

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**OBTENCIÓN DE COLORANTE NATURAL (*Antocianos*) DEL  
HOLLEJO DE UVA NEGRA**

**Por:**

**DAYSI COLQUE VALDEZ**

**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.**

**Agosto del 2017**

**TARIJA–BOLIVIA**

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación es obtener y estabilizar el extracto de antocianinas del hollejo de uva negra y evaluar su potencial como colorante natural en el yogurt.

El trabajo está compuesto por los siguientes capítulos:

- En el capítulo I se describe los antecedentes, la justificación y los objetivos en los que se basa el desarrollo de la investigación.
- La descripción de las consideraciones acerca de la materia prima y sus derivados se encuentran en marcadas en el capítulo II.
- En el capítulo III se describe el marco teórico, el mismo, que se encuentra los fundamentos teóricos y metodologías aplicadas en la investigación.
- El capítulo IV muestra el desarrollo experimental en la obtención del colorante natural, que abarca desde los materiales empleados en la investigación, materia prima, la aplicación del método seleccionado y un resumen de los diferentes costos.
- Finalmente, en el capítulo V representa las conclusiones al que se llegó y las recomendaciones basadas particularmente en el desarrollo experimental del trabajo.
- Concluyendo, qué se obtuvo mayor cantidad de antocianinas totales (mg/l) fue en la muestra Tannat dando un valor de 22,282 y en la muestra Cabernet Sauvignon con un valor de 8,283 a una temperatura de 15 °C, con un pH=3. El rendimiento del proceso de extracción da un valor del 89,32 %.

**CAPÍTULO I  
INTRODUCCIÓN.**

### 1.1. Antecedentes Generales.

La vid es una de las primeras plantas que cultivó el hombre, motivo por el cual ha jugado un papel trascendental en la economía de las antiguas civilizaciones tras la mitigación del vino por parte del cristianismo, el cultivo de la vid experimentó un gran auge que ha perdurado hasta nuestros días. De hecho la mayor parte de la producción de uva se destina a la elaboración de distintos tipos de vino (blanco, rosado y tinto) y otras bebidas (singani, mosto y mistelas).

Hoy en día, la vid se cultiva en casi todas las regiones del mundo, siendo los mayores productores: Australia, Sudáfrica, los países de Europa y en el continente Americano, los mejores viñedos se encuentran en California, Chile y Argentina.

En 1570 llegó a BOLIVIA traída por los misioneros en su función evangelizadora extendiéndose en los valles de Mizque pasando a los valles de Camargo (1584) Caracoto, Luribay y el Valle Central de Tarija.<sup>[1]</sup>

El cultivo de la vid en el departamento de Tarija se encuentra concentrado en la provincia de Avilés, en las comunidades de Calamuchita, Muturayo y el Valle Concepción, además en Cercado en la zona de Santa Ana, lugar donde se ubican las principales bodegas Tarijeñas como Aranjuez, Kohlberg, Campos de Solana y Casa Real.<sup>[2]</sup>

Variedades de vid cultivadas en los valles de Camargo y Tarija:

- **Uva de mesa, blanca.-** Moscatel de Alejandría (doble propósito, para mesa y singani.), Moscatel Sanjuanina, Moscatel de Asti, Italia, Dattier de Beyrouth, Blanca Criolla, Aurora, Superior, La Esprin, Sultanina (sin semilla), Perlette (sin semilla).

- **Uva de mesa, negra.-** Cereza, Moscatel de Hamburgo, Alfonso La Valle, Negra Criolla, Blas Siglers.
- **Uva de mesa, rosada.-** Cardinal, Moscatel Rosada, Red-Globe, Rosada Criolla.
- **Uva de vinificación, blanca.-** Chardonnay, Chenin Blanc, Macabeo, Riesling, Pedro Jiménez, Xarello, Parellada, Torrontes, Pinot Blanca, Franc Colombar, Ugni Blanc, Sauvignon Blanc, Semillón.
- **Uva de vinificación, negra.-** Cabernet Sauvignon, Tannat, Babera De Asti, Cariñena, Garnacha, Pinot Noir, Alicante, Gamay, Syrah, Favorita Diaz, Merlot del Antigal, Rubí Cabernet, Malbec, Grinolina, Tempranillo.

En la tabla I-1. Se presenta un detalle de la superficie vitícola cultivada por municipio.

**Tabla I-1**  
**Superficie de Vid cultivada en Tarija.**

<b>Municipio</b>	<b>Casos</b>	<b>Ha</b>	<b>%</b>
Tarija	466	679,07	31,75
Padcaya	31	10,05	0,47
Bermejo	9	7,05	0,33
Yacuiba	62	50,68	2,37
Caraparí	12	8,1	0,38
Villa Montes	15	10,75	0,50
Uriondo	2.131	1.305,32	61,03
Yunchára	139	23,43	1,10
Villa San Lorenzo	37	21,66	1,01
El Puente	165	20,37	0,95
Entre Ríos	1	2,25	0,11
<b>Total</b>	<b>3.068</b>	<b>2.138,73</b>	<b>100</b>

**Fuente:** Censo Nacional Agropecuario 2013 INE.

#### ❖ **Composición de los orujos.**

Los orujos son los residuos sólidos, desechos del proceso de vinificación y que están compuestos por semillas y hollejos. <sup>[3]</sup>

En general, el orujo se encuentra constituido por un aglomerado de hollejo, semillas y raspones con las siguientes características:

- Semillas o pepitas ..... 60 %
- Raspones ..... 3 %
- Piel o hollejo ..... 37 %
- Humedad del hollejo..... 75 %
- Cantidad de Antocianinas..... 150 mg. /100 g de hollejo.

### **1.1.1. Aspectos del producto.**

Los colorantes naturales presentan demanda considerable en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica para reemplazar a los colorantes sintéticos, debido a su naturaleza química, inocuidad y funcionalidad. Entre estos colorantes naturales se encuentran las antocianinas que se distribuyen ampliamente en el reino vegetal y están presentes en raíces, tallos, hojas, flores y frutos de las plantas superiores.<sup>[4]</sup>

Los colorantes naturales son usados en la elaboración de alimentos por las siguientes razones:

- Entregan al producto alimenticio el color deseado y característico, creando una apariencia apetitosa.
- Realzan la apreciación del sabor. Y permiten estandarizar las variaciones naturales del color, o aquellas resultantes del proceso.<sup>[5]</sup>

Las antocianinas como colorantes alimenticias se han convertido en una opción interesante para la industria alimenticia como posibles sustitutas de los colorantes sintéticos. Adicionalmente estas sustancias poseen un valor agregado por su capacidad antioxidante y citotóxica.

De acuerdo con su estructura, el color de las antocianinas varía según los grupos que se encuentren unidos a ella como hidroxilo, entoxilo, azúcares acilados.

Aplicaciones en bebidas alcohólicas y no alcohólicas, confites, helados, yogurt, productos farmacéuticos y cosméticos.

## **1.2. Objetivos del proyecto.**

### **1.2.1. Objetivo General**

- Obtener colorante natural (Antocianos) para la industria alimenticia, del hollejo de uva negra.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar la materia prima, hollejo de uva negra para la obtención de colorante natural para la industria alimenticia.
- Definir las variedades de uva a utilizar, para la obtención de antocianos en la industria alimenticia.
- Diseñar la fase experimental del proceso de obtención de colorante natural para la industria alimenticia, del hollejo de uva negra.
- Caracterizar las propiedades y calidad del colorante natural para la industria alimenticia, obtenido del hollejo de uva negra.
- Analizar y valorar los resultados en el proceso obtención de colorante natural para la industria alimenticia, del hollejo de uva negra.

## **1.3. Justificación del proyecto de grado.**

### **1.3.1. Impacto Social.**

Los colorantes son, entre los aditivos alimentarios, los que desde los años setenta han suscitado por parte de los consumidores un mayor rechazo. Sin duda, esto es debido a que muchos de ellos son productos de síntesis química, la imagen misma de los aditivos “artificiales”. De hecho, se han prohibido varios colorantes sintéticos derivados del carbón debido a su toxicidad.

Las restricciones en el uso de los colorantes artificiales en el rubro alimenticio han originado una atención preferencial de parte de los investigadores e industriales por los colorantes naturales. Estos colorantes naturales deben competir en costos de

producción con los colorantes artificiales y además deben proporcionar coloraciones intensas y regulares. <sup>[6]</sup>

Por su naturaleza, ciertos pigmentos naturales, además de sus características cromóforas, poseen propiedades vitamínicas. Así, los de origen vegetal aparecen como los más adecuados para reemplazar a los artificiales en la industria alimenticia.

### **1.3.2. Impacto Tecnológico.**

Se exploran nuevas tecnologías que permitan el aprovechamiento de los residuos de la uva (hollejos) que pueden ser utilizados para extraer colorante natural (antocianos) de amplio uso en las industrias alimentarias.

### **1.3.3. Impacto Económico.**

Los hollejos de la uva han constituido la principal fuente industrial de colorantes antocianicos, siendo Italia el principal proveedor con una producción mundial de 65 millones de toneladas, los hollejos de uva constituyen una fuente abundante y económica de producción de antocianos proveniente de un material de desecho actualmente no aprovechado en Bolivia. (Mazza G, Miniati E). <sup>[7]</sup>

### **1.3.4. Impacto Ambiental.**

La mayor parte de los procesos agroindustriales comportan la generación de una cantidad considerable de residuos que muy frecuentemente son desechados, llegando a causar serios problemas de contaminación local.

Es deseable en consecuencia, que la agroindustria no sólo le de valor añadido a la materia prima de insumo sino que también, en lo posible, transforme los desechos en productos de alto valor.

**CAPÍTULO II**  
**CONSIDERACIONES DE LA MATERIA**  
**PRIMA Y SUS DERIVADOS.**

## 2.1. Introducción.

Los colorantes se lo define como:

- Aquellas sustancias naturales que añaden o devuelven algún color, además se encuentran presentes como pigmentos en plantas, hojas, y frutos.
- Los preparados obtenidos a partir de algunas partes específicas de ciertas plantas naturales empleando un método de extracción física o química que ocasiona una selección de los pigmentos que se usan como componentes nutritivos o aromáticos.

En general un colorante se puede definir como: “Cualquiera de los productos químicos pertenecientes a un extenso grupo de sustancias, empleados para colorear tejidos, tintas, productos alimenticios y otras sustancias. En la moderna terminología industrial, se amplía el concepto de colorantes a los productos que contienen colorantes orgánicos puros junto con agentes reductores o de relleno que los hacen más manejables”.

Los colorantes naturales los podemos definir como: “Aquellos que se obtienen de la materia animal y vegetal sin proceso químico. Estos son principalmente colorantes mordientes, aunque se conocen unos de la tina de disolventes, de pigmentos, directos y de los tipos ácidos. No se conocen colorantes naturales del tipo sulfurados, dispersos, azoicos o en rama”. (Kirk-Othmer, 1998).<sup>[8]</sup>

Los consumidores marcan la pauta respecto al reemplazo progresivo de colorantes sintéticos por colorantes naturales en los alimentos. La tendencia al consumo de lo natural es cada vez más fuerte y el uso de ellos es considerado un atributo de calidad del producto.

Algunos factores que influyen al momento de tomar la decisión de utilizar un colorante natural, y que se relacionan con los principales desafíos en su utilización, son:

- Costo mayor que el de su equivalente sintético.
- Estabilidad del color y su dependencia de factores tales como pH, temperatura, exposición a la luz y reacciones de oxidación con otros ingredientes.
- Uniformidad del color durante el procesamiento y almacenaje del alimento.
- Durabilidad del color y alteración del sabor durante el período de almacenaje del alimento.
- Inocuidad y propiedades benéficas para la salud que se atribuyen a algunos pigmentos naturales.

Sin duda la clave del éxito para consolidar el cambio de colorantes sintéticos por naturales, está en el manejo de los factores antes mencionados.<sup>[9]</sup>

Los colorantes exentos de certificación o reconocidos generalmente como seguras GRAS (Generalmente es reconocido como seguro), son los pigmentos naturales o determinados colorantes sintéticos idénticos a los naturales. Estas sustancias se pueden utilizar con la aplicación de las buenas prácticas de manufactura.

