

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE HIGO *Ficus carica* variedad Misión, CULTIVADO EN CIUDAD LERDO DURANGO, MÉXICO

Por

Miguel Aguilera Ortíz

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación en Alimentos

Agosto, 2009

CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE HIGO *Ficus carica*
variedad Misión, CULTIVADO EN CIUDAD LERDO DURANGO, MÉXICO

Aprobación de la Tesis:

Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Directora

Dr. Juan Gabriel Báez González
Secretario

Dra. Ma. Adriana Núñez González
1º. Vocal

Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
2º. Vocal

Dra. Ma. Guadalupe Candelas Cadillo
Asesora Externa
3er Vocal

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por brindarme el espacio y el soporte académico para realizar una etapa más de mi desarrollo profesional.

Especialmente a la Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán, por su atinada dirección durante este trabajo y por su evidente calidad humana como persona. Igualmente a la Dra. Adriana Núñez, al Maestro Carlos García, a la Srita. Mayra y a la Srita. Carmelita por todas sus atenciones.

Mi agradecimiento al CONACYT por apoyarme con recursos económicos para terminar esta meta profesional en mi vida. Igualmente a las autoridades del CBTa No. 1 de La Partida, Coah., por facilitarme el secador por aspersión utilizado durante la experimentación. También a la Dra. Carmen Hernández Brenes y al Ing. Armando del Follo Martínez por las facilidades para realizar el análisis de perfil de antocianinas por HPLC, en el ITESM Campus Monterrey.

A la comunidad de la institución a la que pertenezco, la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED, principalmente a la Maestra María de Jesús Cedillo por las facilidades otorgadas para poder estudiar el doctorado, además les expreso mi gratitud por su apoyo académico, técnico, moral y económico, pues muchas personas, de todos los niveles jerárquicos y en diferentes situaciones inherentes a este trabajo, colaboraron conmigo generosamente.

Por el apoyo incondicional durante el desarrollo de este estudio, les agradezco enormemente a Guadalupe Candelas, Patricia Ramírez, a mis compañeros académicos y a todas las personas que pusieron su granito de arena, a todos ¡muchas gracias!

Agradezco eternamente el apoyo incondicional de mi familia, mi esposa Carmen y a mis hijos Miguel, Ignacio y Betzabé de Guadalupe, porque siempre fueron mi motivo para estudiar el doctorado; a mi Madre Genoveva y a mi Padre Margarito (†), a mis hermanos: José, Jesús, María, Margarito, Rosalio, Felipe, Gustavo, Sanjuana y Francisco. A mis suegros Martina (†) e Ignacio. A todos mis amigos, los que están y los que estuvieron.

DEDICATORIA

A mi esposa Carmen, por apoyarme en todo momento
Sin esperar nada a cambio, gracias por existir.

A mis hijos Miguel, Ignacio y Betzabé de Guadalupe por
Los momentos que no estuve con ustedes, son la inspiración
que me alienta cada día.

A Dios por darme mucho.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	3
1.2 Hipótesis	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades del higo	5
2.1.1 Descripción botánica	5
2.1.2 Composición química	6
2.1.3 Usos alimenticios	7
2.2 Pigmentos naturales	8
2.2.1 Compuestos fenólicos	10
2.2.2 Flavonoides	11
2.2.3 Antocianinas	13
2.3 Análisis de antocianinas	34
2.3.1 Preparación de la muestra	36
2.3.2 Métodos de análisis-detección-separación	38
2.3.3 Desarrollos de nuevos métodos analíticos	53
2.3.4 Aplicación en análisis de alimentos	54
2.4 Preparación comercial	58
2.4.1 Secado por aspersion	59
2.4.2 Liofilización	61
2.4.3 Adición de antocianinas en alimentos	64
3. MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1 Lugar, área y período de estudio	67
3.2 Identificación de la muestra	67
3.3 Conceptualización y operacionalización de variables	67
3.4 Descripción del proceso y técnicas de análisis	71
3.5 Diseño experimental y análisis de datos	81
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	84
4.1 Resultados de la primera etapa	84
4.2 Resultados de la segunda etapa	91
4.3 Resultados de la etapa final	110
CONCLUSIONES	122
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126

APÉNDICES	133
A. Instrucciones para la operación del secador Büchi B-191	133
B. Cromatogramas de los estándares	135
C. Cromatogramas de los extractos de la cáscara de higo	136

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Composición química del higo	7
2.	Operacionalización de variables	70
3.	Tratamientos y sus claves empleados en la evaluación del nivel de agrado del yogur adicionado	80
4.	Diseño experimental de la estabilidad térmica y orden de proceso de las unidades experimentales	82
5.	Diseño experimental de la estabilidad bajo frío del yogur adicionado con polvo obtenido de cáscara de higo	82
6.	Valores promedio de absorbancia de EMA de antocianinas en la región visible a diferentes tamaños de muestras	84
7.	Valores promedio de absorbancia de EA de antocianinas en la región visible a diferentes tamaños de muestras	85
8.	Valores promedio de absorbancia de EMA en MLNR y MLR en la región visible a diferentes tamaños de muestra	86
9.	Valores de pH y color del EM de cáscara de higo titulado con HCl 0.1 N	87
10.	Valores de pH y color del EM de cáscara de higo titulado con NaOH 0.1 N	88
11.	El CPAM en cáscara de higo congelada y liofilizada	88
12.	Concentración de cianidina en g/g de muestra de cáscara de higo congelada y liofilizada	90
13.	Color inicial de los EMA de antocianinas al tiempo 0 de de almacenamiento	92
14.	Cambio de color total de los EMA de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento	92
15.	Cambio de color total de los EMA de antocianinas en Oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento	94
16.	Estabilidad de los EMA con iluminación (2 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	95
17.	Estabilidad de los EMA con iluminación (14 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	95

18. Estabilidad de los EMA en oscuridad (2 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	96
19. Estabilidad de los EMA en oscuridad (14 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	97
20. Prueba de t student de los tratamientos de EMA iluminados y oscuros	98
21. Color inicial de los EM de antocianinas al tiempo 0 de almacenamiento	99
22. Cambio de color total de los EM de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento	100
23. Cambio de color total de los EM de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento	101
24. Estabilidad de los EM con iluminación (2 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	101
25. Estabilidad de los EM con iluminación (14 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	102
26. Estabilidad de los EM en oscuridad (2 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	103
27. Estabilidad de los EM en oscuridad (14 días). Prueba de rangos múltiples de Duncan	104
28. Prueba de t student de los tratamientos de EM iluminados y oscuros	105
29. Cambio de color total de los EMA de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento	105
30. Cambio de color total de los EMA de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento	106
31. Cambio de color total de los EM de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento	107
32. Cambio de color total de los EM de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento	108
33. CPAM de los EMA de antocianinas a diferentes tiempos de almacenamiento	108
34. CPAM de los EM de antocianinas a diferentes tiempos de almacenamiento	109

35. Condiciones de operación para el secado por aspersión de pigmento de higo	110
36. Condiciones de operación para el secado por liofilización de pigmentos de higo	111
37. Color de los yogures sin y adicionados con pigmento de higo obtenido por aspersión y liofilizado, al inicio y al final de la evaluación	113
38. Estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando luminosidad	114
39. Estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando hue (tono o matiz)	114
40. Estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando chroma (pureza del color)	116
41. Prueba de t student para la estabilidad del pigmento obtenido por aspersión y liofilizado, valorando hue	117
42. Prueba de t student para la estabilidad del pigmento obtenido por aspersión y liofilizado, valorando hue	118
43. Prueba de ordenamiento por color en yogur adicionado con pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por aspersión	120
44. Prueba de preferencia por color en yogur adicionado con pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por aspersión	121

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura base de los flavonoides	13
2. Formula de antocianidinas (cationes flavillium)	17
3. Cambios estructurales en antocianinas con el pH. Malvidina 3-glucósido a 25°C	18
4. Espectro de absorción en la región visible de (—) pelargonidina, (— • —) cianidina y (- - -) delphinidna HCl-metanol 0.01%	19
5. Mecanismo de oxidación acoplada involucrado en la oxidación de antocianinas por la polifenoloxidasas	22
6. Separación de antocianinas de uva (<i>V. rotundifolia</i>): (a) TLC dos-dimensional, 1. solvente: PAW, 2. solvente: BfFW. (b) TLC secuencial, BuHCl seguida por BAW	49
7. Separación por RP-HPLC de jugo de grosella negra	53
8. Separación de antocianinas de vino rojo cv. "zweigelt" por RP-HPLC	57
9. Diagrama de flujo de la caracterización de los pigmentos de la cáscara de higo	72
10. Diagrama de flujo de la estabilidad térmica de los pigmentos de la cáscara de higo	73
11. Diagrama de flujo de la estabilidad tecnológica de los pigmentos de la cáscara de higo y su adición como colorante a un yogur natural	76
12. Hoja de respuestas para la evaluación del nivel de agrado del yogur adicionado con polvo de cáscara de higo	81
13. Cromatograma de los EMA de cáscara de higo	90
14. Polvo de pigmento antociánico de cáscara de higo, obtenido por aspersion.	111
15. Estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por dos métodos diferentes, valorando hue	115
16. Estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento en polvo	

de cáscara de higo obtenido por dos métodos diferentes, valorando chroma	117
17. Yogur sin y adicionado con pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por aspersión	119

RESUMEN

Miguel Aguilera Ortiz

Fecha de Graduación: Diciembre, 2009

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE HIGO *Ficus carica* VARIEDAD Misión CULTIVADO EN CIUDAD LERDO DURANGO, MÉXICO

Número de páginas: 138

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con
Acentuación en Alimentos

Área de estudio: Ciencia de alimentos

Propósito y Método del Estudio: El objetivo de este trabajo es identificar y cuantificar las antocianinas del higo variedad misión y valorar su comportamiento a diferentes condiciones de proceso. Se caracterizaron los extractos metanólicos acidificados de la cáscara de higo por espectrofotometría, pH y HPLC. En la segunda etapa se valoró la estabilidad térmica de los extractos metanólicos a diferentes valores de pH y condiciones de iluminación, con tres repeticiones. Extractos acuosos de cáscara de higo se deshidrataron por aspersion y liofilización y se adicionaron en concentraciones de 0.8, 1.0 y 1.2 g/50 g de yogur natural comercial, valorando su estabilidad durante 25 días de almacenamiento. Al yogur adicionado se le determinó luminosidad, hue (tono o matiz), chroma (pureza del color) y pH. Además, se evaluó el nivel de agrado del yogur adicionado con una prueba de ordenamiento y preferencia por color.

