV- 6 Rendimiento de Antocianinas en los Extractos

Nº MUESTRA	TEMPERATURA	RELACION STO/STE	PH	GRANULOMETRIA	RENDIMIENTO (%)
1	25	1:10	3,1	ML	47,987
2	50	1:10	3,1	ML	38,241
3	25	1:05	3,1	ML	39,554
4	50	1:05	3,1	ML	29,708
5	25	1:10	4	ML	49,625
6	50	1:10	4	ML	37,071
7	25	1:05	4	ML	42,507
8	50	1:05	4	ML	26,679
9	25	1:10	3,1	MCM	20,735
10	50	1:10	3,1	MCM	18,890
11	25	1:05	3,1	MCM	34,469
12	50	1:05	3,1	MCM	33,453
13	25	1:10	4	MCM	18,793
14	50	1:10	4	MCM	20,774
15	25	1:05	4	MCM	29,073
16	50	1:05	4	MCM	35,074
17	25	1:10	3,1	ML	45,806
18	50	1:10	3,1	ML	39,560
19	25	1:05	3,1	ML	40,147
20	50	1:05	3,1	ML	25,504
21	25	1:10	4	ML	49,748
22	50	1:10	4	ML	37,694
23	25	1:05	4	ML	48,003
24	50	1:05	4	ML	25,201
25	25	1:10	3,1	MCM	17,948
26	50	1:10	3,1	MCM	19,202
27	25	1:05	3,1	MCM	36,544
28	50	1:05	3,1	MCM	31,666
29	25	1:10	4	MCM	17,005
30	50	1:10	4	MCM	19,215
31	25	1:05	4	MCM	27,376
32	50	1:05	4	MCM	36,063

Fuente: Elaboración propia 2021

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

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

4.8 Análisis estadístico del diseño experimental

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

En la siguiente tabla se muestra el resumen del diseño

Tabla IV- 7 Resumen del diseño

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

Fuente: Elaboración propia, Minitab 18.

4.8.1 Análisis de varianza

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

Tabla IV- 8 Análisis de varianza (ANOVA)

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

Fuente: Elaboración propia, Minitab 18

Donde:

T=Temperatura

R=Relación soluto/disolvente

G=Granulometría

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

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

Tabla IV- 9 Resumen del modelo variable respuesta

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

Fuente: Elaboración propia, Minitab 18

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

4.8.2 Determinación del rendimiento de antocianinas y modelo matemático para diseño factorial 2⁴

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

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

Tabla IV- 10 Variables para la relación

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

Fuente: Elaboración propia Minitab 18.

Ecuación de regresión lineal variable respuesta: rendimiento de Extracción

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

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

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

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

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

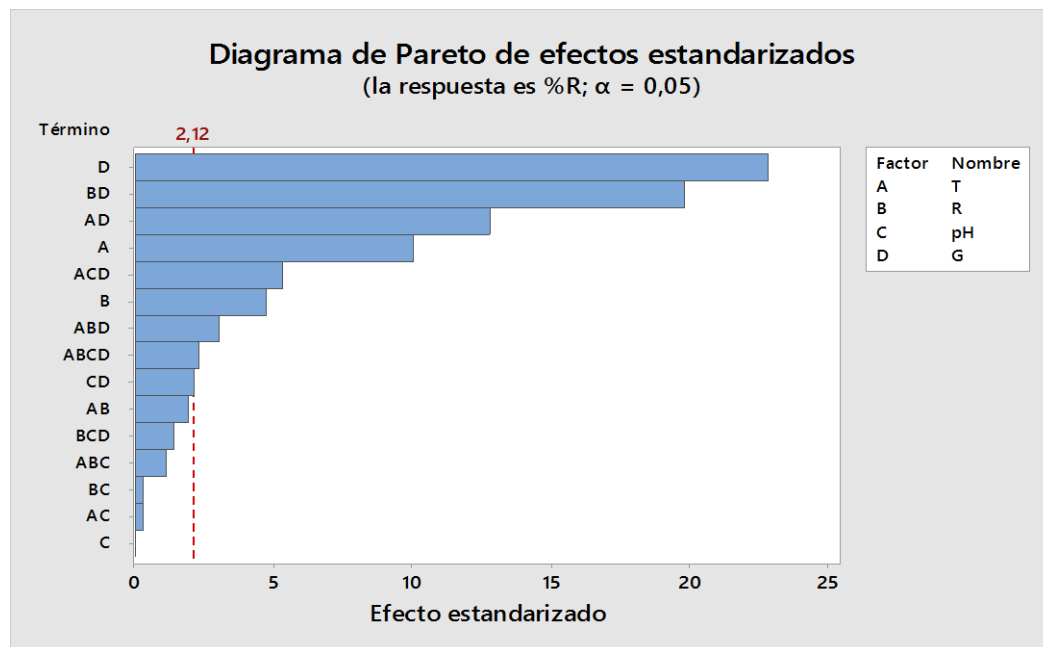
$$\%R = 32,479 - 2,854 T + 1,335 R + 0,015 \text{ pH} - 6,461 G$$