Tanto los colorantes sintéticos como los pigmentos naturales poseen ventajas y desventajas (Tabla II-1) que deben de tomarse en cuenta para su uso en la industria de alimentos. Aunque los colorantes sintéticos brindan un color más llamativo que los pigmentos naturales no hay que perder de vista el daño en la salud de los consumidores que pudieran ocasionar.<sup>[10]</sup>

**Tabla II-1****Ventajas y desventajas de usar pigmentos naturales o colorantes sintéticos o artificiales.**

	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Colorantes sintéticos</b>	Mayor poder tintóreo Mayor estabilidad en las condiciones de procesado y almacenamiento. Solubles en agua. Presentación líquida y sólida.	Producen efectos en la salud como alergias, hiperactividad y déficit de atención en niños.
<b>Pigmentos naturales</b>	No producen efectos en la salud.	Carecen de fuerza tintorera. Aportan sabores que muchas veces no se complementan con el sabor del producto elaborado.

**Fuente:** Colores Alimentarios en la salud (2012).

Los colorantes permitidos actualmente en alimentos se mencionan en la (Tabla II-2).

Existe una larga lista de pigmentos naturales porque la demanda de estos productos ha aumentado. Los consumidores en la actualidad ponen mayor atención en las etiquetas de los alimentos que utilicen insumos de origen orgánico y natural porque cuidan más de su salud, por lo tanto los fabricantes de aditivos alimentarios están buscando más productos naturales para sustituir a los artificiales.

**Tabla II-2**  
**Colorantes Usados en la Industria Alimentaria.**

<b>Pigmentos Naturales</b>	<b>Colorantes Sintéticos (Artificiales)</b>
Extracto de bija (Annato)	Azul No. 1 (Azul brillante FCP)
Remolacha deshidratada	Azul No. 2 (Indigotina)
Cantaxantina ( $\beta$ -caroteno-4,4'diona), $\beta$ apo-8'-carotenal y carotenal	Amarillo No. 5 (Tartrazina)
Extracto de cochinilla	Amarillo No. 6
Complejo clorofilina sódica con cobre	Rojo No. 3 (Eritrosina)
Caramelo	Rojo No. 40 (6-hidroxi-5-[2-metoxi-5-metil-
Harina de semilla de algodón	Verde No. 3 (Verde firme)
Gluconato	Dióxido de titanio
Lactato ferroso	
Extracto de hollejo de uva	
Extracto colorante de uva	
Jugos de frutas y verduras	
Aceite de zanahoria	
Pimentón o la oleorresina del pimentón	
Riboflavina o Vitamina B2	
Azafrán	
Óxido de titanio	
Curcumina o su oleorresina	

**Fuente:** Colores Alimentarios en la salud (2012).

## **2.2. Descripción de las variedades de uvas a ser estudiadas.**

El racimo está compuesto por dos partes bien diferenciadas, que vienen a ser el escobajo y el grano o fruto.<sup>[11]</sup>

**Tabla II-3****Composición química de racimo de uva.**

<b>Racimo</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Escobajo	3 - 7
Pulpa	75 - 85
Cáscara	6 - 9
Semillas	2 - 5

**Fuente:** Eduardo Dellacassa.

**Tabla II-4****Composición química del escobajo de la uva.**

<b>Escobajo</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	70 - 80
Pobre en azúcares	1
Riqueza media en ác. salificados	1
Menor cantidad de ác. libres	0.3-0.6
Rico en sust. minerales	2 - 2.5
Rico en polifenoles	2
Sust. nitrogenadas	1 - 1.5

**Fuente:** Eduardo Dellacassa.

**Tabla II-5****Composición química de las semillas de la uva.**

<b>Semillas</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	25 - 45
Gran cantidad de azúcares	34 - 36
Aceites (ácido oleico y linoleico)	13 - 20
Alto contenido de polifenoles	4 - 6
Sust. Minerales	2 - 4
Sust. nitrogenadas	4 - 6
Sust. aromáticas (vainillina)	Trazas

**Fuente:** Eduardo Dellacassa.

**Tabla II-6****Composición química de la cáscara de uva.**

<b>Cáscara</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	70 - 80
Pequeña cantidad de azúcares	1
Ácidos	1
Sust. minerales	1.5 - 2
Comp. Polifenólicos	2.5
Sust. Aromáticas	Trazas
Sust. nitrogenadas (proteínas)	10 - 15
Rica en celulosa y pectinas	2 - 2.5

**Fuente:** Eduardo Dellacassa.

**Tabla II-7**

**Composición química de la pulpa de uva.**

<b>Pulpa</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	70 - 78
Azúcares	12- 25
Ác. Orgánicos libres	0.3-0.6
Ác. Salificados	0.3-1.0
Sust. minerales	0.2-0.3
Comp. polifenólicos	Trazas
Sust. Aromáticas	Trazas
Sust. nitrogenadas (20 a 25 % del N del grano)	0.1
Pectinas en poca cantidad	0.05-0.1

**Fuente:** Eduardo Dellacassa.

**2.2.1. Uva Tannat.**

Tannat es una variedad de uva originaria del Suroeste de Francia, de la cual se obtiene vino tinto, vino rosado o blanco. En la actualidad los principales cultivos se encuentran en Francia, Argentina, Bolivia (en la zona de Tarija), Brasil (Río Grande del Sur) y Uruguay.

**2.2.1.1. Características de la cepa.**

La uva Tannat tiene hojas medianas, muy ampolladas, de color verde oscuro en primavera y en verano, mismas que adquieren tonalidades cada vez más rojizas conforme avanza otoño.

Presenta una baya esférica de tamaño mediano a veces con dos aleorones, agrupada en un racimo no muy apretado. Su piel es fina, de color violáceo muy oscuro.

A la vista, el vino Tannat presume su intensa coloración roja violácea, a veces con tonalidades granate, limpia y brillante.

En su aroma predominan los frutos silvestres rojos y negros muy maduros del bosque.

Sus taninos son redondos y superan en intensidad a los de la Cabernet Sauvignon. Son vinos muy concentrados, potentes estructurado y de gran complejidad. Con frecuencia destaca su delicado sabor a moras. Se caracterizan por un notable balance entre acidez y la fruta. <sup>[12]</sup>

**Figura 2-1**

**Racimo de la uva Tannat.**



#### **2.2.1.2. El Tannat y la salud.**

Desde la difusión de la “paradoja francesa” en 1992, es ampliamente conocida la influencia benéfica del vino tinto en la salud humana, particularmente por la presencia de antioxidantes que bloqueen a los radicales libres que provocan el depósito de colesterol en las arterias, con el consiguiente riesgo de infarto al corazón.

Una investigación desarrollada en el Instituto Clemente Estable de Montevideo comparó el poder antioxidante de tres cepas tintas: Merlot, Cabernet Sauvignon y Tannat, es un estudio que duro dos años y concluyó que el poder antioxidante de la Tannat es el doble de la Cabernet Sauvignon y cuatro veces mayor al del merlot. El poder antioxidante se debe a la presencia de poli fenoles, que ceden los hollejos al vino durante la fermentación. <sup>[13]</sup>

#### **2.2.2. Uva Cabernet Sauvignon.**

La Cabernet Sauvignon es una variedad de uva tinta de procedencia francesa (burdeos) y la más demandada en la viticultura internacional de vinos tintos, por su excepcional adaptación a las zonas templadas y calientes del todo el mundo.

##### **2.2.2.1. Características de la cepa.**

La uva Cabernet Sauvignon tiene hojas con ápice de crecimiento algodonoso, con vellosidades rojas en primavera. Las hojas jóvenes son bronceadas. Ya adulta, es redonda.

Presenta unas bayas de piel gruesa, redondas, negras y jugosas. Se caracterizan por el sabor a cassis o, a veces, a pigmento, según las zonas y el sistema de cultivo utilizado. Su racimo es suelto, sin los granos apretados, aunque compacto, de color negro azulado, cónico.

Con la Cabernet Sauvignon se obtiene un vino de color rojo intenso, con olor a ciruela, matices violáceos, de cuerpo, alcohólico, aromático y provisto de un leve y

característico sabor a herbáceo (sabor reconocido a grosellas, cerezas negras y a ciruelas.<sup>[14]</sup>

**Figura 2-2**

**Racimo de la uva Cabernet Sauvignon.**



### **2.3. Antocianinas.**

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

Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades. Cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (Castañeda-Ovando et al., 2009a; Moldovan et al., 2012).

Estos atributos de las antocianinas, colorantes y antioxidantes, resultan de interés a efectos de estudiar metodologías de extracción para poder utilizar posteriormente el producto en aplicaciones tecnológicas, especialmente como ingrediente en la

industria alimentaria e incorporarlo a alimentos y bebidas (Castañeda-Ovando et al., 2009a; Faria et al., 2005).

Para abordar este desafío, es conveniente estudiar primero la estructura química de estos compuestos y los distintos factores que pudieren afectar su estabilidad. <sup>[15]</sup>

### **2.3.1. Estructura química.**

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta (Wang y Xu, 2007; Kalt et al., 2003) en hojas, flores y frutos, y son especialmente importantes en arándano (Kong et al., 2003).

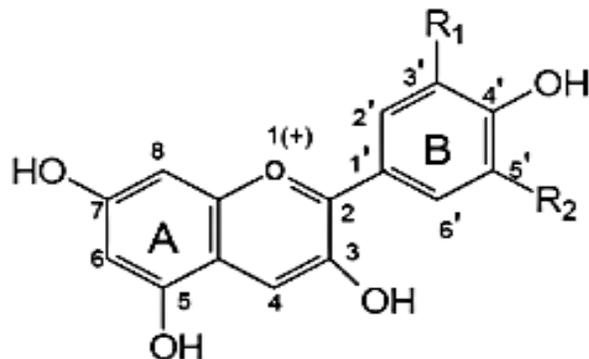
Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: Un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (Aguilera Ortíz et al., 2011). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Figura 2-3).

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. <sup>[15]</sup>

Figura 2-3

Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.



Aglicona	Sustitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Espectro visible
Pelargonidna	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja- rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul- rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja- rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul- rojo)
Malvinidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul- rojo)

Fuente: Garzón (2008).

### 2.3.2. Estabilidad de antocianinas.

#### 2.3.2.1. 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 2-4). A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas (Figura 2-4.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 formas quinodales (Figura 2-4.B, C y D) de color azul. A pH entre 5 y 6 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora (Figura 2-

4.E), y chalcona, de color amarillo (Figura 2-4.F), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire.

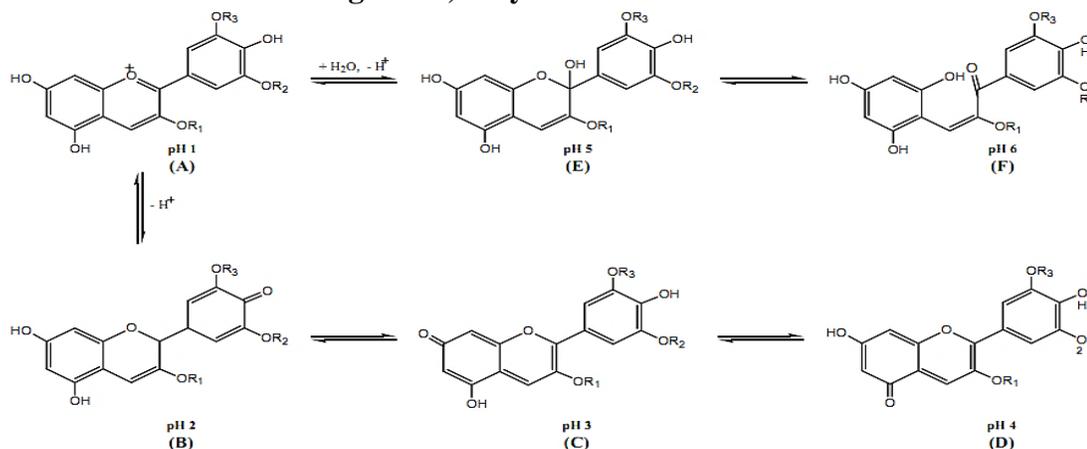
Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (Moldovan et al., 2012; Castañeda-Ovando et al., 2009a; Garzón, 2008).