Contribuciones y Conclusiones: Por medio del análisis por HPLC de extractos metanólicos acidificados de antocianinas de cáscara de higo se separó e identificó la cianidina como única antocianina presente en el higo. Las mejores condiciones para almacenamiento de los extractos metanólicos acidificados de antocianinas son pH 3.0, temperatura de 4°C y en oscuridad. Los yogures adicionados con polvo de pigmento de cáscara de higo obtenido por aspersion, presentan el color y la pureza más cercanos a los del yogur comercial sabor fresa marca "C". Es posible el uso de los pigmentos de cáscara de higo para colorear alimentos de acidez intermedia como el yogur.

FIRMA DE LA ASESORA _____

Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán

ABSTRACT

Miguel Aguilera Ortiz

Graduation date: December, 2009

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Title: CHARACTERIZATION AND STABILITY OF ANTHOCYANINS
FROM *Ficus carica* VARIETY Mission CULTIVATED IN
CIUDAD LERDO DURANGO, MÉXICO

Number of page: 138

Doctorate in Science Candidate
accentuation in Food Science

Field of Study: Food Science

Purpose and Method of Study: The aim of this work was to identify and quantify the anthocyanins from fig variety mission and study their behavior at different conditions of process. The acidified methanolic extracts obtained from fig-skin were characterized by spectrophotometry, pH and HPLC. In the second stage, the thermal stability of methanolic extracts was evaluated at different values of pH and conditions of illumination, with three replicates. Aqueous extracts of fig-skin pigments were spray-dried and freeze-drying, and in concentrations of 0.8, 1.0 and 1.2 g/50 g of natural commercial yoghurt were added, the stability during 25 days of storage was evaluated. The brightness, hue chroma and pH were determined to the added yoghurt. Also, the taste level was evaluated to additionated yoghurt with an ordering test and preference test by color.

Contributions and Conclusions: The acidified methanolic extracts of anthocyanins from fig-skin were analyzed by HPLC, the cyanidin was separated and identified like the only anthocyanin present in the fig. The best conditions for storing of acidified methanolic extracts of anthocyanins were pH 3.0, 4°C of temperature in dark. The added yoghurts with powder of pigments from fig-skin obtained by spray-dried had the color and purity closer to commercial strawberry flavor yoghurt type "C". The use of pigments from fig-skin to colored foods of intermediate acidity like yoghurt is possible.

ADVISOR SIGNATURE: _____
Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Normalmente, el color en alimentos es debido a los pigmentos naturalmente presentes, pero colorantes sintéticos o artificiales son a menudo añadidos para conferir el color deseado al producto final. Debido a que hay un incremento la demanda de alimentos naturales, la producción industrialmente práctica y económica de colorantes naturales alimenticios es una meta deseable para la industria de ingredientes alimenticios. Sin embargo, la disponibilidad de fuentes de pigmentos naturales, requerimientos de procesos de extracción y estabilidad de colorantes e idoneidad de uso debe ser tomado en cuenta en la producción de tales ingredientes. Los flavonoides están recibiendo un interés creciente de parte de consumidores y procesadores de alimentos por varias razones que a continuación se describen (Kühnau, 1976).

Estudios epidemiológicos han sugerido asociaciones entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles o bebidas y prevención de enfermedades (Steinmetz y Potter, 1996; Yang, et al, 2001). Las antocianinas, una de las principales clases de flavonoides, parecen contribuir significativamente a sus propiedades poderosas antioxidativas (Vinson, 1998; Lepidot et al, 1999).

Hay una fuente importante de colorantes naturales presentes en frutas rojas tales como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas, pasas rojas y negras (Jackson et al, 1978; Frankel et al, 1995; Lepidot et al, 1999). Las restricciones en el uso de colorantes sintéticos en alimentos han conducido al interés en el uso potencial de antocianinas como un colorante alimenticio en

bebidas, jarabes, jugos de frutas, gelatinas, mermeladas, helados, dulces de pasta y yogures, así como en pasta dental, productos farmacéuticos, cosméticos y otros similares (Clydesdale y Francis, 1976; Durante, 1995).

El higo puede ser una fuente importante de antocianinas para la industria de ingredientes alimenticios. El fruto es un sícono blando obovoide o elipsoide, carnoso, recubierto con una piel muy fina, con pequeños y numerosos aquenios incluidos en el fruto, es de color azulado o verde, negro o morado, mide de 3 a 10 cm de largo y tiene sabor dulce mucilaginoso.

En la Región de la Comarca Lagunera de Durango, específicamente en el Municipio de Lerdo, se encuentra un área de cultivo de higo de 10 a 25 hectáreas con un aproximado de 4000 árboles, los cuáles dan una producción anual de 40 toneladas de higo por temporada. Con base en lo anterior se pretende que los resultados de este trabajo de investigación, pudieran aportar información tendiente a la utilización de estos pigmentos como colorantes alimenticios y así lograr un mayor valor económico en la industrialización del higo.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar y cuantificar las antocianinas presentes en el higo variedad misión y valorar su estabilidad, así como probar sus usos como colorantes alimenticios.

Objetivos específicos

Caracterizar los pigmentos de la cáscara de higo (*Ficus carica* L.) variedad misión cultivado en la región de Ciudad Lerdo Durango, México.

Evaluar la estabilidad de las antocianinas de la cáscara de higo en diferentes condiciones de temperatura, pH, iluminación y oscuridad, en términos de color y de iluminación de su concentración.

Obtener información tecnológica base para utilizar los pigmentos como colorantes alimenticios.

1.2 HIPÓTESIS

La concentración de antocianinas en la cáscara de higo es al menos de 150 mg/100 g.

Las antocianinas extraídas de la cáscara de higo son estables hasta 25°C, pH de 6 y a la luz.

El nivel de agrado del yogur de fresa coloreado con los pigmentos extraídos de la cáscara de higo será igual al menos al de un yogur comercial.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DEL HIGO

Los higos (*Ficus carica*) pertenecen quizás la más vieja de todas las especies de frutas cultivadas y cosechadas en numerosas áreas del mundo con climas subtropicales. La variedad misión del higo es una de los tres principales tipos de higos deshidratados utilizados en los Estados Unidos (Ensminger et al, 1994). El fruto del higo ha sido un componente típico en la dieta mediterránea promotora de la salud por milenios (Solomon et al, 2006). Los primeros higos fueron plantados en México en 1560. Los higos fueron introducidos en California cuando la misión de San Diego fue establecida en 1769 (Morton, 1987). El fruto del higo es un receptáculo hueco con cientos de pequeñas flores carnosas frente a frente unas de otras en el interior. La mayoría de los cultivos de árboles de higo producen dos cosechas, una en primavera llamada breva en la última etapa de crecimiento de la temporada y una en verano u otoño, llamada cosecha principal. Los higos deben dejarse madurar totalmente antes de que sean cortados, y los higos frescos no se pueden mantener por mucho tiempo. Los higos deshidratados se mantienen por varios meses (Floridata, 2003).

2.1.1 Descripción Botánica

El fruto es un sícono blando obovoide o elipsoide, carnoso, recubierto con una piel muy fina, con pequeños y numerosos aquenios incluidos en el fruto, es de color azulado o verde, negro o morado, mide de 3 a 10 cm de largo y tiene sabor dulce mucilaginoso. El sícono o fruto falso es en realidad el

receptáculo que en su evolución se hincha y se vuelve carnoso tras la fecundación, formando la breva o el higo según sea la fecha de madurez (Conabio, 2003). Cambios significativos en la pigmentación ocurren durante la maduración de los higos misión. En sólo unos cuantos días, el color de las capas celulares contenidas en la piel de la fruta cambia de un verde profundo a un negro azulado (Puech et al, 1975). La primera fructificación comercial ocurre a los 3-4 años y la edad de máximo rendimiento es a los 10 años. El volumen de cosecha promedio por árbol es de 55 kg, la población normal por hectárea es de 115 árboles y el volumen de cosecha es de 6.3 ton/ha. Un árbol con una copa de 2 m de diámetro puede dar 60-80 kg de higos frescos o 20-27 kg de higos secos (Conabio, 2003).