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

4.8.3 Diagrama de Pareto

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

Figura 4- 2 Diagrama de Pareto de efectos estandarizados



Fuente: Elaboración Propia Minitab 18

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

4.9 Costos

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

Tabla IV- 11 Costos Principales

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 12 Costo de materiales

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 13 Costo de análisis

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 14 Otros costos

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 15 Resumen -Costos total

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

4.10. Costo de producción

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

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

Tabla IV- 16 Costo de funcionamiento de equipos

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV- 17 Costos de insumos

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

Tabla IV-18 Costos de Materia prima

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

Fuente: Elaboración Propia 2021

$$CP = MP + MO + CI$$

Dónde:

CP= Costo de producción

MP=Materia prima

MO=Mano de obra

CI= Costos indirectos de fabricación

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

Reemplazando datos en la fórmula se tiene:

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

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

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

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

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

Acidez: 1,11%

Azúcares totales: 4,36 %

Ceniza: 0,47 %

Densidad: 0,98 g/ml

Fibra: 1,33%

Proteína total: 1,85 %

Grasa: 0,06 %

Humedad: 88,55%

Sólidos solubles: 7,9 °Brix;

pH= 2,77

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

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

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

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

5.2 Recomendaciones

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

Bibliografía

- **Aliaga, M. A. (2017).** *Estabilidad térmica del extracto colorante de orujos de uvina (vitis aestivalis- cinerea x vitis vinifera) en una bebida modelo.* Lima- Peru.
- **Alvarado, J. A. (2011).** *Protocolo de análisis- Centro de Investigacion en Quimica de alimentos Análisis de la TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox).*
- **Analytics, K. (2012).** *Global Hearing Instrunent Market.*
- **Anónimo. (2015).** *Ecured.* Recuperado el 22 de junio de 2019, de https://www.ecured.cu/Rubus_ulmifolius
- **BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. (2005).** *OPERACIONES UNITARIASEN LAINGENIERÍA DE ALIMENTOS.* Mundi-Prensa: BARCELONA.
- **CÁRDENAS, A. X. (2018).** “*Determinación de parámetros tecnológicos para la obtención por evaporación de antocianinas a base de un extracto hidroalcohólico de coronta de maíz morado (zea mays l.) var. arequipeño*”. tacna – peru .
- **CARVALLO, M. (2019).** *extracción de antocianinas de la coronta del maíz.* Tarija.
- **Castañeda-Sanchez, A., & J.A. Guerrero- Beltran. (2011).** *Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas.* Mexico.
- **CIPLANE. (2008).** *Hortalizas y bayas; estudio realizado a productores del valle central del departamento de Tarija.* Tarija.
- **Cruz, E. (2019).** *Obtención de extracto de Antocianinas de arandano(vaccinium corymbosum L.) cultivado en el valle central de Tarija.* TARIJA.
- **Delgado-Vargas. (2000).** *Ruta General de biosíntesis de las antocianinas.*
- **Elena, S., & Castillo, M. (2012).** *EXTRACCIÓN DE COLORANTE A PARTIR DE LA FLOR DE JAMAICA.* Managua, Nicaragua.
- **FUCHS, L. (2012).** *La mora, pequeña joya silvestre.* Recuperado el 2020, de <https://www.directoalpaladar.com/ingredientes-y-alimentos/la-mora-pequena-joya-silvestre>