A pH entre 4 y 6, pH característico de las frutas y hortalizas frescas o procesadas, se observa una mezcla en equilibrio de las formas catión flavilio, bases quinodales y carbinol, como así también de la forma chalcona (Moldovan et al., 2012).

Bordignon et al. (2009) estudiaron la extracción de antocianinas de frutillas en el rango de pH de 1.0 a 13.0 y obtuvieron que la mejor extracción fue al valor más bajo de pH. En el estudio de cinética de degradación de antocianinas presentes en extractos de arándanos agrios (*Viburnum opulus* L.) durante el almacenamiento a los pH 3 y 7, Moldovan et al. (2012), obtuvieron que la menor degradación se produjo con el valor más bajo de pH. [14]

**Figura 2-4**

**Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde R1= H o glúcido, R2 y R3= H o metilo.**



**Fuente:** Castañeda-Ovando et al., 2009a.

También Laleh et al. (2006) investigaron sobre la influencia del pH en extractos de antocianinas de 4 especies de berberies, observando que cuanto más bajo fue el pH, menor fue el deterioro de las antocianinas.

De lo expuesto se puede señalar que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. Es por esto que las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (Aguilera Ortíz et al., 2011).<sup>[15]</sup>

### **2.3.2.2. Temperatura.**

La temperatura es otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas (Min-Sheng y Po-Jung, 2007). Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60°C) se degradan.

En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto las antocianinas altamente hidroxiladas, son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosidadas o acetiladas (Fennema, 2000). Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

En la extracción de antocianinas de grosellas negras Cacace y Mazza (2003) investigaron el efecto de la temperatura de extracción en el rango de 6 y 74°C, obteniendo los mayores rendimientos a 30-35°C. Laleh et al. (2006) obtuvieron extractos de antocianinas de 4 especies de berberies y lo almacenaron durante 84 días

a temperaturas entre 5 y 35°C, observando que el deterioro de las antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura. También Devi et al. (2012) llegaron a la misma conclusión al estudiar la estabilidad de antocianinas extraídas de salvado de sorgos rojos y almacenados en botellas entre 0 y 70°C. [15]

Falcáó et al. (2008), reportaron en su estudio de evaluación de la estabilidad de antocianinas de extractos crudos de cáscara de uva Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) que la vida media de antocianinas y el porcentaje de retención del color fueron mayores a temperatura de  $4 \pm 1$  °C, a pH 3.0 y en ausencia de la luz. Sin embargo, la degradación de antocianinas fue mayor cuando la temperatura de almacenamiento fue de  $29 \pm 2$  °C a las mismas condiciones. Ersus y Yurdagel (2007), observaron un comportamiento similar en antocianinas de Zanahoria negra micro encapsuladas, en donde la vida media de los pigmentos fue tres veces mayor a temperaturas de almacenamiento de 4°C con respecto al almacenamiento a 25°C. [16]

### **2.3.2.3. Otros factores.**

#### **2.3.2.3.1. Oxígeno.**

El oxígeno puede causar la degradación de las antocianinas por mecanismos de oxidación directa e indirecta, cuando se oxidan constituyentes del medio y éstos reaccionan con las antocianinas (Falcáó et al. 2003). Según Cano et al. (2008), muestras de vinos sometidas a micro-oxigenación presentaron un alto porcentaje de nuevos pigmentos derivados de las antocianinas, que aumentaron significativamente la intensidad del color del vino. Estos cambios de color son resultado de la formación de polímeros de color marrón producto de reacciones de polimerización (Geldenhuyts 2009).

El efecto del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas se encuentra relacionado. El ácido ascórbico decolora las antocianinas en presencia de oxígeno y de iones cobre o hierro por formación de peróxido de hidrógeno, produciéndose la degradación de ambos compuestos cuando se almacenan por

tiempos prolongados (Badui 2006). Asimismo, el efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas puede estar relacionado con una reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos (Poei y Wrolstad 1981).

Garzón y Wrolstad (2002), confirmaron la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente, tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. <sup>[16]</sup>

#### **2.3.2.3.2. Agua.**

Olaya et al. (2009), observaron que una actividad de agua de 0.35 causó la mayor tasa de degradación en antocianinas de Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth) y Tamarillo (*Solanum betaceum* C) a una temperatura de almacenamiento de 40 °C. La causa de degradación de las antocianinas por efecto de la actividad de agua, es probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón y Wrolstad 2001; Fleschhut et al. 2006). <sup>[16]</sup>

#### **2.3.2.3.3. Luz.**

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el C-5 hace que la antocianina es más susceptible a la foto degradación.

Por lo tanto, resulta importante proteger, no sólo del oxígeno, sino también de la luz a los productos ricos en antocianinas. <sup>[15]</sup>

Las antocianinas son colorantes interesantes por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, ya que por sus colores atractivos se las puede utilizar como colorantes alimentarios naturales, y por sus potenciales beneficios a la salud (Aguilera Ortiz et al., 2011; Bridgers et al., 2010; Castañeda-Ovando et al., 2009a). De hecho, el empleo de antocianinas como colorantes se encuentra contemplada en el Código Alimentario Argentino (2012), como así también en la lista de colorantes alimentarios autorizados en la Unión Europea (Astiasarán et al., 2003). <sup>[14]</sup>

La Comisión Europea establecen las normas de identidad y pureza de los colorantes utilizados en los productos alimenticios. <sup>[17]</sup>

**Definición:** Las antocianinas se obtienen mediante extracción con agua sulfitada, agua acidificada, dióxido de carbono, metanol o etanol a partir de las cepas naturales de hortalizas y frutas comestibles. Las antocianinas contienen componentes comunes del material de origen, como antocianina, ácidos orgánicos, taninos, azúcares, minerales, etc., pero no necesariamente en las mismas proporciones que se encuentran en el material de origen.

Clase	Antocianina
Einecs	208-438-6 (cianidina); 205-125-6 (peonidina); 208-437-0 (delfinidina); 211-403-8 (malvidina), 205-127-7 (pelargonidina)
Denominaciones químicas	Cloruro de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavilio (cianidina) Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxiflavilio (peonidina) Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3',5'-dimetoxiflavilio (malvidina) Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5, trihidroxifenil)-1-benzopirilio (delfinidina) Cloruro de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-5'-metoxiflavilio (petunidina) Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1-benzopirilio (pelargonidina)
Fórmula química	Cianidina: C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub> Cl Peonidina : C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub> Cl Malvidina: C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub> Cl Delfinidina: C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub> Cl Petunidina: C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub> Cl Pelargonida: C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> OCl
Peso molecular	Cianidina: 322,6 Peonidina: 336,7 Malvidina: 366,7 Delfinidina: 340,6 Petunidina: 352,7

Determinación	Pelargonidina: 306,7
Descripción	$E^{1\%}_{1\text{cm}}$ 300 para el pigmento puro a 515 nm -535 nm a pH 3,0 Líquido, polvo o pasta de color rojo púrpura, con olor ligero característico
Identificación	Máximo en metanol con 0,01 % de HCl concentrado
Espectrometría	Cianidina: 535 nm Peonidina: 532 nm Malvidina: 542 nm Delfinidina: 546 nm Petunidina: 543 nm Pelargonidina: 530 nm
Pureza	Metanol      No más de 50 mg/kg por separado o en
Residuos de disolventes	Etanol        conjunto
Dióxido de azufre	No más de 1 000 mg/kg por porcentaje de pigmento
Arsénico	No más de 3 mg/kg
Plomo	No más de 10 mg/kg
Mercurio	No más de 1 mg/kg
Cadmio	No más de 1 mg/kg
Metales pesados (expresados en Pb)	No más de 40 mg/kg

**CAPÍTULO III**  
**MARCO TEÓRICO.**

### **3.1. Extracción de antocianinas.** <sup>[15]</sup>

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Francis y Markakis, 1989; Wrolstad, 2000). El método usual de extracción es la extracción sólido-líquido. Sin embargo, es de destacar la existencia de otros métodos. Así, científicos japoneses desarrollaron una metodología alternativa que consiste en extraer las antocianinas mediante la fermentación de las matrices que las contienen (Fan et al., 2008b).

A nivel comercial, las antocianinas se obtienen principalmente de los subproductos industriales de la uva. En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, no sólo los colorantes, presentan propiedades antioxidantes (Fennema, 2000).

En relación a la extracción, Rodríguez y Wolstrad (2001) señalan que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidróxilo, metóxilo, glucósidos y, especialmente, grupos acilos, además de por factores como la temperatura y la luz (Francis y Markakis, 1989; Wrolstad, 2000).

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Así, en el caso de las antocianinas, se debe maximizar la extracción de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos.

En este sentido, Gorriti Gutiérrez et al (2009a) estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Ensayaron

extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción. Los resultados obtenidos indicaron 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 más desfavorables fueron 25°C y 30 minutos. También estudiaron la influencia de otras variables de proceso como el solvente, el pH, la temperatura y el tiempo de extracción (Gorriti Gutiérrez et al. 2009 b). 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.

Cacace y Mazza (2003) publicaron un trabajo que consistió en la optimización de la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras usando etanol acuoso como solvente de extracción. Las variables independientes seleccionadas por estos investigadores fueron: Concentración de etanol, temperatura y relación solvente-sólido. Dos de las respuestas evaluadas fueron la concentración de polifenoles totales y la concentración de antocianinas. Los resultados obtenidos mostraron que los mejores resultados se obtuvieron con una concentración de etanol de 60 %, una relación solvente-sólido 19 l: 1kg de frutos y una temperatura de 30°C. La elevación de la temperatura de extracción no afectó la extracción de fenoles, sin embargo, provocó una disminución en el rendimiento de extracción de antocianinas debido a la degradación de las mismas. Se identificó la existencia de una temperatura crítica a partir de la cual la degradación fue mayor. Esta temperatura aumentó con la concentración de etanol. Así, para una concentración de etanol de 20 % la temperatura crítica fue 25°C, mientras que para una concentración de etanol de 95 %, la temperatura crítica fue 35°C. En general, hubo una fuerte disminución en la concentración de las antocianinas extraídas a temperaturas superiores a 45°C.

También Fan et al. (2008a) investigaron sobre las condiciones de extracción de antocianinas presentes en batata morada. Trabajaron con etanol como solvente de extracción acidificado con ácido clorhídrico, cuyas variables independientes fueron: Temperatura de extracción, tiempo y relación sólido-líquido y como respuesta

evaluaron el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura de extracción y la relación sólido-líquido aumentaron el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo no tuvo efecto significativo. Estos autores obtuvieron que la mejor combinación de las variables fuera temperatura de 80°C, relación sólido- líquido 1:32 y tiempo de extracción 60 minutos.

Bordignon et al. (2009), investigaron sobre la extracción de antocianinas de frutillas con una solución etanólica en el rango de pH de 1.0 a 13.0 y fue a pH 1 cuando obtuvieron la mejor extracción de antocianina.

En cuanto a la extracción de antocianinas por fermentación de una matriz, es una técnica relativamente novedosa que no ha sido todavía muy estudiada. Kousuke et al. (1990) estudiaron 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 métodos extracción sólido-líquido, sin embargo, no aportaron datos de los componentes de las antocianinas extraídos y de su estabilidad. (Fan et al., 2008b).

Por otro lado, durante la fermentación, las levaduras producen a partir de los azúcares presentes, además de etanol y dióxido de carbono, metabolitos secundarios tales como alcoholes superiores, éter etílico y ácidos grasos. Estos metabolitos secundarios se pueden combinar con las antocianinas y formar proantocianinas que son más estables que las primeras (Pretorius, 2000). Dado que esta última metodología constituye una alternativa a la extracción con solventes, se considera muy interesante profundizar en las posibilidades que presenta.