2.1.2 Composición Química

Los higos son una fuente superior de minerales y vitaminas; libres de sodio, grasa y colesterol; contienen al menos 17 tipos de aminoácidos; los higos deshidratados contienen cantidades relativamente altas de fibra cruda y una de las concentraciones más altas de polifenoles entre las frutas y bebidas consumidas comúnmente (Vinson et al, 2005; Lianju et al, 2003 y Vinson, 1999). Son muy nutritivos, contienen una gran cantidad de azúcares fácilmente asimilables (10 al 15%). Deben comerse bien maduros, lavándolos bien. Las pasas de higo tienen un contenido mayor de azúcares (40 a 60%). Por este motivo aumentan su valor nutritivo (Nutriverde, 2003). En la Tabla 1 se presenta su composición química por cada 100 gramos del producto fresco, donde se observa que está constituido en gran parte por agua y su aporte nutricional son los minerales y azúcares asimilables que contiene.

Tabla 1. Composición Química del Higo, Valor Alimenticio en g por 100g de Porción Comestible.

	Fresco	Seco
Calorías	80	274
Humedad	77.5-86.8	23.0
Proteína	1.2-1.3	4.3
Grasa	0.14-0.30	1.3
Carbohidratos	17.1 -20.3	69.1
Fibra	1.2-2.2	5.6
Cenizas	0.48-0.85	2.3
Calcio (mg)	35-78.2	126
Fósforo (mg)	22-32.9	77
Hierro (mg)	0.6-4.09	3.0
Sodio (mg)	2.0	34
Potasio (mg)	194	640
Vitamina A (UI)	20-270	80
Tiamina (mg)	0.034-0.06	0.10
Riboflavina (mg)	0.053-0.079	0.10
Niacina (mg)	0.32-0.412	0.7
Ácido ascórbico (mg)	12.2-17.6	0
Ácido cítrico (mg)	0.10-0.44	-----

Fuente: Morton, 1987.

2.1.3 Usos Alimenticios

El fruto es el de mayor contenido de azúcar en el mundo (hasta 64% de su peso en seco). Se come crudo, encurtido o en mermelada. Se puede consumir seco. La semilla posee aceite comestible (Conabio, 2003). Alguna gente retira la cáscara hacia atrás del pedúnculo exponiendo la pulpa para comerla con la mano. El consumidor más exigente, sostiene la fruta por el pedúnculo, corta la fruta en cuartos hasta el vértice, separa las secciones y

levanta la pulpa de la cáscara con un cuchillo, desechando el pedúnculo y la cáscara (Morton, 1987).

Comercialmente, los higos son pelados por inmersión durante un minuto en agua en ebullición con sosa caústica o agua en ebullición con bicarbonato de sodio. En climas húmedos y calientes, los higos son generalmente comidos frescos y crudos sin pelar, y son a menudo servidos con crema y azúcar. Pelados o no pelados los higos pueden ser preparados y adicionados de varias formas, como en pays, budines, pasteles, pan u otros productos de panadería, o añadidos a helados de crema batida. Algunos consumidores preservan los frutos enteros en jarabe de azúcar o preparados estos como mermelada o pasta. En Europa, oeste de Asia, norte de África y California, el enlatado comercial y deshidratado de higos son procesos industriales de gran importancia. Los higos Misión y Kadota son óptimos para el congelamiento entero en jarabe o rebanados y adicionados con azúcar. Los higos secos seleccionados han sido tostados y son utilizados como sustituto para café. En los países del Mediterráneo, los higos de baja calidad son convertidos a alcohol. Un extracto alcohólico de higos deshidratados ha sido usado como un saborizante para licores y tabaco (Morton, 1987).

2.2 PIGMENTOS NATURALES

Por definición, un pigmento natural en sistemas biológicos es aquel que es sintetizado y acumulado en o excretado de células vivientes. En adición, ciertos pigmentos, particularmente los derivados fenólicos más simples tales como los anticoagulantes cumarinos, pueden ser formados por la muerte de

células. Lo que no es un pigmento natural en biología es menos fácil de definir. Para propósitos de ésta revisión, los pigmentos inorgánicos basados en, por ejemplo, hierro o titanio no son considerados naturales debido a que ellos no parecen jugar un papel significativo o menor en biología. Ni son los diferentes complejos órgano-ferrosos formados sintéticamente de complejos orgánicos presentes naturalmente. Por esta razón, una definición más amplia de un colorante natural es dada como un “pigmento formado en células vivientes o muertas de plantas, animales, hongos o microorganismos, incluyendo compuestos orgánicos aislados de células y estructuras modificadas para alterar la estabilidad, solubilidad o intensidad del color” (Hendry, 1992).

La palabra color se utiliza para indicar la percepción por el ojo humano de los productos coloreados, tales como rojo, verde o azul. El término colorante es una designación general que se refiere a cualquier compuesto químico que imparte color. La palabra pigmento se refiere a los constituyentes normales de las células o tejidos que imparten color. Los pigmentos pueden tener propiedades que van más allá de las de los colorantes, por ejemplo, como receptores de energía, transportadores de oxígeno o protectores contra las radiaciones. Es obvio que el color de un alimento se debe a los pigmentos naturales existentes en el mismo excepto en el caso de que se le hayan añadido colorantes. Por tanto, para conseguir la aceptabilidad y el color deseado, es esencial conocer los pigmentos en cuestión (Francis, 1993).

Un incremento en la tendencia de la Industria Alimentaria es hacia el reemplazo de colorantes sintéticos por pigmentos naturales (Schnetzler y Breene, 1994). Hay un interés en el mundo entero en el desarrollo de colorantes alimenticios de fuentes naturales (Francis, 1987; Lauro, 1991). El uso de colorantes “naturales” se ha incrementado como una consecuencia de las preferencias del consumidor percibidas también como a la acción legislativa en la cual ha continuado la eliminación de colorantes artificiales aprobados (García y Cruz-Remes, 1993).

2.2.1 Compuestos Fenólicos

El término compuestos fenólicos abarca un amplio rango de compuestos que poseen un anillo aromático teniendo un sustituyente hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Los compuestos fenólicos están presentes en muchas plantas. Ellos están directamente relacionados con las características de los alimentos tales como sabor, palatabilidad, valor nutricional, efectos farmacológicos y toxicológicos, y descomposición microbiana. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales aproximadamente 8000 son conocidos por estar presentes en las plantas, los flavonoides y sus parientes forman el grupo más grande con más de 5000 estructuras conocidas (Harborne, 1986).

Solamente una pequeña familia de polifenoles son considerados a ser importantes en los alimentos. Ellos son los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico y sus derivados, y los flavonoides comunes y sus glucósidos. Las antocianinas y los flavonoles son pigmentos importantes en

una variedad de frutas y vegetales. Muchos compuestos fenólicos participan en reacciones de oscurecimiento enzimático y no enzimático. En adición al color, los polifenoles también contribuyen al sabor de los alimentos y otras cualidades (Pierpoint, 1983). Otra importante función de los compuestos polifenólicos en términos de los beneficios a la salud humana es el aumento de evidencia que sugiere que los compuestos polifenólicos en la dieta tienen a largo plazo beneficios en la salud y pueden prevenir o reducir el riesgo de algunas enfermedades crónicas (Francis, 2000).

Los compuestos fenólicos son considerados como un grupo de compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante de las frutas y vegetales. Los compuestos polifenólicos típicos que poseen actividad antioxidante incluyen a los tocoferoles, a los flavonoides, a los derivados del ácido cinámico y otros compuestos. El potencial antioxidante de los polifenoles generalmente es comparado en referencia a una sustancia, generalmente el trolox (un derivado de la vitamina E soluble en agua), ácido gálico o catequina. En todos los casos, la reacción estudiada es la reducción de un oxidante por los polifenoles (Scalver et al, 2005).

2.2.2 Flavonoides

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más distintivos de metabolitos secundarios en plantas superiores. El término flavonoide comprende todos aquellos compuestos cuya estructura está basada en aquella de la flavona (2-fenilcromona), como se puede observar en la Figura 1. Flavonoide (del latín

flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa. La estructura base, un esqueleto C6-C3-C6, puede sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales, por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Winkel-Shirley, 2001). Se puede observar que la flavona consiste de dos anillos bencénicos (A y B) unidos a la vez por un enlace de tres carbonos que es formado dentro de un anillo γ -pirona. Los compuestos individuales dentro de cada clase son también distinguidos por el número de hidroxilos, metoxilos y otros grupos sustituidos en los dos anillos bencénicos (A y B) (Harborne y Williams, 1988). Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, y los taninos condensados (Winkel-Shirley, 2001), más una séptima clase, las auronas, tenidas en cuenta por algunos autores por estar presentes en una cantidad considerable de plantas. También el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en el esqueleto de los isoflavonoides o el de los neoflavonoides, que por lo tanto también son derivados de los flavonoides.

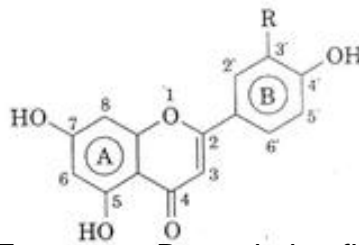


Figura 1. Estructura Base de los flavonoides.

La actividad antioxidante de los flavonoides, está influenciada por la estructura polifenólica presente, como lo sugiere Kuti et al (2004), después de haber analizado extractos polifenólicos de espinacas empleando el ensayo de la Capacidad de Absorción de Radicales Oxígeno (ORAC) para medir su actividad antioxidante. Donde sugieren que la elevada actividad antioxidante presente en las muestras analizadas es debida a su composición fenólica, misma que es influenciada por el tipo de estructura polifenólica, específicamente por la estructura de un azúcar glucósido como la quercetina glucósido, que al estar conjugada con el azúcar posee alta actividad antioxidante debido al -OH unido al anillo A, B o C.