- **GARZÓN, G. A. (2008).** *LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y.* Colombia: Acta biol. Colomb., Vol. 13 No. 3, 2008 27 - 36.
- **Huasco Huanto, R. (2018).** *Extracción de colorante natural de la semilla de palta (variedad hass) producida en la provincia de Yacuiba.* Tarija.
- **Huerta, L. D., & Ostos Arias, R. (2014).** *Estudio de prefactibilidad de una empresa productora y comercializadora de bixina dirido al mercado de japon.* Peru.
- **Indumentaria(CIAI), C. I. (s.f.).** CIAI. Recuperado el 22 de junio de 2019, de <http://www.ciaindumentaria.com.ar/plataforma/colorantes-naturales/>
- **Lasso, A. P. (2011).** *Extracción y uso de tres pigmentos naturales a partir de tomate de arbol (solanum betaceum CAV), Mortiño (Vaccinium myttillus L.) y mora de castilla (Rubus glaucus) como alternativa colorante natural para alimentos.* Ecuador .
- **Martínez, N. d., & al, e. (2011).** *Antocianinas y actividad anti radicales libres.*
- **Membreño, S. A. (2006).** *Ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles .* El Salvador .
- **Montgomery, D. C. (1991).** *Diseño y Análisis de Experimentos.*
- **moreu, D. m. (2014).** *Puleva.* Recuperado el 07 de julio de 2019, de Puleva: <https://www.lechepuleva.es/aprende-a-cuidarte/tu-alimentacion-de-la-a-z/m/moras>
- **Nieves del Socorro Martínez-Cruz, 1. K.-N.-S.-C.-G.-R. (2011).** *Antocianinas y actividad anti radicales libres.* Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n4/v42n4a7.pdf>
- **Ortega, P. O. (2016).** *Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas.*
- **Ortega, V. P. (2004).** *Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico .* Recuperado el 06 de 05 de 2019, de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap259e/pdf/fap259e.pdf>

- **QUIMINET. (2006).** *El secado por aspersion y su uso en la encapsulación.* Recuperado el 20 de 02 de 2020, de <https://www.quiminet.com/articulos/el-secado-por-aspersion-y-su-uso-en-la-encapsulacion-10261.htm>
- **Sauñi, H. F. (2014).** *Utilización de la antocianina del maíz morado (Zea Mays L.) y stevia (Stevia rebaudiana Bertoni) en la elaboración de un producto tipo mermelada y su aceptabilidad.* Lima-Peru.
- **Sosa, I. A., & Lopez Sanchez, J. L. (2004).** *Espectrofometría de absorción .* Mexico.
- **TRADE-MAP. (2018).** *Estadísticas del comercio para el desarrollo internacional de las empresa.* Recuperado el abril de 2019, de <https://www.trademap.org/Index.aspx?lang=es&AspxAutoDetectCookieSupport=1>
- **villarruel, G. r. (2014).** *“INVESTIGACIÓN DE LA MORA Y PROPUESTA GASTRONÓMICA”.* Recuperado el 05 de marzo de 2020, de http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11913/1/56668_1.pdf
- **Whitaker, J. (2001).** *Current Protocols in food Analytical Chemistry, .* California Copyright.
- **Zapata, L. M. (2014).** Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimenticia .
- **Zeballos, C. K. (2016).** *Estudio de los principios bioactivos y obtención de colorantes naturales naturales de la cáscara de Opuntia ficusindica (L.) Miller "tuna".* Perú .