### **3.2. Antocianinas presentes en la cáscara de pitahaya (Hylocereus - Undatus).<sup>[18]</sup>**

#### **3.2.1. Metodología.**

Ricardo Figuero y Cols. (2011). Seleccionaron las pitahayas (*Hylocereus undatus*) cerciorándose de que no tuvieran daño en la cáscara, que sean de similar tamaño y color, posteriormente se procedió a separar la cáscara del fruto, la cual fue trozada en pequeños fragmentos para ser colocadas en la estufa a 45°C durante 24 horas para su secado. Una vez secos los trozos de cáscara, estos fueron molidos. Todas las moliendas fueron mezcladas y homogenizadas, teniendo como resultado un único polvo homogéneo de la cáscara de pitahaya, el cual fue la fuente de extracción del pigmento.

La extracción de la antocianina se realizó mediante la utilización de metanol acidificado al 0.01 %, homogenizando por 10 min para luego refrigerar durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se homogeniza de nuevo y se filtra a vacío, el sobrenadante se concentra en un rota vapor a 40°C durante 8 minutos. El extracto obtenido anteriormente contiene la antocianina de interés pero a su vez contiene interferencias para su análisis tales como fenólicos, azúcares y ácidos por lo que para eliminarlas se utilizó el siguiente método.

#### **3.2.2. Resina PVPP (Poli Vinil Poli Pirrolidona).**

Su uso principalmente se enfoca al aislamiento de compuestos polares no fenólicos. Este procedimiento consiste en colocar en un crisol un filtro de Whatman No.1 junto con una cama de 1 cm de la resina. Ésta se activa por medio de 20 ml de agua acidificada al 0.01 % con HCl seguido de 20 ml de metanol acidificado al 0.01 %. El extracto se pasa por la resina recuperando la antocianina con el metanol acidificado.

Posteriormente se concentra la antocianina purificada evaporando en rota vapor a 40°C durante 4 minutos para eliminar la porción metanólica.

### 3.2.3. Cartuchos fase reversa C18.

Su propósito es separar compuestos relativamente hidrofóbicos como las antocianinas de azúcares y ácidos. Se acondiciona el cartucho con agua acidificada seguido de metanol acidificado y nuevamente agua acidificada, para remover el metanol restante. Se coloca el extracto obtenido de la PVPP y en seguida se eluye la antocianina por el cartucho por medio de metanol acidificado.

Como siguiente paso, se remueve el metanol para obtener el extracto puro por medio de un rota vapor a 40°C durante 263 minutos para eliminar la porción metanólica restante.

La determinación de antocianinas monoméricas totales se llevó a cabo de acuerdo a la metodología del pH diferencial descrita por Giusti y Wrolstad (2001). Ésta se basa en las transformaciones estructural es que sufren las antocianinas monoméricas con un cambio en el pH; estos compuestos adquieren la conformación de catión flavilio (color rojo intenso) a pH=1 y la forma hemiacetal (incolora) a pH = 4.5.

Del extracto de antocianina concentrada y purificada en metanol acidificado al 0.01% con HCl se tomaron dos muestras de 0.5 ml y a una de las muestras se le añade buffer con pH 4.5 y a la otra buffer con pH 1. Para cada solución, se midió la absorbancia a 520 nm (longitud de onda de máxima absorbancia de las antocianinas) y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-visible usando agua destilada como blanco. La absorbancia final se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

Para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianina monomérica (mg/l)} = (A * PM * FD * 1000) / (\epsilon * l).$$

Dónde:

A: Absorbancia antes calculada (nm).

FD: Factor de disolución (volumen total/volumen del extracto).

$\varepsilon$  : Coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

PM: Peso molecular.

Para los cálculos se tomó en consideración que la antocianina mayoritaria es cianidina-3-glucósido (Van Buren, 1970), cuyo  $\varepsilon$  es de  $29600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , de peso molecular 445.2 según reporta Jurd & Asen, junto con un factor de dilución de 5.

### **3.3. Extracción y caracterización de antocianos empleadas en la elaboración del txakoli tinto de Bizkaia.** <sup>[19]</sup>

#### **3.3.1. Determinación de antocianos.**

La presencia de compuestos antociánicos en uvas y vinos ha sido demostrada empleando técnicas tales como la cromatografía sobre papel y la cromatografía en capa fina (Albach y Col., 1965; Fong y Col., 1971). Actualmente, debido a la aparición y el perfeccionamiento desarrollado sobre nuevas técnicas analíticas, el conocimiento acerca de estos pigmentos ha avanzado considerablemente.

Tras el trabajo desarrollado por Williams y Col. (1978) y Wulf y Nagel (1978), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha convertido en la técnica estandarizada para el análisis de este tipo de compuestos, ya que permite una separación rápida y prácticamente completa de los antocianos presentes en las distintas variedades de uva.

Sin embargo, la identificación de este grupo de compuestos requiere un aislamiento previo, generalmente por HPLC preparativa precedida por cromatografía en columna. El desarrollo de la espectroscopia Dio de Array, y su acoplamiento a un cromatógrafo de líquidos permite una separación e identificación simultánea de cada uno de los diferentes antocianos, de acuerdo con sus propiedades espectrales sin la necesidad de un aislamiento previo. De modo adicional, esta técnica espectroscópica

permite registrar análisis cromatográficos a diferentes longitudes de onda. Esto permite cuantificar cada antociano a la longitud de onda de máxima absorción y por otro lado, identificar mucho más rápidamente algunos de estos compuestos al ser posible registrar sus cromatogramas a las longitudes de onda características de cada uno de ellos.

A pesar de las indudables ventajas que presenta esta técnica, es necesario efectuar ciertos procedimientos de extracción y purificación de los extractos, entre los que se encuentra la cromatografía en columna, como paso previo a su inyección en el cromatógrafo de líquidos. Estos pasos previos de purificación tienen como objeto eliminar sustancias tales como azúcares y sustancias liposolubles que interfieren en el posterior análisis cromatográfico.

### **3.3.2. Parte experimental.**

#### **3.3.2.1. Extracción de pigmentos antociánicos.**

Para la extracción de este grupo de compuestos se partió de las uvas congeladas (300g). En este estado se separaron los hollejos cuidadosamente, desechando la pulpa y reservando las pepitas de cada grano.

Los hollejos se maceraron en 250 ml de metanol al 2 % en ácido clorhídrico durante 24 horas en nevera, protegiéndolos de la luz. Transcurrido este tiempo se decantó el líquido y los hollejos se pusieron en contacto con 200 ml más de la disolución de metanol al 2 % en ácido clorhídrico, dejándolo macerar de nuevo 24 horas. Tras las maceraciones, los hollejos presentaban un aspecto blanquecino. El proceso se repitió hasta eliminar por completo la coloración de los mismos.

Todos los extractos alcohólicos obtenidos tras las maceraciones se adicionaron en el mismo recipiente llevando la disolución hasta sequedad en rota vapor a 40-45°C. El residuo se disolvió posteriormente en 250 ml de vino sintético (0,5 g tartárico/l, y 10 % etanol, pH 2,4).

Esta disolución la denominaremos SOL I. Se tomaron 50 ml de la SOL I y se concentraron hasta sequedad en rota vapor a 40-45 ° C.

El residuo se disolvió en 5 ml de vino sintético. Esta nueva disolución se denominará SOL II.

Posteriormente, se tomaron 50 ml de nuevo de la SOL I, y se extrajeron en embudo de decantación tres veces consecutivas con volúmenes de 25 ml de dietiléter. La extracción con dietiléter permitió eliminar los compuestos liposolubles que pudieran haber sido extraídos en el proceso de maceración. El extracto hidro alcohólico se cromatografió en columna, empleando como fase estacionaria una mezcla de PVPP (20 %), Kiesegel 60 (70 %) y Kiesegel 60G (10 %).

Como paso posterior a la adición de muestra se efectuó el lavado de la columna con agua para eliminar los azúcares y ácidos, presentes en el extracto, que pudieran interferir en el análisis posterior del mismo. La elución de los pigmentos antociánicos se llevó a cabo empleando como disolvente metanol al 0.1 % en ácido clorhídrico. De este modo, los monómeros antociánicos, es decir los antocianos mono glucosilados se eluyen de la columna, mientras que las formas poliméricas y los taninos quedan retenidos en la parte superior de la misma.

El eluato obtenido tras la cromatografía en columna se concentró hasta sequedad en rota vapor a 40-45°C. El residuo obtenido se disolvió en 5 ml de vino sintético. Esta disolución la denominaremos SOL III.

Tanto la SOL II como la SOL III se analizarán mediante cromatografía líquida de alta resolución, acoplada a un espectro fotómetro PDA.

### **3.3.2.2. Análisis cromatográfico de los extractos.**

La técnica empleada en el análisis de los extractos fue la cromatografía líquida. Para ello se empleó una columna cromatográfica de fase reversa Hypersil ODS, de medidas 25 cm x 0.46 cm de diámetro interno y 5µm de tamaño de partícula. El relleno cromatográfico como corresponde a este tipo de cromatografía (fase reversa) es de carácter apolar, mientras que la fase móvil será de naturaleza polar.

En este caso la fase móvil estará compuesta por una mezcla de disolventes, por un lado el disolvente A, acetonitrilo y por otro el disolvente B, una mezcla acuosa de ácido fórmico al 10 %, estableciendo un flujo de 2,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l.

Se llevó a cabo el análisis con elución por gradiente, el cual se muestra a continuación

Tiempo (min)	% A	% B	Curva
-	10	90	6
15	15	85	6
30	20	80	6
45	25	75	6
50	30	70	6
60	10	90	1

Los cromatogramas se registraron a la longitud de onda máxima estimada para este grupo de compuestos, es decir, 525 nm.

### 3.3.3. Resultados y discusión.

#### 3.3.3.1. Compuestos antociánicos.

Los extractos antociánicos que denominamos SOL II y SOL III se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos después de ser filtrados a través de filtros de 0.45  $\mu$ m de membrana.

La identificación de los antocianos mono glucósidos se efectuó en base a sus tiempos de retención, y principalmente en base a sus propiedades espectrales, por comparación con los obtenidos de patrones puros, aislados en nuestro laboratorio.

Se sabe que el orden de elución de los antocianos en cromatografía en fase reversa (fase estacionaria no polar - fase móvil polar), está íntimamente relacionado con la polaridad de estos compuestos. Los más polares eluyen primero, seguidos de los menos polares. En este sentido, la delfinidin-3-monoglucósido eluye primero, seguida por orden de los 3-monoglucósidos de cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. La acilación de las moléculas antociánicas supone una mayor pérdida de polaridad en el caso de cumaratos y cafeoatos, que en el caso de acetatos. De acuerdo con esto, los pigmentos acilados con ácido acético eluyen después de los 3-monoglucósidos no acilados, seguidos de cumaratos y cafeoatos.

Por tanto, como una primera aproximación, el orden de elución como función de la polaridad puede ser empleado para caracterizar los diferentes picos cromatográfico.

En cualquier caso, la acilación disminuye la polaridad de estas sustancias, y en este punto puede mencionarse la presencia de picos cromatográficos adicionales a los correspondientes a los antocianos mono glucósidos que pueden observarse en los cromatogramas de las SOL II de todas la variedades estudiadas. No se efectuó la identificación de cada uno de estos compuestos, aun así es posible confirmar la presencia de compuestos acilados en los extractos en base a su localización en los cromatogramas y sus propiedades espectrales.

Por otro lado, un eluyente con bajo pH es vital para la separación de los antocianos. Los disolventes de elución con un pH de 2.5 producen picos ensanchados y una separación pobre. Por debajo de pH 3.2 los antocianos existen entre dos estructuras que se inter convierten, en catión flavilio rojo y la base carbinol incolora (Timberlake y col., 1967). Los picos son anchos a pH 2.5 porque a este pH coexisten en equilibrio las dos formas, y la columna cromatográfica de fase reversa las distingue, las separa.