2.2.3 Antocianinas

Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos flavonoides de plantas solubles en agua visibles para el ojo humano (Harborne y Grayer, 1988; Strack y Wray, 1994). Las antocianinas constituyen una subclase de flavonoides, y son responsables de las coloraciones rojiza y azulada encontradas en plantas (Andersen, 2000). Las antocianinas son un grupo importante y extenso de pigmentos, las cuales aunque la mayoría claramente vistas en flores y frutas, pueden ser también encontradas en la epidermis de

las hojas (Delpech, 2000). Las antocianinas son consideradas como sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y solubilidad en el agua que permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos también como posibles beneficios en la salud (Mazza y Miniati, 1993). Recientemente, los investigadores se han enfocado sobre los beneficios en la salud de estos pigmentos, especialmente su actividad antioxidante (Camire et al, 2002), actividad antimutagénica (Gasiorowski et al, 1997; Peterson y Dwyer, 1998) y actividad quimopreventiva (Koide et al, 1997; Zhao et al, 2004), contribuyendo a reducir la incidencia de enfermedades crónicas.

Propiedades Físicas y Químicas

Las antocianinas son el grupo más grande de pigmentos solubles en la naturaleza. Están presentes en casi todas las plantas superiores y pueden ser encontradas en todas las partes de la planta, pero su mayor presencia está en las frutas y flores donde son responsables de los colores atractivos tales como rojo, violeta y azul. El término antocianina es derivado de las palabras griegas flor y azul y fue primero introducido en 1835 por Marquart (Eder, 1996). Las contribuciones más importantes al aislamiento, purificación e identificación de antocianinas fueron hechas por Willstätter en 1913. Las antocianinas son parecidas a los compuestos flavonoides debido a que poseen el esqueleto carbónico característico $C_6C_3C_6$ y el mismo origen biosintético como otros flavonoides naturales (Eder, 1996; Jackman y Smith, 1992). Los pigmentos naturales antociánicos (antocianinas) son siempre glucósidos los cuales se separan en formas agliconas (antocianidinas) y

azúcares por hidrólisis. Las antocianinas son derivados hidroxilados y metoxilados de sales de 2-fenilbenzopirilium o flavilium (Eder, 1996). Antocianinas individuales son caracterizadas por el número de grupos hidroxilos en la molécula, el grado de metilación de estos grupos hidroxilo y la naturaleza, número y posición de azúcares adheridos a la molécula. A si que 17 antocianidinas naturalmente presentes son conocidas, pero solamente seis de ellas están ampliamente distribuidas y por lo tanto contribuyen comúnmente a la pigmentación de plantas. Estas seis antocianidinas comunes—cianidina (cy), delphinidina (dp), malvidina (mv), pelargonidina (pg), peonidina (pn) y petunidina (pt)—son todas C3, C5, C7 y C4' derivados hidroxilados (Figura 2). Debido a que cada antocianidina puede ser glucosilada y acetilada por varios azúcares y ácidos en diferentes posiciones, el número de antocianinas es ~15-20 veces más alto que el número de antocianidinas. Los azúcares más comúnmente unidos a las antocianidinas son glucosa, galactosa, ramnosa y arabinosa; en algunos casos también di- y trisacáridos. La glucosilación frecuentemente ocurre en C3, C5 y C7 pero la glucosilación en C3', C4' y C5' ha sido también observada. Las antocianidinas glucosidos más comunes son 3-monósidos, 3-biósidos, 3,5-diglucósidos y 3,7-diglucósidos. El azúcar residual puede ser posteriormente acilado con ácidos orgánicos como el ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido málico o ácido acético (Mazza y Miniati, 1993).

Factores que influyen el color y estabilidad de las antocianinas

Como con la mayoría de los colorantes naturales, las antocianinas sufren de inestabilidad inherente. Generalmente, las antocianinas son más estables

bajo condiciones ácidas, pero pueden degradarse por alguno de varios posibles mecanismos para formar primero productos incoloros, después productos oscuros e insolubles. La degradación puede ocurrir durante la extracción/purificación y durante el procesamiento y almacenamiento normal de alimentos. Un conocimiento de los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas y los mecanismos de degradación putativos es vital para la eficiente extracción/purificación de antocianinas y para sus usos como colorantes alimenticios. Tal conocimiento puede también conducir a una selección más prudente de fuentes de pigmentos y desarrollo de más productos alimenticios altamente coloreados. Los principales factores que influyen la estabilidad de las antocianinas son pH, temperatura y la presencia de oxígeno, pero la degradación enzimática y las interacciones con otros componentes alimenticios (ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares, copigmentos) no son menos importantes (Jackman y Smith, 1992). En general, las antocianinas son más estables en medios ácidos, libres de oxígeno bajo condiciones frías y en oscuridad (Eder, 1996).

a) Estructura y pH. Bajo condiciones ácidas el color de antocianinas no- y monoaciladas está determinado en gran parte por la sustitución en el anillo B de la aglicona (Figura 2). Un incremento en la sustitución de hidroxilos origina un color azul, mientras que la metoxilación causa que los cromóforos lleguen a ser más rojos. Así, extractos acuosos conteniendo principalmente glucósidos de pelargonidina y/o cianidina aparecen con coloraciones naranja-rojo, aquellas con glucósidos de peonidina son rojo profundo, y aquellas conteniendo glucósidos de delphinidina, petunidina y/o malvidina exhiben

coloraciones azulada-rojiza. La glucosilación y la acilación de antocianinas generalmente tienen un efecto azulado (Jackman y Smith, 1992).

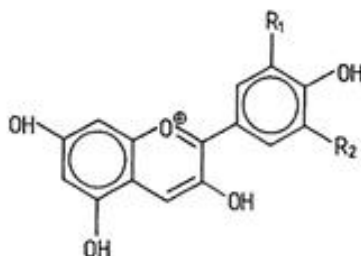


Fig. 11 Formula of anthocyanidins (flavylium cations):

Name	R ₁	R ₂
Cyanidin (cy)	OH	H
Delphinidin (dp)	OH	OH
Malvidin (mv)	OCH ₃	OCH ₃
Pelargonidin (pg)	H	H
Peonidin (pn)	OCH ₃	H
Petunidin (pt)	OCH ₃	OH

Figura 2. Formula de Antocianidinas (cationes flavilium).

En medios acuosos las antocianinas sufren transformaciones estructurales que son dependientes del pH. Han sido encontradas cuatro formas de antocianinas que existen en equilibrio: el catión rojo flavilium, la base azul quinonoidal, la pseudobase incolora carbinol y el chalcon incoloro (Figura 3). En medios fuertemente ácidos (valores de pH debajo de 2) las antocianinas existen predominantemente en su forma roja coloreada como cationes flavilium. A valores de pH débilmente ácidos, neutros y básicos el carbinol y las formas de base quinonoidal dominan al catión flavilium, así que el color destiñe y cambia de rojo a azul. Un azulamiento del color antociánico es también llevado a cabo por la reacción de antocianinas conteniendo grupos orto-dihidroxi con AlCl₃ a valores de pH 2-4 (cambio batocrómico) y por medio de la formación de complejos antocianina-flavonol (copigmentación) (Eder, 1996).

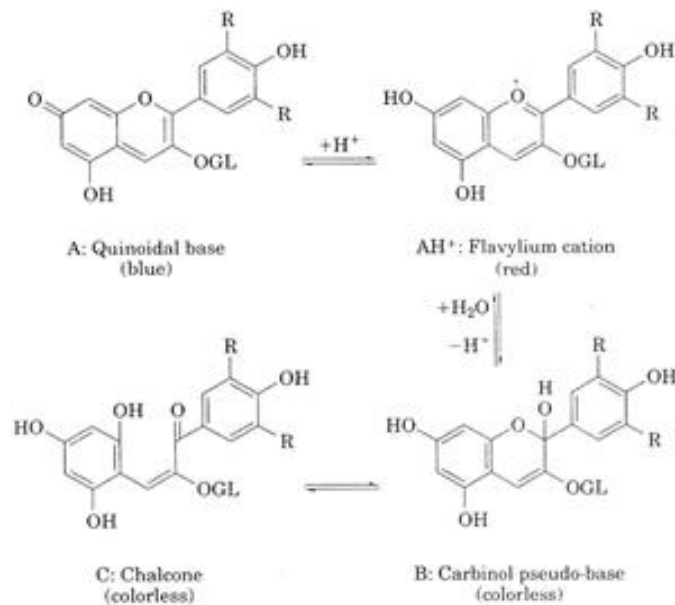


Figura 3. Cambios Estructurales en Antocianinas con el pH. Malvidina 3-glucósido a 25°C.

Como las antocianinas tienen un gran cromóforo de ocho dobles enlaces conjugados aparecen fuertemente coloreados en un medio ácido. Sus espectros de absorción están caracterizados por dos bandas separadas—una en la región visible entre 465 y 550 nm y la segunda, la cual es menos intensa, en el rango UV entre 270 y 280 nm. El espectro de absorción en la región visible de la pelargonidina, cianidina y delphinidina en HCl-metanol al 0.01% son mostrados en la Figura 4. Debe ser mencionado que la máxima absorción y la correspondiente intensidad varían con la naturaleza del solvente; mediciones analíticas tienen por lo tanto que ser hechas bajo condiciones estandarizadas. Las características de absorción de soluciones de antocianinas son afectadas notablemente por la estructura del pigmento. Por ejemplo, un grupo adicional hidroxilo causaría un cambio batocrómico

relativamente grande a longitudes de onda más largas (pelargonidina: $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$, delphinidina: $\lambda_{\text{max}} = 546 \text{ nm}$) y un cambio en color de rojo escarlata (pg) a malva-azul (dp). En contraste, la metilación tiene poco o insignificante efecto, mientras que la glucosilación en C3 produce una absorción máxima más corta a 15 nm. La acilación con ácidos cinámicos causa un cambio característico en la región UV a 310-335 nm (Eder, 1996).