ANEXOS

ANEXO A

ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS

EQUIPOS UTILIZADOS EN EL

LABORATORIO

Espectrofotómetro UV-VIS



Marca: J.P. Selecta, s.a.
Accesorios: Juego de Cubetas
Tensión: 230/240 V
Amper: 112 mA
Frecuencia: 50-60 Hz
Lugar de Ensayo y Propiedad: UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

Rota-Evaporador



Marca: Heidolph
Tipo: Heizbad HB digit
Accesorios: 2 balones, bomba, baño maría, mangueras y condensador
Frecuencia: 50 - 60 Hz
Tensión: 230/240 V
Temperatura: 30-180 °C
Voltaje: 230
Lugar de Ensayo y Propiedad: UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

Balanza analítica



Marca: GIBERTINI

Accesorios: Bandeja y tapa de vidrio

Tensión: 230/240 V

Máximo: 510 gramos

Mínimo: 1 gramo

Error: 0.01 gramo

Voltaje: 230

Lugar de Ensayo y Propiedad: UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

Licadora



Marca: Holstein Housewares

Modelo: HH-0910107R

Motor: Reversible

Alimentación de corriente:

220 V, 50 hz, 440 W

Velocidad: 6 niveles

Bomba de vacío



Marca: Telstar

Voltaje: 230 V

Frecuencia: 50/60 Hz

Potencia: 0,23 Kw

Agitador Magnético



Marca: J.P SELECTA

Voltaje:230 V

Potencia: 640 W

Frecuencia: 50Hz

Temperatura máxima 350 °C

Velocidad: 60- 1600 RPM

peso: 3,5Kg

Termo balanza de infrarrojo



Marca: SARTORIUS

Modelo: MA 100

Rango de temperatura: 20-200°C

Capacidad: 100g

Voltaje: 230°C

pH-metro



Marca: ATC

Rango: 0,0 a 14

Rango de temperatura: 0°C a 50°C

Calibración: manual, un punto

Peso: 50 gr

Dimensiones: 152 x 30 x 21 mm

ANEXO B

ANALISIS FISICOQUIMICO

Resultado de los análisis fisicoquímicos de la materia prima

CEANID-FOR-88
Versión 01
Fecha de emisión: 2018-10-31



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA "JUAN MISAEL SARACHO"
FACULTAD DE "CIENCIAS Y TECNOLOGÍA"
CENTRO DE ANÁLISIS, INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO "CEANID"
Laboratorio Oficial del Ministerio de Salud y Deportes
Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
Red Nacional de Laboratorios de Micronutrientes
Laboratorio Oficial del "SENASAG"



INFORME DE ENSAYO

I. INFORMACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente:	Carmen Lisset Cuevas Mercado		
Solicitante:	Carmen Lisset Cuevas Mercado		
Dirección:	Comunidad de Erquiz		
Teléfono/Fax:	78250056	Correo-e:	*****
Código:	AL 383/19		

II. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra:	Mora		
Código de muestreo:	M 1	Fecha de vencimiento:	*****
Lote:	*****		
Fecha y hora de muestreo:	2019-12-03 Hr. 07:00		
Procedencia (Localidad/Prov./ Depto):	Erquiz - Mendez - Tarija - Bolivia		
Lugar de muestreo:	Erquiz		
Responsable de muestreo:	Carmen Lisset Cuevas Mercado		
Código de la muestra:	1534 FQ 896	Fecha de recepción de la muestra:	2019-12-03
Cantidad recibida:	150 g	Fecha de ejecución de ensayo:	De 2019-12-03 al 2019-12-11

III. RESULTADOS MICROBIOLÓGICO

PARÁMETRO	TECNICA y/o MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO	LÍMITES PERMISIBLES		REFERENCIA DE LOS LÍMITES
				Min.	Max.	
Grasa	NB 313019:06	%	0,06	Sin Referencia		Sin Referencia
Humedad	NB 313010:05	%	88,55	Sin Referencia		Sin Referencia
Sólidos solubles	NB 36003:02	*Brix	7,9	Sin Referencia		Sin Referencia
pH (20°C)	NB 38028:2006		2,77	Sin Referencia		Sin Referencia

NB: Norma Boliviana

% porcentaje

- 1) Los resultados reportados se remiten a la muestra ensayada en el Laboratorio
- 2) El presente informe solo puede ser reproducido en forma parcial y/o total, con la autorización del CEANID
- 3) Los datos de la muestra y el muestreo, fueron suministrados por el cliente