Sin embargo, en los cromatogramas no aparecen dos picos, ya que la inter conversión entre las dos formas es constante. La disolución acuosa de fórmico al 10 %, en nuestro caso el disolvente B, tiene un pH de aproximadamente 1.5-2, y a este pH los

antocianos se encuentran prácticamente en su totalidad en forma de ion flavilio. En otros trabajos se han empleado otros disolventes para acidificar la fase móvil, tales como ácido perclórico (Preston y Timberlake, 1981), pero siempre con el respecto a las proporciones en las que aparecen los antocianos en cada una de las variedades, todas coinciden en presentar valores máximos en el contenido de malvidin-3-glucósido, seguido de peonidin-3-glucosido.

Así mismo, el contenido en delfinidin-3-glucósido de las dos variedades autóctonas era muy inferior al que se encontró para la variedad Tempranillo. En el caso de la variedad Berde Xarie, el contenido en delfinidin-3-glucósido fue significativamente menor al que presentaba la variedad Berdexa Baltza.

Las proporciones de cianidin-3-glucósido resultaron ser similares en las variedades Berdexa Baltza y Berde Xarie, mientras que la variedad Tempranillo presentaba aproximadamente el doble que éstas.

Respecto al porcentaje de peonidin-3-glucósido la variedad Berde Xarie fue la que presentó un valor destacadamente superior respecto a las demás variedades.

**CAPÍTULO IV**  
**METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.**

#### **4.1. Materiales usados en la investigación.**

##### **4.1.1. Materia Prima.**

La materia prima utilizada para el estudio fue la uva Cabernet Sauvignon y la uva Tannat, procedentes del valle central de Tarija.

Para reducir el deterioro postcosecha, los frutos se colocaron en bandejas de polietilentereftalato (Figura 4-1). Donde se introdujo en una cámara de refrigeración (-24°C) hasta el momento de utilizarlos en las diferentes experiencias planificadas.

**Figura 4-1**

**Bandejas de polilenterefalato donde fueron almacenadas las uvas.**



##### **4.1.2. Reactivos y Solventes.**

El solvente utilizado para la extracción del colorante natural (Antocianos) fue etanol al 96 %.

Los reactivos empleados para su extracción fueron:

- Ácido cítrico.
- Ácido acético.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido tartárico.

Las soluciones empleadas para la determinación de antocianos totales en el concentrado y el fruto fueron:

- Solución pH1 – H Cl 0,1 N.
- Solución tampón a pH 1.0 de cloruro de potasio 0.025 M ajustado con ácido clorhídrico.
- Solución tampón a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4 M ajustado con ácido acético.

#### **4.1.3. Equipos, Instrumentos y material de laboratorio.**

Los equipos, materiales e instrumentos que se utilizaron para la realización de la parte experimental del presente estudio se detallan en el Anexo A.

##### **4.1.3.1. Equipos de laboratorio.**

Los equipos utilizados en la parte experimental son los siguientes:

- Balanza analítica de 0,1 mg de precisión.
- Equipo de filtración al vacío (trompa de vacío, embudo buchner y kitazato)
- Licuadora Oster
- Agitador eléctrico
- pH-metro
- Rota Vapor
- Espectrofotómetro
- Centrifuga

##### **4.1.3.2. Instrumentos y material de laboratorio.**

Los materiales e instrumentos utilizados en el laboratorio se detallan en la (Tabla IV-1).

**Tabla IV-1**  
**Material e instrumentos de laboratorio.**

<b>Descripción</b>	<b>Capacidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Tipo</b>
Vasos de precipitación	100 ml	2	Vidrio
	250ml	3	
Probeta graduada	100ml	1	Vidrio
Pipetas graduadas	1ml	1	Vidrio
	5ml	1	
Varilla	-	1	Vidrio
Erlenmeyer	250ml	3	Vidrio
Kitasato	500ml	1	Vidrio
Embudo buchner Embudos	-	1	porcelana vidrio
	50 nm	1	
	75nm	1	
Tubos de ensayo con rosca	-	6	Vidrio
	250ml	18	
Frascos de vidrio ámbar	50ml	12	Vidrio
	30 ml	6	
Papel filtro	pliegues	10	-
<b>Instrumentos de laboratorio.</b>			
Termómetro	-10 a 110 °C	1	Vidrio

**Fuente:** Elaboración propia.

## **4.2. Metodología de la Investigación.**

### **4.2.1. Extracción de antocianinas.**

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de solventes ácidos. <sup>[20]</sup>

**Tabla IV-2**  
**Métodos de extracción de antocianinas.**

<b>Método</b>	<b>Características</b>
0.001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001 % HCl en etanol	80 % tan efectivo como el metanol.
0.001 % HCl en agua	27 % tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico.	Éste es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético.	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO <sub>2</sub>	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implican sistemas de etanol, ácido acético y agua.

**Fuente:** Delgado-Vargas et al., 2000.

La producción de éste pigmento bajo estos métodos de extracción, no es solamente para recuperar la mayor cantidad posible, sino también para obtener un ingrediente valuado comercialmente alto. Wilkinson et al comenzó a extraer antocianinas en 1977 usando metanol con pequeñas cantidades de HCl (Nollet, 1996).

La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirve para mantener un pH bajo. Este puede, sin embargo, alterar la forma nativa del complejo de pigmentos rompiendo asociaciones con metales, copigmentos y proteínas (Moore et al, 1982).

Para obtener antocianinas lo más naturalmente posible el uso de solventes neutros (por ejemplo, 60 % metanol, etilenglicol, n-butanol, acetona) y ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico, ácido acético) que han sido recomendados (Hendry, 1992), Kalt y Mac Donald (2002), describieron un proceso para la recuperación de

antocianinas de arándano con un sistema solvente de Me OH: H<sub>2</sub>O: Ácido fórmico (70:28:2) (Agilent Technologies, 2002).

García-Viguera et al (1998a), usaron un método para la extracción de antocianinas con acetona y al final del proceso acidificaban el extracto con agua acidificada (ácido fórmico al 3 %).<sup>[21]</sup>

Las antocianinas son compuestos solubles en solventes polares y comúnmente se extraen de sus fuentes naturales usando metanol o etanol con pocas cantidades de algunos ácidos como ácido clorhídrico, acético y fórmico, ya que el ácido mantiene el pH ácido lo que previene el desplazamiento de los equilibrios químicos de hidratación y formación de chalconas.

Adicionalmente el uso de ácidos débiles previene la degradación de las antocianinas no aciladas las cuales presentan mayor labilidad.

Sin embargo, durante el proceso de evaporación del solvente acidificado puede ocurrir degradación de las antocianinas aciladas, por la hidrólisis parcial o total de los ácidos enlazados a los azúcares, especialmente en antocianinas aciladas con ácidos di carboxílicos como el ácido malónico.

Por lo anterior se recomienda para la extracción de estos pigmentos el uso de ácidos débiles como el trifluoroacético, tartárico o ácido cítrico (Revilla, E.; Ryan, J.M.; Ortega, M.G.).<sup>[22]</sup>

El presente trabajo fue conducido para desarrollar un método en la extracción de antocianinas a partir de las pieles de la uva negra (hollejo), utilizando como solvente etanol y pequeñas cantidades de un ácido débil como ser el ácido cítrico.

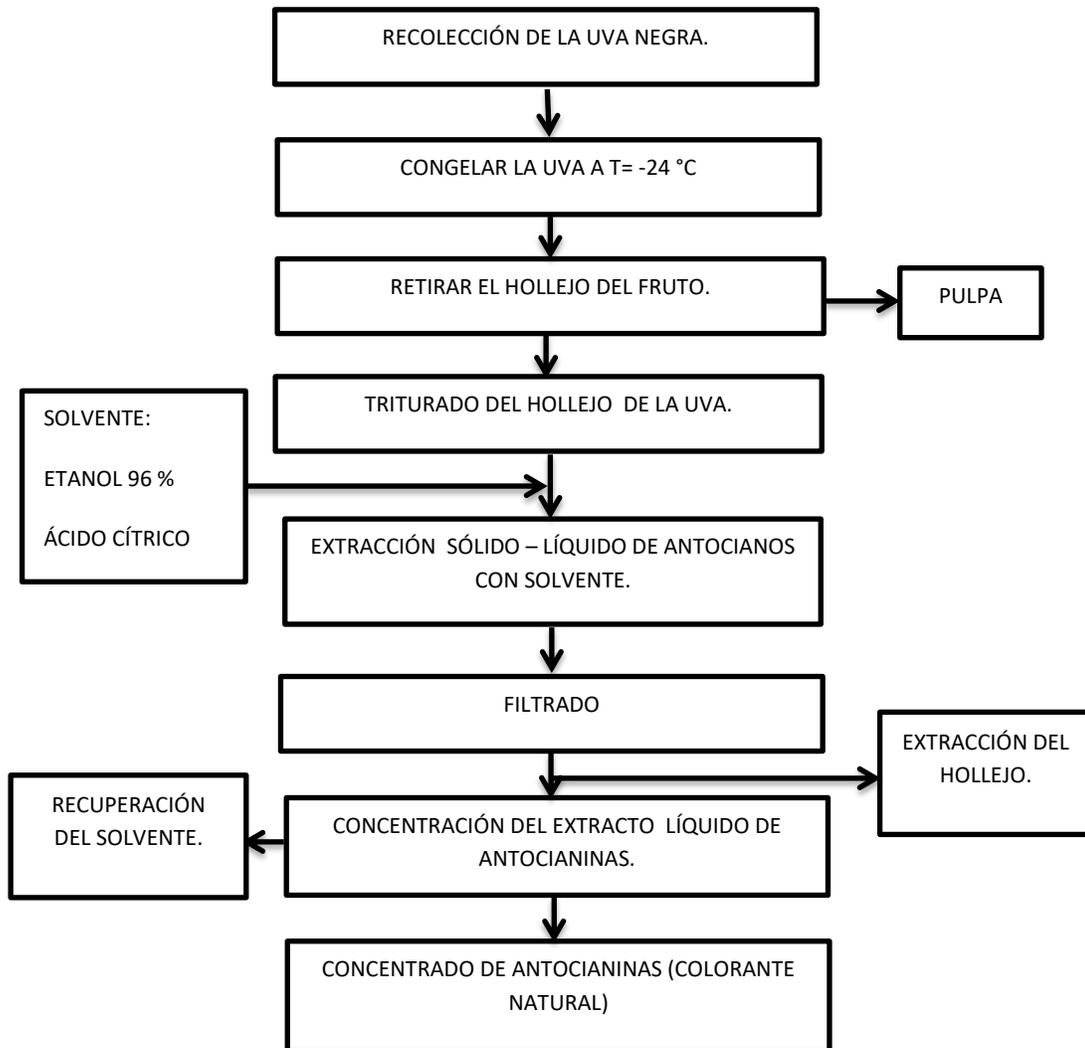
#### **4.2.2. Obtención de los extractos de antocianinas del hollejo de uva negra.**

Para la extracción de antocianinas del hollejo de uva negra se utilizó la metodología “Extracción sólido-líquido de antocianinas”.

La Figura 4-2. Esquematiza la metodología de trabajo. Durante el proceso de obtención de los extractos de antocianinas.

**Figura 4-2**

**Diagrama de flujo del proceso de obtención de los extractos de antocianinas.**



**Fuente:** Elaboración propia.

#### **4.2.3. Descripción del diagrama de flujo del proceso de obtención de colorante natural (Antocianos).**

Para la extracción de antocianinas se partió de uvas congeladas, en este estado se separan la cáscara del fruto cuidadosamente.

Como solvente de extracción se utilizó etanol acidificado con ácido cítrico.

Se pesó 50 gramos de hollejo, estos fueron triturados y macerados en 250 ml de etanol al 96 % con ácido cítrico a temperatura ambiente durante 12 horas. Al transcurrir ese tiempo se decantó el líquido y el sólido (hollejos) se volvió a poner en contacto con 250 ml más de la disolución de etanol y ácido cítrico, dejando macerar durante 12 horas, se volvió a repetir el mismo proceso una vez más.