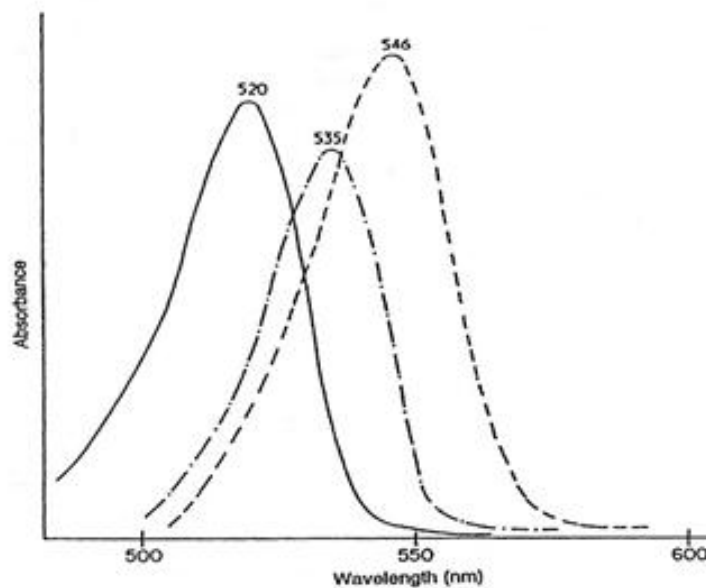


Figura 4. Espectro de Absorción en la Región Visible de (—) pelargonidina, (— • —) cianidina y (- - -) delphinidina HCl-Metanol 0.01%.

b) Temperatura. Como con la mayoría de las reacciones químicas la estabilidad de las antocianinas y la velocidad de su degradación, en forma natural y en sistemas modelo, es notablemente influenciada por la temperatura. La estabilidad térmica de las antocianinas varía con su estructura, pH, presencia de oxígeno e interacciones con otros componentes en el sistema. En general, comportamientos estructurales que conducen a

incrementar la estabilidad al pH, también conducen a incrementar la estabilidad térmica, por ejemplo, la hidroxilación de la aglicona decrece la estabilidad, mientras que la metoxilación, glucosilación y acilación tienen el efecto opuesto (Jackman y Smith, 1992). En presencia de oxígeno, la máxima estabilidad térmica de la antocianidina 3-glucósido ha sido observada a un pH de 1.8 a 2.0 (Daravingas y Cain, 1968; Jackman y Smith, 1992), mientras que la de la antocianidina 3,5-diglucósido ha sido observada a un pH de 4.0 a 5.0. La degradación de la antocianina es virtualmente independiente del pH a un pH de 2.0 a 4.5 en ausencia de oxígeno (Jackman y Smith, 1992).

c) Oxígeno y Peróxido de Hidrógeno. El oxígeno y la temperatura han sido mencionados como los agentes acelerantes más específicos en la destrucción de antocianinas. El oxígeno puede causar degradación de las antocianinas por un mecanismo de oxidación directo y/o por oxidación indirecta por el cual los constituyentes oxidados del medio reaccionan con las antocianinas para producir productos descoloridos o de color oscuro. El precipitado y el sedimento desarrollado en jugos de frutas puede resultar de la oxidación directa de la base carbinol (Jackman y Smith, 1992).

Reportes de decoloración de antocianinas de ataque directo por ácido ascórbico han sido descartados. La destrucción de antocianinas inducida por el ácido ascórbico probablemente resulta de la oxidación indirecta por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) formado durante la oxidación aeróbica del ácido ascórbico. El ácido ascórbico y el oxígeno han sido mostrados para actuar sinérgicamente en la degradación de las antocianinas. La pérdida de

pigmento máxima en varios jugos de frutas conteniendo antocianinas ha ocurrido bajo condiciones más favorables a la oxidación del ácido ascórbico, que es, a altos niveles o concentraciones de oxígeno y ácido ascórbico. La pérdida significativa de color en jugo de fresa ha sido demostrada en presencia de H₂O₂ añadido (Jackman y Smith, 1992).

d) Luz. Las antocianinas son generalmente inestables cuando son expuestas a luz UV o visible (Jackman y Smith, 1992; Palamadis y Markakis, 1975) u otras sustancias de radiación ionizante (Jackman y Smith, 1992). Su descomposición parecen ser principalmente fotooxidativa ya que el ácido p-hidroxibenzoico ha sido identificado como un producto de degradación menor. Las antocianinas sustituidas en el grupo hidroxilo del C-5, las cuales son conocidas a presentar fluorescencia, son más susceptibles a la descomposición fotoquímica que aquellas insustituidas en esta posición. La co-pigmentación puede acelerar o retardar la descomposición dependiendo de la naturaleza del co-pigmento. La capacidad de la luz a generar un estado excitado de la antocianina vía transferencia de electrón pareciera estar predispuestos estos pigmentos a la descomposición fotoquímica (Jackman y Smith, 1992).

e) Enzimas. Varias enzimas que son endógenas en muchos tejidos de plantas han sido implicadas en la decoloración oxidativa de antocianinas. Estas enzimas han sido generalmente llamadas antocianasas, pero basadas en su actividad dos grupos distintivos de enzimas han sido identificadas:

1. Glucosidasas, las cuales hidrolizan enlaces glucosídicos de antocianinas para producir el azúcar libre y la aglicona, la inestabilidad de éstos cromóforos resultando en su transformación espontánea a derivados descoloridos (Jackman y Smith, 1992).

2. Polifenoloxidasas (PPO), las cuales actúan sobre las antocianinas en la presencia de o-difenoles vía un mecanismo de oxidación acoplado (Figura 5).

En adición a la glucosidasa y PPO, Jackman y Smith (1992) han reportado una degradación de antocianinas catalizada por una peroxidasa.

f) Agentes Nucleofílicos. Antocianinas no y mono aciladas son particularmente susceptibles al ataque nucleofílico en las posiciones C-2 y/o C-4. La reacción de las sales de flavilium con nucleófilos ocurre rápidamente cuando la posición C-5 es insustituida en la posición (Jackman y Smith, 1992).

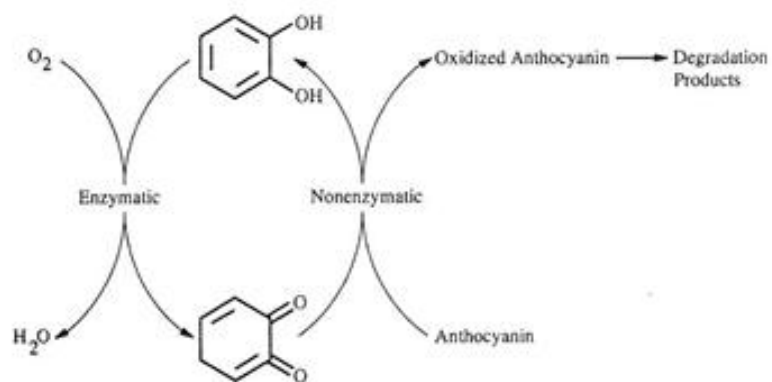


Figura 5. Mecanismo de Oxidación Acoplada Involucrado en la Oxidación de Antocianinas por la Polifenoloxidasa (Jackman y Smith, 1992).

Como previamente fue discutido, el ataque nucleofílico del catión flavilium por agua puede ocurrir en la posición C-2, originando la base carbinol incolora. Para aminoácidos y nucleófilos carbonados tales como catequina, fenol, fluoroglucinol, 4-hidroxycumarino y dimedon, el ataque ocurre en la posición electrofílica C-4 para producir 4-sustituido flav-2-enos. Estos compuestos son altamente reactivos y pueden sufrir cambios posteriores dependiendo de la naturaleza del sustituyente-4 (Jackman y Smith, 1992).

g) Azúcares y sus Productos de Degradación. El uso de altas concentraciones de azúcar (>20%) o jarabes para preservar frutas y derivados tiene un efecto protector global sobre los cromóforos de las antocianinas, presumiblemente por la baja actividad de agua (a_w). La a_w reducida está asociada con una reducida velocidad de degradación de antocianinas: la hidratación de cromóforos de antocianinas a especies descoloridas llega a ser menos favorable como el agua llegue a ser limitante. Efectivamente, polvos de antocianinas deshidratadas ($a_w \leq 0.3$) son relativamente estables a temperatura ambiente por varios años cuando son mantenidos en contenedores sellados herméticamente (Jackman y Smith, 1992).