Tarija, 11 de diciembre del 2019


Ing. Aguilid Aceituno Cáceres
JEFE DEL CEANID



Original Cliente

Copia CEANID

Dirección: Campus Universitario Facultad de Ciencias y Tecnología Zona "El Tejar" Tel. (591) (4) 6645648
Fax: (591) (4) 6643403 - Email: ceanid@uajms.edu.bo - Casilla 51 - TARIJA - BOLIVIA

Página 1 de 1



UNIVERSIDAD AUTONOMA "JUAN MISAEL SARACHO"
 FACULTAD DE "CIENCIAS Y TECNOLOGIA"
 CENTRO DE ANALISIS, INVESTIGACION Y DESARROLLO "CEANID"
 Laboratorio Oficial del Ministerio de Salud y Deportes
 Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
 Red Nacional de Laboratorios de Micronutrientes
 Laboratorio Oficial del "SENASAG"



CEANID-FOR 88
 Versión 01
 Fecha de emisión: 2016-10-31

INFORME DE ENSAYO

I. INFORMACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Solicitante:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Dirección:	Barrio El Tejar				
Teléfono/Fax:	78250056	Correo-e:	*****	Código:	AL 010/20

II. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra:	Mora				
Código de muestreo:	M 1	Fecha de vencimiento:	*****	Lote:	*****
Fecha y hora de muestreo:	2020-02-19 Hr. 09:00				
Procedencia (Localidad/Prov./País):	Turumayo - Cercado - Tarija Bolivia				
Lugar de muestreo:	Mercado Campesino				
Responsable de muestreo:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Código de la muestra:	044 FQ 022	Fecha de recepción de la muestra:	2020-02-19		
Cantidad recibida:	500 g	Fecha de ejecución de ensayo:	De 2020-02-19 al 2020-02-28		

III. RESULTADOS MICROBIOLÓGICO

PARÁMETRO	TECNICA y/o MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO	LIMITES PERMISIBLES		REFERENCIA DE LOS LIMITES
				Min.	Max.	
Acidez (como ac. cítrico)	NB 229:98	%	1,11	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia
Azúcares totales	NB 38033:06	%	4,36	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia
Ceniza	NB 39034:10	%	0,47	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia
Densidad	NB 230:99	g/ml	0,98	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia
Fibra	Gravimétrico	%	1,33	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia
Proteína total (Nx6,25)	NB/ISO 8968-1:08	%	1,85	Sin Referencia	Sin Referencia	Sin Referencia

NB: Norma Boliviana

ISO: International organization for standardization

% porcentaje

g/ml Gramos por muestra

- 1) Los resultados reportados se remiten a la muestra ensayada en el Laboratorio
- 2) El presente informe sólo puede ser reproducido en forma parcial y/o total, con la autorización del CEANID
- 3) Los datos de la muestra y el muestreo, fueron suministrados por el cliente

Tarija, 28 de febrero del 2020

Ing. Néhid Aceituno Cáceres
 JEFE DEL CEANID



Original: Cliente

Copia: CEANID

Dirección: Campus Universitario Facultad de Ciencias y Tecnología Zona "El Tejar" Tel. (591) (4) 6645648
 Fax: (591) (4) 6643403 - Email: ceanid@uajms.edu.bo - Casilla 51 - TARIJA - BOLIVIA

Resultado de extracto de Antocianinas



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA "JUAN MISAEL SARACHO"
FACULTAD DE "CIENCIAS Y TECNOLOGÍA"
CENTRO DE ANÁLISIS, INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO "CEANID"
Laboratorio Oficial del Ministerio de Salud y Deportes
Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
Red Nacional de Laboratorios de Micronutrientes
Laboratorio Oficial del "SENASAG"

CEANID-FOR 88
Versión 01
Fecha de emisión: 2016-10-31



INFORME DE ENSAYO

I. INFORMACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Solicitante:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Dirección:	Barrio El Tejar				
Teléfono/Fax:	78250056	Correo-e:	*****	Código:	AL 097/20

II. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra:	Extracto de antocianinas				
Código de muestreo:	M 1	Fecha de vencimiento:	*****	Lote:	*****
Fecha y hora de muestreo:	2020-12-02 Hr.: 12:00				
Procedencia (Localidad/Prov/ Depto):	Tarija - Cercado - Tarija - Bolivia				
Lugar de muestreo:	Laboratorio de Operaciones Unitarias "LOU - UAJMS"				
Responsable de muestreo:	Carmen Lisset Cuevas Mercado				
Código de la muestra:	507 FQ 351	Fecha de recepción de la muestra:	2020-12-02		
Cantidad recibida:	200 ml	Fecha de ejecución de ensayo:	Del 2020-12-02 al 2020-12-14		

III. RESULTADOS MICROBIOLÓGICO

PARÁMETRO	TECNICA y/o MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO	LÍMITES PERMISIBLES		REFERENCIA DE LOS LÍMITES
				Min.	Max.	
Acidez (como ácido cítrico)	NB 36004:02	meq/Kg	1,09	Sin Referencia		Sin Referencia
Azúcares totales	NB 38033:06	%	3,07	Sin Referencia		Sin Referencia
Densidad relativa (20°C)	NB 230:99		0,8724	Sin Referencia		Sin Referencia
Grasa	NB 313019:06	%	0,12	Sin Referencia		Sin Referencia
Proteína total (Nx6,25)	NB/ISO 8968-1:08	%	0,22	Sin Referencia		Sin Referencia
pH (20°C)	SM 4500-H-B		4,38	Sin Referencia		Sin Referencia
Sólidos solubles	NB 36003:02	*Brix	21,1	Sin Referencia		Sin Referencia

NB: Norma Boliviana
meq/Kg: Miliequivalente por kilogramo

ISO: Organización Internacional de Normalización
SM: Standard Methods

%: porcentaje

- 1) Los resultados reportados se remiten a la muestra ensayada en el Laboratorio
- 2) El presente informe solo puede ser reproducido en forma parcial y/o total, con la autorización del CEANID
- 3) Los datos de la muestra y el muestreo, fueron suministrados por el cliente

Tarija, 14 de diciembre del 2020

Ing. Axelid Aceituno Cáceres
JEFE DEL CEANID



Original: Cliente

Copia: CEANID

Dirección: Campus Universitario Facultad de Ciencias y Tecnología Zona "El Tejar" Tel. (591) (4) 6645648
Fax: (591) (4) 6643403 - Email: ceanid@uajms.edu.bo - Casilla 51 - TARIJA - BOLIVIA

Página 1 de 1

ANEXO C

PROTOCOLO PARA ANALISIS DE

ANTOCIANINAS

PROTOCOLO-DETERMINACION DE ANTOCIANINS EN LA MATERIA PRIMA

METHANOL EXTRACTION OF ANTHOCYANINS

This is the classical method of extracting anthocyanins from plant materials. This procedure involves maceration or soaking of the plant material in methanol containing a small concentration of mineral acid (e.g., HCl). Methanol extraction is a rapid, easy, and efficient method for anthocyanin extraction. However, a crude aqueous extract with several contaminants is obtained, and methanol evaporation can result in hydrolysis of labile acyl linkages, which is aggravated by the presence of HCl.

Additional Materials (also see Basic Protocol 1)

Acidified methanol: 0.01% (v/v) HCl in methanol

1. Homogenize 50 g powdered plant material (accurately weighed and recorded) in 2 vol (w/v) acidified methanol. Allow it to macerate 1 hr.

One hour should be sufficient time for anthocyanin extraction because of the high surface area of the powdered material. Materials are often allowed to extract overnight under refrigerated conditions, particularly when materials have been ground directly in the blender with acidified methanol and not previously powdered.

2. Filter slurry through a Whatman no. 1 filter paper by vacuum suction using a Buchner funnel.
3. Reextract plant material with acidified methanol until a faint-colored extract is obtained. Pool filtrates and discard plant material.

Three subsequent extractions should be sufficient.