Todos los extractos alcohólicos que se obtuvieron tras las maceraciones se adicionaron en un mismo recipiente.

Para la concentración de la disolución se utilizó el rota vapor a una temperatura de 50-55°C a 90 rpm durante 90 minutos.

#### **4.2.4 Diseño experimental para la extracción sólido-líquido de antocianinas.**

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

Se estudiaron tres factores: Temperatura, pH y tipo de muestra que son las variedades de uva Cabernet Sauvignon y la uva Tannat, se aplicó el siguiente diseño factorial:

$$2^3=2*2*2 = 8 \text{ Pruebas a realizar}$$

Los factores escogidos y su dominio experimental en el proceso de extracción S-L de antocianinas se muestran en la tabla IV-3.

Tabla IV-3

Niveles de variación de los factores que se tomará en cuenta.

Factores	Dominio Experimental	
	Nivel (-)	Nivel (+)
T= Temperatura	5°C	15°C
m= Tipo de muestra	Cabernet Sauvignon	Tannat
pH	2,5	3

**Fuente:** Elaboración propia.

El dominio experimental de un factor continuo se expresa con los valores mínimo y máximo que puede tomar, y se asigna la notación codificada  $-1$  al nivel inferior y  $+1$  al superior ( $-$  y  $+$  para simplificar).

En la tabla IV- 4, se muestra la matriz de experimentos de un diseño factorial  $2^3$  que se aplicó en la etapa de extracción del colorante natural.

Tabla IV-4

Matriz de experimentos para la extracción del colorante natural.

Corridas	Combinación de tratamientos	Factores			Iteración de los efectos				Respuesta
		T	pH	m	T pH	Tm	pH m	T pH m	$Y_i$
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	$Y_1$
2	a	1	-1	-1	-1	-1	1	1	$Y_2$
3	b	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	$Y_3$
4	ab	1	1	-1	1	-1	-1	-1	$Y_4$
5	c	-1	-1	1	1	-1	-1	1	$Y_5$
6	ac	1	-1	1	-1	1	-1	-1	$Y_6$
7	bc	-1	1	1	-1	-1	1	-1	$Y_7$
8	abc	1	1	1	1	1	1	1	$Y_8$

**Fuente:** Elaboración propia.

Dónde:

$Y_i$  = Antocianinas Totales (mg/l).

En la presente investigación se decidió trabajar entre los pH 2,5 y 3. No se trabajó a valores más bajos de pH dado que el objetivo de extraer antocianinas del hollejo de

la uva es poder obtener un extracto que pueda incorporarse a alguna matriz alimenticia.

Un extracto obtenido con pH muy bajo podría afectar a las características sensoriales del producto en el que fuera añadido. Por otro lado, valores de pH más altos de 4.5 podrían producir una degradación rápida de las antocianinas, por lo que es probable que gran parte de éstas se perdieran en el proceso extractivo (Castañeda-Ovando et al., 2009a).<sup>[15]</sup>

### **4.3. Determinaciones analíticas.**

A continuación se describen las determinaciones analíticas realizadas a las diferentes muestras.

#### **4.3.1. Sólidos solubles.**

La determinación de la cantidad de sólidos solubles se efectuó con un refractómetro, para ello, se colocó unas gotas de la mezcla del extracto y frutos triturados en el lector del aparato. Los resultados se expresaron en °Brix.

#### **4.3.2. pH.**

La medida del pH se realizó con un pH-metro previamente calibrado.

#### **4.3.3. Antocianinas totales.**

Esta técnica se utilizó para cuantificar las antocianinas totales en el extracto sólido-líquido de antocianinas.

Las antocianinas pueden estar en diferentes estructuras reversibles en función del pH, lo que se manifiesta con cambios en sus espectros de absorción. A pH 1.0 las antocianinas existen en la forma altamente coloreada y pH 4.5 están predominantemente en forma incolora. Por lo tanto, la concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH-diferencial (Giusti y Wroslstad, 2001).

Una alícuota de una solución acuosa de antocianinas fue ajustada a pH 1.0 y otra a pH 4.5. La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción es proporcional al contenido de antocianinas (Wrolstad, 1993).<sup>[14]</sup>

Para la cuantificación se preparó, una solución tampón a pH 1.0 de cloruro de potasio ajustado con ácido clorhídrico y solución tampón a pH 4.5 de acetato de sodio ajustado con ácido acético.

A una alícuota (0,01 ml) del extracto sólido-líquido y se agregó 5 ml de solución tampón de cloruro de potasio (pH 1.0) y se midió la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorción de antocianinas) con un espectrofotómetro.

Para realizar la medida, la muestra se diluirá de forma tal que a pH 1.0 tuviera una absorbancia comprendida en el rango de 0.1 a 1.0.

Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm.

Las mediciones se realizaron contra un blanco de agua ultra pura. La misma dilución y procedimiento se realizó pero utilizando solución tampón de acetato de sodio (pH 4.5) con el fin de eliminar la absorbancia debida a la intensidad de color de pigmentos poliméricos amarrados y antocianinas degradadas.

La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina-3-glucósido/100 ml de extracto, calculada de acuerdo a las siguientes expresiones (Wrolstad et al., 2005).

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4.5} \quad \text{Ecuación 4-1}$$

$$\Delta T \left( \frac{\text{mg}}{\text{l}} \right) = \frac{\Delta A * PM * FD * 1000}{\epsilon * l} \quad \text{Ecuación 4-2}$$

Dónde:

AT: Antocianinas totales.

$\Delta A$ : Cambio en la absorbancia (nm).

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

FD: Factor de dilución.

$\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900 ( $M^{-1}cm^{-1}$ ).

l: Longitud de paso de celda, 1cm.

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos.

#### 4.4. Determinaciones analíticas.

Los cálculos que se realizó en el presente trabajo se detallan en el anexo C.

##### 4.4.1. °Brix.

Los grados °Brix se determinaron antes (°Brix<sub>1</sub>) y después (°Brix<sub>2</sub>) del concentrado en el rota vapor.

**Tabla IV-5**

**°Brix de la uva Cabernet Sauvignon y la uva Tannat.**

N°	Temperatura (°C)	pH	Tipo de muestra	Réplica I		Réplica II	
				°Brix <sub>1</sub>	°Brix <sub>2</sub>	°Brix <sub>1</sub>	°Brix <sub>2</sub>
1	5	2.5	Cabernet S.	1,3713	1,4203	1,3743	1,4315
2	15	2,5	Cabernet S.	1,3753	1,4309	1,3758	1,4318
3	5	3	Cabernet S.	1,3846	1,4313	1,3745	1,4329
4	15	3	Cabernet S.	1,3876	1,4323	1,3801	1,4349
5	5	2.5	Tannat	1,3636	1,4589	1,3671	1,4351
6	15	2,5	Tannat	1,3651	1,4599	1,3685	1,4354
7	5	3	Tannat	1,3734	1,4694	1,3703	1,4904
8	15	3	Tannat	1,3735	1,4795	1,3706	1,4923

**Fuente:** Elaboración propia.

##### 4.4.2. Antocianinas totales en la uva Cabernet Sauvignon y la uva Tannat.

Para determinar directamente la cantidad de antocianinas presentes en la uva, se trituraron 50 g de bayas con una mini procesadora de mano. Posteriormente, se pesó 1 g con balanza analítica y se efectuó una extracción con etanol acidificado con ácido clorhídrico a pH 1 en tres etapas, manteniendo una relación en peso de muestra-solvente 1:10. Se realiza el mismo procedimiento explicado anteriormente.

Se mezcló 0,5 ml del sobrenadante mezcla con 10 ml de tampón a pH 1 y 0,5 ml del sobrenadante mezcla con 10 ml de tampón a pH 4,5.

A estas preparaciones se les midió la absorbancia espectrofotométricamente a 510 y 700 nm.

Las lecturas realizadas en el espectrofotómetro se detallan en el anexo C.1.

**Tabla IV-6**

**Antocianinas totales y cambio de absorbancia.**

Variedad de uva	Cambio de absorbancia	Antocianinas totales
	$\Delta A$	AT
Cabernet S.	0,153	2,432
Tannat	0,566	8,998

**Fuente:** Elaboración propia.

$\Delta A$ =Cambio de absorbancia (nm)

AT=Antocianinas totales (mg/l)

**4.4.2.1. Determinación de intensidad de color y tonalidad.**

Para la determinación de la intensidad de color (IC) y tonalidad en la uva Cabernet Sauvignon y en la uva Tannat se diluyó 0,5 ml de extracto en 10 ml de solución tampón a pH 1 y a pH 4,5. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla IV-7.

**Tabla IV-7**  
**Intensidad de Color y Tonalidad.**

<b>Variedad de uva</b>	<b>Intensidad de color</b>	<b>Tonalidad</b>
Cabernet S.	0,426	0,222
Tannat	0,594	0,247

**Fuente:** Elaboración propia.

#### **4.4.3. Antocianinas totales en el hollejo de la uva Cabernet-Sauvignon y la uva Tannat después de la extracción S-L.**

Para determinar directamente la cantidad de antocianinas presentes en el hollejo, después de la extracción S-L, se pesó 1 g de hollejo y se efectuó una extracción, con etanol acidificado con ácido clorhídrico a un pH=1 en tres etapas, manteniendo una relación en peso de muestra-solvente 1:10. En la primera etapa, la mezcla muestra-solvente se agitó con 10 minutos y se abrigó de la luz y el oxígeno.

Luego se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos y se guardó el sobrenadante. Al residuo se le realizó una nueva extracción, se centrifugó y se separó el sobrenadante.

Con el nuevo residuo de esta segunda etapa se procedió de la misma manera. Los tres sobrenadantes fueron mezclados y centrifugados a 4000 rpm durante 30 minutos para separar sólidos en suspensión.

Posteriormente se mezcló 5 ml del sobrenadante mezcla con 10 ml de tampón a pH 1 y 5 ml del sobrenadante mezcla con 10 ml de tampón a pH 4.5. A estas preparaciones se les midió la absorbancia espectrofotométricamente según se describió anteriormente a 510 y 700 nm.

Los valores de las lecturas realizadas y cálculos se detallan en el anexo C.1.

Los valores obtenidos fueron introducidas en la ecuación 4-1 y 4-2 mencionadas anteriormente, dando los siguientes resultados que se muestran en la siguiente tabla IV-8.

Tabla IV-8

## Antocianinas totales y cambio de absorbancia.

N°	Réplica I		Réplica II	
	$\Delta A$	AT	$\Delta A$	AT
1	0,255	2,840	0,241	2,684
2	0,237	2,640	0,239	2,662
3	0,227	2,528	0,255	2,840
4	0,249	2,773	0,250	2,785
5	0,557	6,204	0,608	6,772
6	0,553	6,159	0,644	7,173
7	0,567	6,315	0,572	6,371
8	0,561	6,249	0,575	6,404

Fuente: Elaboración propia.

$\Delta A$ =Cambio de absorbancia (nm)

AT=Antocianinas totales (mg/l)

## 4.4.3.1. Determinación de intensidad de color y tonalidad.

Para la determinación de la intensidad de color (IC) y tonalidad en el hollejo después de la extracción S-L se diluyó 2,5 ml de extracto en 5 ml de solución tampón a pH 1 y a pH 4,5. Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla IV-9

## Intensidad de color y tonalidad después de la extracción S-L.

N°	Réplica I		Réplica II	
	IC	Tonalidad	IC	Tonalidad
1	0,177	0,023	0,176	0,024
2	0,177	0,024	0,171	0,048
3	0,237	0,029	0,203	0,026
4	0,209	0,032	0,213	0,036
5	0,280	0,023	0,289	0,018
6	0,295	0,019	0,235	0,031
7	0,255	0,023	0,311	0,063
8	0,256	0,035	0,228	0,021

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.4.4. Antocianinas totales en el concentrado.