A un nivel límite (100 ppm) de azúcares y sus productos de degradación han sido mostrados para acelerar la degradación de antocianinas. La fructosa, arabinosa, lactosa y sorbosa demuestran efectos degradativos más pronunciados sobre las antocianinas que la glucosa, sacarosa o maltosa (Jackman y Smith, 1992). La velocidad de degradación de antocianinas está asociada con la velocidad a la cual el azúcar por sí solo es degradado a

compuestos de tipo furfural (Eder, 1996; Jackman y Smith, 1992). Estos compuestos, furfural (derivado principalmente de aldopentosas) y 5-hidroxiacetilfurfural (HMF; formado de cetohexosas), provienen de la reacción de Maillard (Jackman y Smith, 1992) o de la oxidación del ácido ascórbico, ácidos poliurónicos o de antocianinas. Estos productos de degradación rápidamente se condensan con antocianinas por mecanismos desconocidos, finalmente conduciendo a la formación de compuestos complejos de color oscuro.

h) Co-pigmentación. Jackman y Smith (1992) sugirieron que todas las antocianinas pueden ser iónicamente enlazadas en la vacuola celular por ácidos orgánicos alifáticos tales como ácido málico, málico o cítrico. Tales interacciones pudieran proveer un mecanismo de estabilización del color in vivo. La absorción física del catión flavilium y/o bases quinonoidales neutras o aniónicas sobre una superficie deseable pudiera también estabilizar los cromóforos de las antocianinas llevándolas fuera de la solución madre, por lo tanto previniendo la pérdida de color causada por las reacciones de hidratación. Es posible que la estabilidad de las antocianinas asociada con pectina se produzca de tal interacción. Similarmente, la alta estabilidad de extractos de antocianinas de flores secas de *Clitoria ternaria* usados para colorear los pasteles de arroz Malasian fue atribuido a la adsorción de los cromóforos sobre el almidón del arroz glutinoso.

Las antocianinas son conocidas para formar complejos débiles con numerosos compuestos tales como proteínas, taninos, otros flavonoides y polisacáridos por lo cual es referido como co-pigmentación intermolecular. La mayoría de estos compuestos no son coloreados por ellos mismos, pero

cuando se asocian con las antocianinas ellos aumentan el color y la estabilidad del cromóforo. La estabilidad es dada por el efecto de la co-pigmentación a través del desplazamiento del equilibrio de hidratación-desidratación (Figura 3) hacia los cromóforos. Como un ejemplo, la estabilidad constante del complejo cianin-quercetina fue estimada en $2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}$, y la constante de hidratación K'_h fue reducida de 10^{-2} a $7 \times 10^{-4} \text{ M}$ (Eder, 1996). Esto es todavía incierto aunque el efecto de estabilización de la copigmentación intermolecular es de una naturaleza cinética o dinámica (Jackman y Smith, 1992).

La co-pigmentación intermolecular pareciera ser menos eficiente en la estabilización de los cromóforos de las antocianinas que la co-pigmentación intramolecular, que es, la acilación; todavía, a un nivel molecular, las características de ambos fenómenos son similares (Eder, 1996; Jackman y Smith, 1992). La co-pigmentación intermolecular es más eficiente con antocianinas monoaciladas que con pigmentos no acilados. Los enlaces puente de hidrógeno han sido sugeridos como la fuerza conductora para la asociación antocianina-co.pigmento. Sin embargo, esto es improbable que la interacción de la antocianina y el co-pigmento es debida solamente a los enlaces del hidrógeno en agua, puesto que el agua por si sola es un excelente donador de enlaces puente de hidrógeno y aceptor. La asociación es más probable a involucrar un proceso de apilamiento similar al que ocurre en la co-pigmentación intramolecular, las fuerzas hidrofóbicas mediando el proceso. Una fuerte evidencia para el apilamiento vertical de antocianinas y co-pigmentos en medio acuoso, análogo al exhibido por los nucleósidos, ha sido generada por estudios de dicroísmo circular. Un complejo de apilamiento

proporciona al cromóforo de la antocianina con protección en contra de un ataque nucleofílico por el agua y la subsecuente pérdida de color (Jackman y Smith, 1992).

La interacción del co-pigmento con la antocianina puede ocurrir con el catión flavilium y la base quinonoidal. La co-pigmentación involucrando a ambas especies de antocianinas resulta en un cambio batocrómico en la longitud de onda visible de máxima absorción, de un color rojo a un azul estable o púrpura; sin embargo, el incremento en la absorción máxima o fuerza tintorial ocurre solamente cuando la formación del complejo involucra la base quinonoidal. Aunque la naturaleza de la antocianina (su modelo de sustitución) tiene una influencia marcada sobre la co-pigmentación, ninguno de las dos la glucosilación ni la hidroxilación son necesarias para que la co-pigmentación intermolecular ocurra. Todas las antocianinas comunes pueden participar en la co-pigmentación intermolecular, siendo la formación del complejo fuertemente afectado por las concentraciones del pigmento y del co-pigmento. El efecto de la copigmentación es más pronunciado cuando la concentración de la antocianina y el radio del co-pigmento a la antocianina se incrementan. Sin embargo, para una concentración dada de pigmento, hay un radio molar correspondiente de pigmento al co-pigmento debajo del cual la intensidad del color es reducida, también hay un radio molar óptimo de pigmento al co-pigmento al cual la intensidad del color y la estabilidad son maximizadas (Jackman y Smith, 1992).

Hasta la fecha, la efectividad o eficiencia de un co-pigmento ha sido relacionada a lo extenso del cambio batocrómico y el incremento de la absorción máxima observada en adición del co-pigmento a un sistema

conteniendo antocianina. Estas dos propiedades espectroscópicas serían un reflejo adecuado de la estabilidad de un complejo dado de antocianina-co-pigmento. La no medición de una estabilidad constante asociada con un complejo dado ha sido reportada. Los co-pigmentos más efectivos incluyen los flavonoles quercitina y rutina, la aurona aureusidin y los flavonoles C-glucosil tales como suertisin. Para los flavonoides que actúan como co-pigmentos efectivos, un doble enlace en la posición 2,3 del C-anillo pareciera ser requerido. El C- y la O-glucosilación de flavones también ha n mostrado ser efectivos para la co-pigmentación. Se ha notado que los ácidos flavonosulfónicos son también efectivos co-pigmentos, presumiblemente debido a la atracción añadida de la carga negativa de los grupos del ácido sulfónico para el catión flavilium (Jackman y Smith, 1992).

Cuando las concentraciones de pigmento llegan a ser relativamente altas, las antocianinas por si mismas pueden actuar como co-pigmentos y participar en reacciones de asociación con ellas mismas. Se ha demostrado que la competición puede tomar lugar entre las reacciones de co-pigmentación y auto-asociaciones. Ellos demostraron que con bajas concentraciones de antocianinas de *Vitis* spp., el incremento del color fue intensificado, pero descendió con el aumento correspondiente en concentración de antocianina. El resultado final de la competición de las reacciones de co-pigmentación y auto-asociación es que el color puede incrementarse más que proporcionalmente a la concentración del pigmento, donde se ha establecido que los grupos 4'-hidroxil y 5-glucosil son elementos estructurales esenciales para la auto-asociación. La urea y el dimetilsulfóxido interrumpen los

agregados auto-asociados, mientras que las sales de cloruro de sodio y magnesio promueven la auto-asociación (Jackman y Smith, 1992).

El efecto de la co-pigmentación, intra e intermolecular, ha sido considerado principalmente responsable de la coloración de tejidos de flores y frutas, de jugos y vinos rojos puesto que las antocianinas solas son conocidas a ser virtualmente descoloridas al pH de estos productos. Aquellos jugos obtenidos de frutas prensadas tratadas con enzimas son más altamente coloreados que aquellos jugos prensados no tratados con enzimas pueden ser atribuidos a la descompartimentalización de varios constituyentes celulares, incluyendo flavonoides, alcaloides, aminoácidos y nucleósidos, los cuales pueden participar en la co-pigmentación con antocianinas a diferentes grados. Los flavonoides, como co-pigmentos, son siempre encontrados en conjunción con las antocianinas, probablemente debido a sus modelos biosintéticos similares. Los flavonoides poliméricos y las antocianinas han sido mostrados por jugar un rol importante en la coloración de uvas y vinos rojos. Los taninos (flavonoides condensados) tienen un efecto protector sobre las antocianinas. En adición, durante el añejamiento de vinos rojos, las antocianinas monoméricas son progresivamente e irreversiblemente remplazadas por pigmentos poliméricas por medio de reacciones de auto-asociación. Dicho material polimérico es menos sensitivo al pH y relativamente resistente a la decoloración por SO₂, ácido ascórbico y luz (Jackman y Smith, 1992).

A continuación, se reportan trabajos publicados sobre la estabilidad de diferentes extractos de antocianinas bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

1. La estabilidad de antocianinas de uva adicionadas a una bebida carbonatada fue probada, donde se estudió la estabilidad de estos pigmentos en una bebida no alcohólica carbonatada para lo cual ellas fueron añadidas como colorantes (Palamadis y Markakis, 1975). Estos autores reportan que un incremento en la temperatura de almacenamiento aceleró grandemente la destrucción del pigmento en la bebida. En la oscuridad, a 38°C, después de 135 días, solamente el 23% de la cantidad original del pigmento extraído con agua caliente permaneció en la bebida, mientras que a 3.5°C, bajo las mismas condiciones de almacenamiento, el 92% del pigmento fue retenido. La exposición a la luz también aceleró la degradación del pigmento; por ejemplo, después de 135 días, en la oscuridad, a 20°C, aproximadamente el 30% del pigmento extraído con agua caliente fue destruido, mientras que para el mismo período y temperatura, pero con una exposición a la luz de la bebida, la pérdida de pigmento fue del 50%. Bajo condiciones de luz fluorescente, para el mismo período (135 días), y una temperatura ligeramente más alta (22°C), la destrucción de la antocianina fue de 70%.