4. Transfer filtrates to a boiling flask and evaporate methanol in a rotary evaporator at 40°C under vacuum.

The evaporating flask should be less than one-half full for efficient solvent removal. Prolonged evaporation time should be avoided to minimize pigment degradation. A marked reduction in the rate of evaporation as well as an apparent increase in viscosity is indicative that the residual liquid is mostly water.

If pigment isolate is to be analyzed in an aqueous system, the extract should not be taken to dryness. For some analytical applications, the sample should be taken to dryness and then dissolved in methanol or other appropriate solvent. In the latter concentration stages, azeotropic removal of water can be facilitated by addition of methanol.

5. Make up remaining aqueous extract to a known volume with acidified deionized distilled water, water, methanol, or other appropriate solvent. If the sample is to be analyzed within 2 days, store extract at 4°C. For longer periods (up to 1 year or even longer), store at -18°C. Avoid repeated freezing and thawing.

Extract should be made up in acidified water or water if continuing with Basic Protocol 2.

**ALTERNATE
PROTOCOL**

Fuente: (Whitaker, 2001)

PROTOCOLO- Determinación de antocianinas totales por el método de pH diferencial.

Fundamento teórico del método de antocianinas monoméricas totales por el método del pH-diferencial

Los pigmentos de antocianinas sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en pH manifiesto por espectros de absorbancia notablemente diferentes. La forma coloreada del oxonio predomina a pH 1.0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5. El método del pH-diferencial se basa en esta reacción, y permite la medida exacta y rápida de las antocianinas totales, incluso en presencia de pigmentos polimerizados degradados y otros compuestos interferentes.

Materiales

buffer de cloruro de potasio 0.025 M, pH 1.0 (ver receta)

buffer de acetato de sodio 0.4 M, pH 4.5 (ver receta)

1. Encender el espectrofotómetro. Permitir al instrumento calentarse por lo menos 30 min antes de tomar las medidas.
2. Determinar el factor de dilución apropiado para la muestra diluyendo con el buffer de cloruro de potasio, pH 1.0, hasta que la absorbancia de la muestra a la $\lambda_{\text{vis-max}}$ esté dentro del rango lineal del espectrofotómetro (o sea, para la mayoría de los espectrofotómetros las absorbancias deben ser menores a 1.2). Dividir el último volumen de la muestra por el volumen inicial para obtener el factor de dilución (DF; por ejemplo ver el paso 7).

NOTA IMPORTANTE: Para no exceder la capacidad del buffer, la muestra no debe exceder 20% del volumen total.

3. Poner a cero el espectrofotómetro con el agua destilada para todas las longitudes de onda que se usarán ($\lambda_{\text{vis-max}}$ y 700 nm).

Muchos espectrofotómetros permiten una corrección básica rápida para poner a cero usando la línea de ajuste de fondo.

4. Preparar dos diluciones de la muestra, una con el buffer de cloruro de potasio, pH 1.0, y la otra con el buffer de acetato de sodio, pH 4.5, diluyendo cada una por el factor de dilución previamente determinado (paso 2). Permita que estas diluciones se equilibren por 15 min.
5. Medir la absorbancia de cada dilución a $\lambda_{\text{vis-max}}$ y a 700 nm (para corregir por la turbidez), contra una celda blanco llena con agua destilada.

Todas las medidas deben hacerse entre 15 min y 1 h después de preparar la muestra, ya que tiempos mayores de espera tienden a incrementar las lecturas observadas.

Las lecturas de absorbancia se hacen contra blancos de agua, aun cuando las muestras estén en buffer o soluciones de bisulfito, ya que la absorbancia del buffer o del bisulfito es nula en las longitudes de onda medidas. Los autores han comparado los valores obtenidos usando el agua como blanco comparado con buffer o bisulfito como blancos en sistemas diferentes y no han

encontrado ninguna diferencia en los valores finales obtenidos para el contenido de antocianinas monoméricas y/o poliméricas; por otro lado, leer las muestras diluidas contra el buffer correspondiente y/o la solución de bisulfito consume más tiempo y extiende el procedimiento innecesariamente.