Para la determinación de antocianinas totales en el concentrado se tomó una alícuota de 0,01 ml y 5 ml de solución tampón a pH 1 y solución tampón a pH 4,5, con el espectrofotómetro se realizó dos lecturas, una a 510 nm, de longitud de onda y la otra a 700 nm de longitud de onda.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla IV-10**  
**Antocianinas totales y cambio de absorbancia.**

N°	Temperatura (°C)	pH	Tipo de muestra	Réplica I		Réplica II	
				$\Delta A$	AT	$\Delta A$	AT
1	5	2,5	Cabernet S.	0,200	3,333	0,201	3,350
2	15	2,5	Cabernet S.	0,228	3,800	0,227	3,783
3	5	3	Cabernet S.	0,229	3,816	0,230	3,833
4	15	3	Cabernet S.	0,249	4,150	0,248	4,133
5	5	2,5	Tannat	0,469	7,816	0,476	7,933
6	15	2,5	Tannat	0,506	8,433	0,505	8,416
7	5	3	Tannat	0,650	10,833	0,649	10,816
8	15	3	Tannat	0,668	11,133	0,668	11,149

**Fuente:** Elaboración propia.

$\Delta A$ = Cambio de absorbancia (nm)

AT= Antocianinas totales (mg/l)

#### 4.4.4.1. Determinación de intensidad de color y tonalidad.

Para la determinación de la intensidad de color (IC) y tonalidad en el concentrado se diluyo 0,01 ml de extracto en 20 ml de solución tampón a pH 1 y a pH 4,5. Y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm, 520 nm y 620 nm.

Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla IV-11.

Tabla IV-11

Intensidad de color y tonalidad en el concentrado.

N°	Réplica I		Réplica II	
	IC	Tonalidad	IC	Tonalidad
1	0,309	0,206	0,297	0,203
2	0,376	0,181	0,367	0,184
3	0,511	0,261	0,477	0,254
4	0,538	0,276	0,544	0,281
5	0,293	1,060	0,657	0,304
6	0,345	0,722	0,669	0,295
7	0,806	0,253	0,783	0,252
8	0,698	0,234	0,734	0,242

Fuente: Elaboración propia.

#### 4.5. Resultados obtenidos.

Los datos obtenidos en el desarrollo de la parte experimental se detallan en las siguientes tablas.

##### 4.5.1. °Brix.

Los °Brix que se determinaron en el concentrado se detalla en la siguiente tabla.

Tabla IV-12

°Brix antes y después del concentrado.

N°	Temperatura (°C)	pH	Tipo de muestra	Réplica I		Réplica II	
				°Brix <sub>1</sub>	°Brix <sub>2</sub>	°Brix <sub>1</sub>	°Brix <sub>2</sub>
1	5	2.5	Cabernet S.	1,3713	1,4203	1,3743	1,4315
2	15	2,5	Cabernet S.	1,3753	1,4309	1,3758	1,4318
3	5	3	Cabernet S.	1,3846	1,4313	1,3745	1,4329
4	15	3	Cabernet S.	1,3876	1,4323	1,3801	1,4349
5	5	2.5	Tannat	1,3636	1,4589	1,3671	1,4351
6	15	2,5	Tannat	1,3651	1,4599	1,3685	1,4354
7	5	3	Tannat	1,3734	1,4694	1,3703	1,4904
8	15	3	Tannat	1,3735	1,4795	1,3706	1,4923

Fuente: Elaboración propia.

##### 4.5.2. Hollejo de uva Cabernet Sauvignon y Tannat.

Los análisis que se hicieron en el hollejo son: °Brix, antocianos totales, intensidad de color y tonalidad.

**Tabla IV-13**

**Resultados obtenidos en la uva Cabernet–Sauvignon y la uva Tannat.**

Variedad	° Brix	pH	Antocianinas totales (mg/l)	Intensidad de color	Tonalidad
<b>Cabernet S.</b>	1,3702	1,18	2,432	0,426	0,222
<b>Tannat</b>	1,3706	1,16	8,998	0,594	0,247

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.5.3. Hollejo de uva Cabernet Sauvignon y Tannat después de extracción S-L.

**Tabla IV-14**

**Resultados obtenidos del hollejo después de la extracción S-L**

N°	Réplica I			Réplica II		
	Antocianinas totales (mg/ l)	Intensidad de Color	Tonalidad	Antocianinas totales (mg/ l)	Intensidad de Color	Tonalidad
1	2,840	0,177	0,058	2,684	0,176	0,061
2	2,640	0,177	0,061	2,662	0,171	0,146
3	2,528	0,237	0,054	2,840	0,203	0,057
4	2,773	0,209	0,071	2,785	0,213	0,080
5	6,204	0,280	0,035	6,772	0,289	0,027
6	6,159	0,295	0,028	7,173	0,235	0,060
7	6,315	0,255	0,039	6,371	0,311	0,096
8	6,249	0,256	0,061	6,404	0,228	0,040

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.5.4. Diseño experimental para el proceso de extracción del colorante.

Para determinar el efecto del conjunto de las variables (Temperatura de extracción, tipo de muestra y pH) sobre el proceso de extracción se utilizó el diseño factorial  $2^3$  con dos réplicas de cada prueba en función a la variable respuesta.

Los cálculos realizados para la resolución del diseño factorial se encuentra en el anexo C.2.

Los resultados obtenidos en (mg/l) de antocianinas totales en el colorante natural están expresados en la siguiente tabla.

**Tabla IV-15**

**Antocianinas totales en el colorante natural.**

Combinación de tratamientos.	T (°C)	pH	Tipo de muestra	Variable Respuesta			
				Réplica I		Réplica II	
				$\Delta A$	AT	$\Delta A$	AT
1	5	2,5	Cabernet S.	0,200	3,333	0,201	3,350
a	15	2,5	Cabernet S.	0,228	3,800	0,227	3,783
b	5	3	Cabernet S.	0,229	3,816	0,230	3,833
ab	15	3	Cabernet S.	0,249	4,150	0,248	4,133
c	5	2,5	Tannat	0,469	7,816	0,476	7,933
ac	15	2,5	Tannat	0,506	8,433	0,505	8,416
bc	5	3	Tannat	0,650	10,833	0,649	10,816
abc	15	3	Tannat	0,668	11,133	0,668	11,149

**Fuente:** Elaboración propia.

$\Delta A$ =Cambio de absorbancia (nm)

AT=Antocianinas totales (mg/l)

**4.5.4.1. Análisis de varianza para el diseño factorial  $2^3$  en el proceso de extracción del colorante natural.**

El análisis de varianza realizado con las antocianinas totales extraído de las dos réplicas obtenidas de la tabla IV-15, se muestra en la tabla IV-16.

**Tabla IV-16**

**Análisis de varianza en el proceso de extracción de colorante natural.**

Fuente de variación (FV)	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrados medios (CM)	Fisher Cal	Fisher Tab
--------------------------	------------------------	-------------------------	-----------------------	------------	------------

Total	151,264	16 - 1 = 15			
Temperatura	10,560	2 - 1 = 1	10,560	5,280	11,259
pH	0,667	2 - 1 = 1	0,667	333,5**	11,259
Tipo de muestra	0,033	2 - 1 = 1	0,033	16,5*	11,259
Temperatura-pH	134,160	2 - 1 = 1	134,160	67,080**	11,259
Temperatura-tipo de muestra	5,840	2 - 1 = 1	5,840	2,920	11,259
pH-tipo de muestra	0,002	2 - 1 = 1	0,002	1	11,259
Temperatura-pH-muestra	0,002	2 - 1 = 1	0,002	1	11,259
Error	0,0150	2 <sup>3</sup> -8	0,002		

**Fuente:** Elaboración propia. \* Significativa \*\*Altamente significativa

Como se puede observar en la tabla IV-16, el  $F_{cal} > F_{tab}$  para los factores: Acidez, tipo de muestra y acidez-temperatura lo que nos indica que son variables estadísticamente significativas para una probabilidad del 99% de intervalo de confianza; sin embargo para esta misma probabilidad, las combinaciones entre los factores: Temperatura, Temperatura-tipo de muestra, pH-tipo de muestra y Temperatura-pH-muestra presentan un  $F_{cal} < F_{tab}$ , lo que indica que ninguna de estas, es estadísticamente significativa.

Mediante el análisis estadístico del diseño experimental, se establece que las variables: Acidez, tipo de muestra y acidez-temperatura influyen directamente en el proceso de extracción de colorante natural del hollejo de uva, siendo el pH que tiene mayor efecto sobre el proceso.

Asimismo se demuestra estadísticamente que las combinaciones entre los factores temperatura, Temperatura-tipo de muestra, pH-tipo de muestra y Temperatura-pH-muestra no influyen de manera directa en el proceso, para una probabilidad del 99%.

#### **4.6. Utilización de extracto de antocianinas en la industria alimentaria.**

El estudio de la actividad colorante de los extractos de antocianos a partir del hollejo de uva tinta se considera que es apto como el uso de aditivos colorantes rojo / púrpura.

En el presente trabajo se experimentó como colorante natural sobre el yogurt.

La elección de esta matriz fue considerando varios factores, entre otros que es un alimento ligeramente ácido (pH aproximado de 4), medio en la cual, los antocianos presenta su coloración rojiza y mayor estabilidad.

#### **4.7. Costos.**

Para el presente trabajo de investigación se hizo la evaluación de los costos directos en que se incurrieron durante la fase de elaboración del trabajo. Las siguientes tablas muestran el detalle de los costos indirectos.

##### **4.7.1. Costos de materia prima, solventes y materiales.**

Los costos de materia prima, solventes y materiales que se utilizaron en el presente trabajo de investigación se detallan en la tabla IV-17.

**Tabla IV-17**

**Detalle de costos de materia prima, solventes y materiales.**

<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario (Bs)</b>	<b>Costo Total (Bs)</b>
<b>Materia prima</b>			
Uva Tannat	6kg	5,5	33
Uva Cabernet Sauvignon	6kg	5,5	33
<b>Solventes</b>			
Etanol	11 l	15	165
Agua destilada	5 l	2	10
<b>Materiales</b>			
Papel filtro	3	4	12
Botellas de vidrio ámbar de 250 ml	18	20	360
Botellas de vidrio ámbar de 50ml	2	11	22
Botellas de vidrio ámbar de 30 ml	7	9	63
Bandejas de plástico	10	2,50	25
Botellas de plástico de 30 ml	6	1,50	9
Bolsas de polietileno transparente con cierre hermético 70 x 80 mm	50	7	7
Vaselina sólida	400 g	20	20
Aceite hidráulico	1 l	55	55
<b>Subtotal (a)</b>			<b>814</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.7.2. Costos de reactivos químicos.

Se refieren a los reactivos químicos utilizados en las diferentes etapas del proceso y a los requeridos durante los análisis.

**Tabla IV-18**

**Detalle de costos de reactivos químicos.**

<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Total (Bs)</b>
--------------------	-----------------	-------------------------

Ácido clorhídrico	28ml	28
Ácido acético	90 ml	90
Ácido cítrico	100g	1.8
Ácido tartárico	100g	4.3
Hidróxido de sodio	32 g	32
Acetato de sodio	95 g	92
Cloruro de potasio	2 g	1
Bisulfito de sodio	3 g	1
<b>Subtotal (b)</b>		<b>250.1</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.7.3. Costos de servicios de evaluación fisicoquímica.

Se refiere a los servicios de laboratorio indispensables para la determinación del colorante natural (antocianos).

**Tabla IV-19**

#### **Detalle de Costos de Servicios de Evaluación Fisicoquímico.**

	<b>Parámetros</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Total (Bs)</b>
<b>Hollejo de uva Tannat y Cabernet S.</b>	Acidez	2	40
	Azúcares totales	2	170
	Humedad	2	50
	Sólido solubles	2	20
<b>Colorante natural variedad de uva Tannat y Cabernet S.</b>	Acidez	2	40
	Azúcares totales	2	170
	Sólido solubles	2	20
<b>Subtotal (c)</b>			<b>510</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.7.4. Costos de mano de obra y material de escritorio.