2. Los pigmentos de uva concord como colorantes para bebidas y postres de gelatina fueron estudiados, donde el estudio fue iniciado en un intento para definir las características de estabilidad de las antocianinas de uva concord en productos alimenticios (Clydesdale et al, 1978). Estos autores reportan que en general puede ser notado que el pigmento sistema bajo estudio mostró buena estabilidad bajo almacenamiento en ambos productos excepto cuando fue expuesto a condiciones de alta humedad y alta temperatura. Además, las antocianinas de uva en la bebida preparada de cereza y el

postre de gelatina de fresa fue encontrada a ser excelente después de 1 día de almacenada en luz solar y 1 semana en refrigeración evaluada por análisis colorimétrico. También se encontró que una degradación mínima en color solamente fue vista aun después de 3 semanas en el refrigerador, a lo cual el tiempo del molde llegó a ser el problema, no el color. Finalmente concluyeron que los pigmentos de antocianinas tuvieron una razonable estabilidad hasta las 12 semanas de almacenamiento. Esta estabilidad fue grandemente incrementada por el uso de nitrógeno en el medio circundante y de igual manera disminuida por almacenamiento a 38°C y 90%HR.

3. La degradación térmica de pigmentos de antocianinas de frambuesa negra en sistemas modelo fue estudiada, donde la degradación térmica de pigmentos de antocianinas de frambuesas negras como es influenciada por el pH, oxígeno, azúcares y sus productos de degradación fue estudiada (Daravingas y Cain, 1968). Estos autores reportan que la degradación del componente principal de las antocianinas (cianidin-3-glucósido), pigmentos totales aislados y el pigmento en el jugo natural de baya fue retardada conforme el pH disminuyó (4.25 a 0.95). Bajo las mismas condiciones, la cianidina fue mucho más inestable que algunas de las antocianinas contenidas en el sistema. En todos los casos estudiados, el reemplazo del oxígeno atmosférico con nitrógeno mejoró la estabilidad del pigmento.

4. La caracterización de antocianinas de rábano rojo fue estudiada, donde se comparó la estabilidad de antocianinas de rábano a hidrólisis ácida con otras antocianinas de origen pg (Giusti y Wrolstad, 1996). Estos autores reportan

que el procesamiento térmico de rábanos mostró que los pigmentos fueron estables al calor. El atractivo tono rojo de las antocianinas de rábano y su estabilidad al calor y a la hidrólisis ácida sugieren los rábanos pueden ser una fuente deseable de colorante para varias aplicaciones alimentarias.

5. La extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L.) como colorantes en yogur fue estudiada, donde se determinó el uso potencial de las antocianinas extraídas de granos de maíz, como colorantes en yogur (Salinas et al, 2005). Estos autores reportan que las antocianinas extraídas de la fracción pericarpio-capa de aleurona fueron añadidas a un yogur natural comercial, en concentración de 1 mg/100 g de yogur. Las muestras de yogur coloreadas se almacenaron bajo condiciones de refrigeración ($4^{\circ}\text{C} \pm 1$) durante 25 días y se les midió color y pH cada 5 días. Los mayores cambios de color de los yogures teñidos se observaron durante los primeros 10 días de almacenamiento y consistieron en una reducción del tono rojizo, con disminución de la luminosidad y de la pureza del color, sin embargo, estos cambios no fueron evidentes a simple vista, por lo que es viable colorear alimentos de bajo pH con extractos de antocianinas líquidos obtenidos de los granos de maíz estudiados.

6. La estabilidad de antocianinas en jugos pasteurizados de mora (*Rubís glaucus* Benth) fue estudiada, donde se evaluó la estabilidad química de antocianinas totales mediante la determinación de los espectros de absorción en el rango visible (400-580 nm) en tres jugos pasteurizados en presencia de diferentes proporciones de ácido ascórbico (formulación A: 0.1%, formulación

B: 0.05% y formulación C: 0.01%), elaborados a partir de 12% de pulpa de mora (Moreno et al, 2002). Estos autores reportan que los jugos elaborados a partir de pulpa de mora (*Rubís glaucus*) condicionados con ácido ascórbico como único preservativo presentaron una estabilidad química mínima de nueve días a una temperatura de 7°C. La concentración de antocianinas totales expresada como g de pelargonidina-3-glucósido/L se mantuvo constante.

7. Pigmentos Antocianos: Comparación de Estabilidad del Extracto fue estudiada, donde se monitoreó la estabilidad de antocianinas estructuralmente diferentes bajo condiciones controladas (Baublis et al, 1994). Estos autores reportan que las estabilidades de antocianinas de uvas Concord, repollo rojo, tradescantia y aguja fueron estudiadas. Las estabilidades de los extractos expuestos a la luz mostraron que las antocianinas de tradescantia tuvieron las estabilidades más grandes comparadas con las otras. El modelo de degradación para la tradescantia se aproximó a la linealidad, mientras en los otros extractos una degradación exponencial fue aparente. Entre los cuatro extractos de antocianinas estudiados, las antocianinas de tradescantia mostraron una estabilidad más grande. La extraordinaria estabilidad de estas antocianinas pudo ser atribuida a su estructura. Debido al alto grado de acilación y sustitución en el anillo B del cromóforo, la copigmentación intramolecular disminuyó la hidratación de estos compuestos a la pseudobase incolora con lo cual mejoró la estabilidad del extracto.

Propiedades en Alimentos

Muchas frutas y vegetales deben sus colores atractivos azul, violeta o rojo a la presencia de antocianinas. En 70 especies de 33 familias de angiospermas las antocianinas son encontradas en la membrana enlazadas a los antocianoplastos localizados dentro de la principal célula vacuola. Especialmente las frutas de las Vitaceas (uvas) y las Rosaceae (manzana, cereza, ciruela, durazno, fresa, zarzamora, frambuesa) son caracterizadas por su contenido en antocianinas. Otras familias con contenido de pigmento antocianínico incluyen a la Ericácea (arándano), Saxifragácea (pasa roja y negra), Caprifoliácea (baya del sauco), Solanácea (tamarindo, arándano), Gramínea (maíz, cebada, arroz), Anacardiácea (mango), Sapindácea (lichi), Rutácea (sanguina), Malvácea (rosellon), Fabácea (soya), Apicéae (zanahoria), Brassicacéae (repollo, rábano), Solanácea (tomate, berenjena), Convolvulácea (camote), Berberidácea y otras.

Un gran número de más de 200 diferentes antocianinas pueden ser encontradas en estas plantas pero debido a que solamente seis antocianidinas son comunes esta variación es principalmente debido a el tipo glucosídico. El color de la mayoría de las frutas es causado por una mezcla compleja de antocianinas. Por ejemplo, se han encontrado 16 antocianinas en cultivos de arándanos; se han separado 21 componentes de antocianinas en pieles de *V. Vinifera* cv. Cabernet Sauvignon. Sin embargo, modelos simples de una o dos antocianinas pueden ser detectadas, por ejemplo, en frutas pasión y duraznos. La cianidina es la antocianidina más comun en frutas (presente en 90% de las frutas examinadas, seguida por la delfinidina (35%), peonidina (30%), pelargonidina (20%) y petunidina y malvidina (cada

una 15%). Estas antocianinas también son predominantes en vegetales y granos. La glucosilación en la posición C3 es muy común. Diglucósidos son formados por enlace de azúcares en dos hidroxilos diferentes (generalmente C3 y C5 o C7) o por enlace de dos azúcares en una sola posición (C3). Los triglicósidos no son muy numerosos en frutas. Antocianinas aciladas son a menudo ampliamente encontradas en frutas, por ejemplo, en uvas, berenjena y arándano, y en vegetales (repollo, rábano, apio, chicoria, papa). Sin embargo, ellas rara vez están presentes en granos (maíz). El contenido total de antocianinas de diferentes tejidos de plantas puede mostrar diferencias considerables. Por ejemplo, en frutas este promedia de 0.25 mg/100 g (pera) a 760 mg/100 g (*Vaccinium ellioti*), cultivos rojos de grosella varia de 11.9 a 18.6 mg/100 g, cultivos de arándanos varia de 46 a 172 mg/100 g. La distribución y contenidos de pigmentos antociánicos en frutas, vegetales y granos han sido comprensivamente resumidos por Eder (1996).

2.3 ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS

El color es un atributo importante en la mayoría de las frutas y vegetales también como sus derivados. Los colores rojo, violeta y azul de muchas plantas son debido a la presencia de antocianinas, es de interés analizarlas. Aspectos cuantitativos y cualitativos son responsables para la calidad del color de los comestibles. Con el objeto de profundizar las características cromáticas de frutas la evolución de antocianinas en frutas y factores de influencia (temperatura, agua) han sido estudiados ampliamente. Desafortunadamente, las antocianinas se degradan fácilmente de acuerdo a varios mecanismos de reacción. Durante el procesamiento y almacenamiento

de productos alimenticios ricos en antocianinas como jugo, vino, mermelada, almíbares y frutas deshidratadas y congeladas, el color original se deteriora y cambia de rojo natural o púrpura a café rojizo. Subsecuentemente, problemas a menudo ocurren en vinos de frutas y jugos, causados por la formación de sedimentos. Numerosas investigaciones han mostrado que la degradación y polimerización son influenciadas por el oxígeno, ácido ascórbico, luz, pH y temperatura. Generalmente la degradación de la antocianina sigue una cinética de reacción de primer orden. Para minimizar estas modificaciones indeseables de propiedades sensoriales estudios posteriores concernientes a la estabilidad de antocianinas deben ser llevados a cabo. Sin embargo, en vinos rojos y oportos una conversión distintiva del color rojo frutal original a un color del vino rojo añejado bien desarrollado es deseado (Eder, 1996).