Las muestras a ser medidas deben estar claras y no contener ninguna turbidez o sedimentos; sin embargo, algunos materiales coloidales pueden suspenderse en la muestra, causando dispersión de luz y una apariencia nublada (niebla). Esta dispersión de luz necesita ser corregida leyendo a una longitud de onda donde ninguna absorbancia de la muestra ocurra, es decir, 700 nm.

7. Calcular la absorbancia de la muestra diluida (A) como sigue:

8.
$$A = (A_{\lambda_{\text{vis-max}} \text{ 700 pH 1.0}} - A_{\lambda_{\text{vis-max}} \text{ 700 pH 4.5}})$$

6. Calcular la concentración de pigmento de antocianina monomérica en la muestra original usando la fórmula siguiente:

7.

$$\text{Pigmento de antocianina monomérica (mg/litro)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

donde MW es la masa molecular, DF es el factor de dilución (por ej., si 0.2 mL de una muestra se diluyen a 3 mL, DF = 15), y ϵ es la absorptividad molar.

NOTA IMPORTANTE: El M_w y ϵ usado en esta fórmula corresponde a la antocianina predominante en la muestra. Use la ϵ reportada en la literatura para el pigmento de antocianina en el solvente acuoso ácido. Si el ϵ del pigmento principal no está disponible, o si la composición de la muestra es desconocida, calcule el contenido del pigmento como cianidin-3-glucósido, donde $MW = 449.2$ y $\epsilon = 26,900$ (ver Información de Apoyo, discusión de la absorptividad molar).

Fuente: (Alvarado, 2011)

Protocolo para la Preparación de soluciones Buffer

Solución Buffer de cloruro de potasio 0,025 M pH 1

Mezclar 1,86 g de KC y 980 ml de agua en un recipiente. Medir el pH y ajustar a 1 con HCl concentrado. Transferir a un frasco volumétrico de 1 litro y llenar con agua destilada.

La solución debe ser estable a temperatura ambiente durante unos pocos meses, pero el pH debe verificarse y ajustarse antes de su uso.

Solución buffer de Acetato de sodio, 0,4 M-PH 4,5

Mezclar 54,43 g de $\text{NaCH}_3\text{CO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 960 ml de agua destilada en un recipiente, medir el pH y ajustar con HCl concentrado.

La solución debe ser estable a temperatura ambiente durante unos pocos meses, pero el pH debe verificarse y ajustarse antes de su uso. (Carvallo, 2019)

ANEXO D

FOTOGRAFÍAS DEL PROCESO



Lavado y cortado de la materia prima



pesado



Medición de pH solución acidificada



Triturado de moras



Extracción con Agitación







Filtrado



(ML)Residuo primera extracción



(ML) Residuo segunda extracción

	
<p>(MCM) Residuo primera extracción</p>	<p>(MCM) Residuo segunda extracción</p>
	
<p>Filtrado primera extracción (ML)</p>	<p>Filtrado segunda Extracción (ML)</p>



Filtrado primera Extracción (MCM)



Filtrado segunda Extracción (MCM)



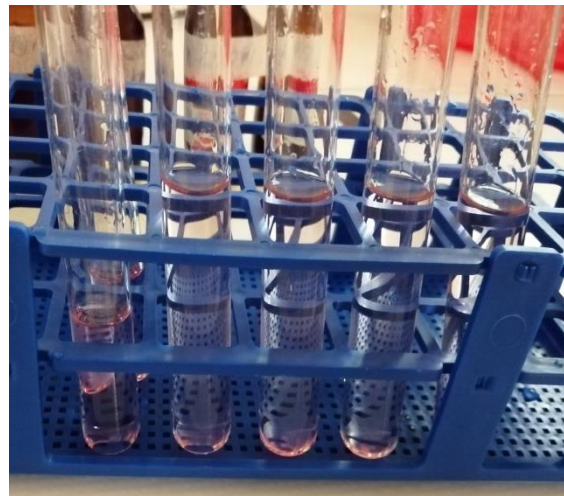
Concentración del extracto en Rota-evaporador



Extracto concentrado de Antocianinas



Muestras a pH-1



Muestras a pH-4,5