**Tabla IV-20**

#### **Detalle de costos de material de escritorio.**

<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario</b>	<b>Costo Total</b>
--------------------	-----------------	-----------------------	--------------------

		<b>(Bs)</b>	<b>(Bs)</b>
Mano de obra	6 meses trabajados		5360
Bibliografía	2	150	300
Papel	resma (1)	30	30
Tinta	1	100	100
Anillado	6	5	30
Empastado	3	50	150
<b>Subtotal (d)</b>			<b>5970</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

#### 4.7.5. Resumen de costos.

Una vez estimado todos los aspectos referidos a los diferentes costos antes mencionados, se realizó un detalle de los mismos en la siguiente tabla.

**Tabla IV-21**

#### **Resumen de costos.**

<b>Descripción</b>	<b>Costo Total (Bs)</b>
<b>(a)</b> Costos de materia prima, solventes y materiales	814
<b>(b)</b> Costos de reactivos químicos	250.1
<b>(c)</b> Costos de servicios de evaluación fisicoquímica	510
<b>(d)</b> Costos de mano de obra y materiales de escritorio	5970
<b>Total</b>	<b>7544.1</b>

**Fuente:** Elaboración propia.

**CAPÍTULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

## 5.1. Conclusiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se lograron determinar las variables de mayor incidencia en las diferentes etapas del proceso para la obtención del colorante natural (antocianos).

- En los métodos para la extracción de antocianinas no se utilizó como solvente el metanol y ácido clorhídrico, debido a que son productos que se deben hacer trámites en sustancias controladas y no es fácil de adquirirlo.
- Etanol y ácido clorhídrico es el 80 % efectivo, como se menciona en bibliografía, pero no se utilizó como solvente debido a que el ácido clorhídrico es corrosivo.
- Se hizo la prueba utilizando como solvente etanol al 96 % y ácido tartárico y se trabajó con un pH=1, debido a que hay un mayor rendimiento en la extracción. Pero cuando se incorporó en una matriz alimentaria en este caso como ser en el vino, afectó las características sensoriales del mismo, es decir que la acidez fue elevada y sobrepasó el rango de acidez del vino.
- Por tanto se decidió trabajar utilizando como solvente etanol y un ácido débil que es el ácido cítrico a valores de pH=2,5 y pH=3, que es aceptable para poder incorporar a productos alimentarios ya que su acidez no será elevada.
- Las variedades de uva que se utilizaron en la presente investigación fueron Cabernet Sauvignon y Tannat, y de acuerdo a los cálculos realizados con que se obtuvo mayor cantidad de antocianos totales (mg/l) fue en la muestra Tannat, dando un valor de 22,282 y en la muestra Cabernet Sauvignon da un valor de 8,283 a una temperatura de 15°C con un pH=3.
- De 50 g de hollejo se obtiene aproximadamente 16,683 ml de colorante esta cantidad varía según su concentrado (Anexo C.3).

- En la evaluación sensorial del producto obtenido se tiene que:

El colorante natural (Cabernet Sauvignon) presenta un olor y sabor característico a uva y el colorante natural (Tannat) no presenta un olor ni sabor característico a uva sino a solución alcohólica. Esto se debe que cuando se extrajo la cáscara de la uva Cabernet Sauvignon se impregnó pulpa, al contrario de la uva Tannat. La diferencia es que las bayas de uva Cabernet Sauvignon son de piel gruesa y las bayas de la uva Tannat son de piel fina.

El colorante natural (Cabernet Sauvignon) presenta una menor intensidad de color, que el colorante natural (Tannat).

- De acuerdo a los análisis fisicoquímicos realizados al producto final en el laboratorio de CEANID, el colorante natural (Cabernet Sauvignon) tiene una acidez (como ac. Tartárico) 6,45 g/l, azúcares totales 41,18 %, sólidos solubles 60,9 °Brix y el colorante natural (Tannat) tiene una acidez (como ac. Tartárico) 12,95 g/l, azúcares totales 38,95 % y sólidos solubles 69,6 °Brix.
- El colorante obtenido, se aplicó en el yogurt y de acuerdo al panel de degustación que se realizó, la calificación general fue de muy agradable, con respecto al yogurt que contiene colorante del hollejo de la uva Cabernet Sauvignon y como agradable el colorante natural del hollejo de la uva Tannat.
- Se realizó un análisis de costo por mililitro de producto obtenido y su relación con el costo de colorante artificial necesario para un 1 litro de yogurt, concluyendo que :

Para 1 litro de yogurt se necesita 1 mililitro de colorante artificial siendo su costo de 0,12 Bs /ml.

Para 1 litro de yogurt se necesita 3mililitros de colorante natural siendo su costo de 2,74 Bs/ml.

El costo del colorante natural es mayor que el costo del colorante artificial, pero

la calidad del colorante proveniente de una fuente natural, en este caso del hollejo de uva negra imparte un tipo de funcionalidad a la vez de proveer color. Tal es el caso de las antocianinas, compuesto conocido por su actividad antioxidante y por su efecto protector en la prevención de ciertas enfermedades crónico-degenerativas, es por eso que los consumidores buscan etiquetas limpias, es decir ingredientes y aditivos que se consideren naturales.

## **5.2. Recomendaciones.**

- Se recomienda el uso de colorante naturales, debido a que los consumos excesivos de colorante artificiales están siendo investigados ya que a muchas personas les causan alergias y otros problemas en la salud.
- Se recomienda realizar estudios del colorante natural en las aplicaciones de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, confites, helados; productos farmacéuticos y cosméticos.
- Realizar estudios de investigación sobre las propiedades fisicoquímicas del colorante natural del hollejo de uva, para identificar los beneficios que puede otorgar a la piel si esta es utilizada en la elaboración de cosméticos.
- Utilizar este mismo ensayo para evaluar otras variedades de uva que pueden ser interesantes para este objetivo.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] **CLAUDIA M. SIMONS R.** *Extracción de aceite crudo de pepa de uva con solvente*. Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Autónoma Juan Misael Saracho. Septiembre de 2010.

[2] **FAUTAPO, (2007)**, *Catastro Vitícola del Valle Central de Tarija fase I, II y III*.

[3] **ZÚÑIGA MORALES .M.C. (2005)**. *Caracterización de fibra dietaría en orujo y capacidad antioxidante en vino, hollejo y semilla de uva*. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas Escuela de Agronomía. Santiago, Chile 2005.

[4] **BROUILLARD, R. (1982)**. *Estructura química de Antocianos*. Los “Como colores alimentarios” (P. Markakis, Ed), Academic Press, New York, pp.1-40.

[5] **INSTITUTO FORESTAL-FUNDACIÓN CHILE. FONDEF D00I 1041:** *Alternativas de Procesamiento del Maqui en Chile, y Pre factibilidad del Negocio Referido al Desarrollo de una Planta Productora de Colorante Natural de Maqui para Alimentación*. [En línea]. Chile, Noviembre 2004. Recuperado en: <[http://www.repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/zuniga\\_m/sources/zuniga\\_m.pdf](http://www.repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/zuniga_m/sources/zuniga_m.pdf)> Consultado el: 29 de abril del 2015.

[6] **MUÑOZ O., 2003**. Antocianos colorantes naturales y aplicación industrial. Libro de Resúmenes: V Congreso Internacional de Plantas Medicinales, 8 – 11 de octubre de 2003, Santiago, Chile. Corporación Lawen.

[7] **MAZZA, G.; MINIATI, E. 1993**. Uvas: los antocianos e frutas vegetales y granos, CRC Press Inc., Boca Raton, pp. 149-199.

[8] **CANO DÍAZ E. (2008).** *Evaluación de la capacidad tintórea de los tintes naturales obtenidos de los desechos agroindustriales del coco y del aguacate en el proceso de tinción de fibras naturales utilizadas en la elaboración de artesanías.* Proyecto de investigación. Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ingeniería. Guatemala.

[9] **IRIS CARMONA. (2013).** *De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimenticia*, N°5. pp 1-6. Abril 2013, Agrimundo inteligencia competitiva para el sector alimentario.

[10] **ISTSTEZIUTLAN. (2012).** *Colores Alimentarios en la salud.* [Artículo en línea]. Pp 4. Fecha de consulta: 17 de abril del 2016. Disponible en: <<http://www.iststeziutlan.edu.mx.htm>>.

[11] **EDUARDO DELLACASSA.** *Composición de uvas y vinos Componentes químicos del vino tinto Tannat.* [Artículo en línea]. Fecha de consulta: 15 de abril del 2016. Disponible en: <<http://www.biofisica.fmed.edu.uy/quimica%20de%20la%20uva%20y%20el%20...>>

[12] **GIL OBREGÓN RAÚL (2016).** *Cepajes: Tannat*, en: El conocedor [Artículo en línea]. Fecha de consulta: 11 de mayo del 2017. Disponible en: <http://www.revistaelconocedor.com/cepajes-tannat/>>.

[13] **MACHADO JORGE. (2007).** *Tannat: Una cepa poco común.* [Artículo en línea]. Fecha de consulta: 17 de abril del 2016. Disponible en: <<http://www.sudamerimex.com>>art\_02>

[14] **ENCURED. (2016).** *Uva Cabernet Sauvignon*. [Artículo en línea]. Fecha de consulta: 17 de abril del 2016. Disponible en: <<http://www.ecured.cu>>Uva\_Cabernet\_Sauvig.>.

[15] **MARINA ZAPATA L. (2014).** *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria*. Proyecto de investigación. Universidad Politécnica de Valencia Departamento de Tecnología de Alimentos. Valenciana España.

[16] **HERAZO C. CRISTINA I. (2013).** *Obtención y estabilización de antocianinas de berenjena mediante micro encapsulación y su evaluación como compuestos funcional en la industria alimentaria*. Proyecto de investigación. Título Académico de Máster en Ciencia Agroalimentaria con énfasis en Ciencias de los Alimentos. Universidad de Córdoba “Facultad de ingenierías programa de maestría en ciencias agroalimentarias”. Berástegui (Córdoba).

[17] **JUAN CARLOS R. (Jueves 8 de octubre de 2009).** *Boletín oficial del estado*. [Artículo en línea]. pp 84829.Fecha de consulta: 18 de abril del 2016. Disponible en: <<https://www.boe.es>>2009/10>b>.

[18] **FIGUEROA R.; TAMAYO J. (Junio 2011).** *Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (Hylocereus undatus)*.Revista Iberoamericana de Tecnología Pos cosecha, vol. 12, núm. 1,pp. 44-50. Asociación Iberoamericana de Tecnología Pos cosecha, S.C. Fecha de consulta: 17 de abril del 2016.Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808007>>.

[19] **ELEJALDE C. EDURNE (1999).** *Extracción y caracterización de antocianos y procianidinas de distintas variedades de uva empleadas en la elaboración del*

*txakoli tinto de Bizkaia*. Universidad del País Vasco. Facultad de Ciencias Dpto. de Química Orgánica.

[20] **DIANA E. LEYVA D. (2009)** *Determinación de antocianinas fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora* (Ingeniero en alimentos). Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.

[21] **AULERA ORTIZ M.; ALANIS GUZMAN M.; RAZA VARGAS M. (2005)**. *Comparación de dos Métodos de Extracción de Antocianinas en Ficus carica Variedad Misión*. Fecha de consulta 24 de junio del 2015, **de:**

<http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/.../CNA49.pdf>.

[22] **SANTACRUZ CIFUENTES.L.A. (2011)**. *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Departamento de Química. Bogotá D.C., Mayo 20 del 2011.

[23] **RAMIREZ, RUIZ ERICK**. *Metodología de la investigación*. Tarija- Bolivia 2009.

[24] **CENSO NACIONAL DE ESTADÍSTICA INE-BOLIVIA**. *Censo Agropecuario 2013*.

[25] **GALLARDO ORTEGA ROXANA**. *Caracterización Ampelográfica de las Variedades de Vid en el Valle Central de Tarija*. Licenciatura en Ingeniería Agronómica. Universidad Autónoma Juan Misael Saracho. Abril de 2012.