Siguiendo la tendencia común de desaparición de los colores sintéticos, el uso de antocianinas como colorantes alimenticios naturales se incrementará rápidamente. Desde el punto de vista médico los pigmentos de antocianinas son considerados como seguros debido a que han sido consumidos por humanos y animales por generaciones enteras sin algún efecto adverso aparente a la salud. Posteriormente varias propiedades benéficas terapéuticas, particularmente en oftalmología y para algunos desordenes de circulación de sangre, son atribuidos a las antocianinas. Sin embargo, su factibilidad técnica es impedida por su inherente inestabilidad y dependencia del pH. Algunas de estas desventajas pueden ser subsanadas por un grupo descubierto recientemente de antocianinas aciladas sustituidas en el anillo B. El uso de antocianinas de origen natural para alimentos y bebidas es ampliamente permitido dentro de la Comunidad Europea (E163) y los

Estados Unidos. Numerosas plantas y partes de plantas (uvas, grosellas, bilberry) han sido sugeridas como potencial fuente comercial de antocianidinas pero solamente aquellas donde el pigmento es un subproducto de otro producto valuable (jugo, vino) son de interés económico (Eder, 1996). Se sabe que la composición individual de antocianina es distintiva para cualquier planta dada, el análisis de antocianinas es muy útil en la distinción entre especies. La diferenciación quimotaxonómica es comúnmente basada en diferencias cualitativas, pero dentro de un cultivo (uvas) aun variedades pueden ser discriminadas por diferencias cuantitativas. Las características diferencias en los modelos de las antocianinas también han sido exitosamente aplicadas para la detección de adulteraciones en productos de arándanos (Eder, 1996).

2.3.1 Preparación de la Muestra

Durante la preparación de la muestra y análisis algunas precauciones tienen que ser tomadas puesto que las antocianinas no son estables en soluciones neutras o alcalinas bajo intensidades altas de luz y a altas temperaturas.

1. Extracción

Como las antocianinas son descompuestas en soluciones neutras o alcalinas, los procedimientos de extracción generalmente involucran el uso de ácidos diluidos en solventes polares. El procedimiento de extracción más común involucra la maceración o remojo del material de la planta en metanol conteniendo una pequeña cantidad (1%) de HCl. La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirve para mantener un pH bajo. Esto puede, sin

embargo, alterar la forma nativa de pigmentos complejos por asociaciones de rompimiento con metales, copigmentos y proteínas. Para obtener antocianinas lo más naturalmente posible el uso de solventes neutros (60% metanol, etilenglicol, n-butanol, acetona) y ácidos orgánicos débiles (ácido fórmico, ácido acético) han sido recomendados (Eder, 1996).

Jing y Giusti (2007), reportan que las condiciones de extracción, el tipo de solvente, la temperatura y el tiempo de exposición, pueden ser moduladas en orden para producir pigmento de alta calidad y reducir la pérdida durante la producción. La duración de la extracción y el número de procedimientos de reextracción afectarán la recuperación y pureza de antocianinas deberá ser también considerado para la producción del colorante.

2. Purificación

Para la purificación de extractos crudos de antocianinas varios métodos han sido exitosamente aplicados. En el pasado la muestra limpia se ha purificado precipitando con acetato básico de plomo, por cromatografía de papel y por extracción solvente-solvente. Estos métodos son muy tardados y causan considerable rompimiento de antocianinas. Más recientemente, extracción en fase sólida con polivinilpirrolidón (PVP), Sefadex G-25, Sefadex LH-20, poliamida, resinas de intercambio iónico, alumina ácida y octadesilano han sido usados. Procedimientos simples y rápidos están basados en el principio de que las antocianinas son enlazadas en adsorbentes mientras que sustancias de interferencia (azúcares, ácidos) son lavados de las columnas o cartuchos. En general, las antocianinas son subsecuentemente eluidas del adsorbente con metanol acidificado (Eder, 1996).

García-Viguera et al (1999), extrajeron y purificaron antocianinas de fresa donde 5 g de fruta fue extraída con 15 mL de acetona por 5 min a temperatura ambiente, para producir un agregado de pectina (García-Viguera et al, 1998^a). El extracto fue filtrado, concentrado bajo vacío (35°C), y el residuo redissuelto en 5 mL de agua acidificada (ácido fórmico 3%). Esta solución acuosa fue adsorbida sobre un cartucho Sep-Pak C-18 (Waters Associates, Milford, MA). El cartucho fue lavado con ácido fórmico 3%, y los pigmentos fueron eluidos con ácido fórmico 3% en metanol. El extracto metanólico fue concentrado y redissuelto en una mezcla de ácido fórmico acuosa 5% conteniendo 20% de metanol (1 mL) y filtrado a través de un filtro de 0.45 µm tipo Millex HV (Millipore Corp., Bedford, MA) antes de cada análisis por HPLC.

2.3.2 Métodos de Análisis-Detección-Separación

Para la determinación de antocianinas varios métodos incluyendo espectrofotometría, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) han sido descritos en la literatura. Dependiendo del objeto de análisis métodos cuantitativos son a menudo divididos en tres grupos: (a) determinación del contenido total de antocianinas en sistemas conteniendo pocas o no sustancias de interferencia; (b) determinación del contenido total de antocianinas en sistemas que contienen material de interferencia y (c) determinación de antocianinas individuales (Eder, 1996).

1. Métodos clásicos

a. Métodos Espectrofotométricos. Las antocianinas tienen un máximo de absorción entre 500 y 535 nm su determinación fotométrica está basada en la

extinción de la energía luminosa, la cual es definida por la Ley de Lambert-Beer. Sin embargo, asociaciones entre antocianinas y co-pigmentos puede causar severas desviaciones en la Ley de Lambert-Beer y puede conducir a estimaciones inexactas. Ello puede ser necesario para diluir la muestra considerablemente con búfers ácidos (solución búfer de pH 1.0 para muestras conteniendo predominantemente antocianina 3-glucósido). Extractos de plantas frescos o jugos usualmente contienen solamente pocas sustancias de interferencia y el contenido total de antocianinas puede ser por lo tanto determinado simplemente por medición de la muestra a una longitud de onda única. En muestras conteniendo una mezcla de concentraciones de antocianinas absolutas el contenido total de antocianinas puede ser estimado por el uso del promedio ponderado de absortividades y mediciones de absorbancia a promedio ponderado de longitudes de onda (Eder, 1996).

El método sencillo de pH no debe de ser usado para muestras que han sido tratadas con calor, almacenadas o procesadas debido a que ellas contienen interferencias, productos cafés de degradación de azúcar o rompimiento de pigmentos. Para tales muestras métodos de determinación de antocianinas mejorados han sido desarrollados, por ejemplo, métodos de absorción diferencial o sustractiva, los cuales minimizan la interferencia causada por productos de degradación. Los métodos diferenciales toman ventaja por el hecho de que las características espectrales de las antocianinas cambian con el pH mientras que aquellos de interferencia productos marrón son estables. Se puede asumir que la diferencia en absorbancia entre dos valores de pH a la misma longitud de onda es una medida de la concentración de antocianina debido a la absorbancia causada por el material de interferencia es eliminado

por sustracción. Se ha descrito en la literatura el uso de varios valores diferentes de pH, pero las mediciones a pH 1.0 y 4.5 es lo más común. Después del ajuste de pH un periodo de al menos 1 hora es requerido para permitir que se equilibren las diferentes formas de antocianinas. Posteriormente con el método de diferencial un índice de degradación de antocianina, definido como el ratio de antocianina total determinado a un valor de pH único para que determinado por el método de diferencial, pueda ser calculado. La razón simple de la absorbancia de pigmentos rojos (medido en la región de 500-550 nm) para que de los pigmentos marrón (medido en la región de 400-440 nm) también provea un buen índice de deterioración de color, por ejemplo, en vino rojo el color hue es definido por la razón A_{420nm}/A_{520nm} . Para el método sustractivo la absorbancia total de la muestra a la absorción máxima es primero medida. Después de que las antocianinas son blanqueadas y la lectura en blanco, la cual es causada únicamente por el material de interferencia, es determinada. Los agentes blanqueadores más comunes usados son sulfito de sodio y peróxido de hidrógeno. Desafortunadamente, estos agentes blanqueadores también causan un descenso en la absorbancia de sustancias de interferencia, las cuales pueden originar erróneamente valores altos de concentración total de antocianina (Eder, 1996).

Con todos estos métodos la concentración de antocianina (C) puede ser calculada por la siguiente ecuación:

$$C(\text{mg/L}) = \frac{E \times \text{MW} \times 10 \times V}{e}$$

Donde E es la extinción a una longitud de onda apropiada o la diferencia de extinciones a dos diferentes longitudes de onda o después del blanqueo, MW es el peso molecular del pigmento, V es el factor de dilución, y e es el coeficiente de extinción molar. Los métodos para la determinación de densidad de color, color hue, color polimérico, contenido total de antocianina, grado de ionización y color monomérico de antocianina calculados de solamente unas pocas lecturas de absorbancia han sido reportadas. Debido a su simplicidad, velocidad y bajo costo, la fotometría es a menudo aplicada para el análisis de antocianinas. Sin embargo, esta carece de alta selectividad y sensibilidad (Eder, 1996).

Camire et al (2002), determinaron el contenido de pigmento de antocianina monomérico en arándano y uva con el método de diferencial de pH (Wrolstad, 1976). El contenido de antocianina fue reportado como mg de malvidina 3-glucósido/100 g sobre base seca.

b. Métodos No-destructivos. Métodos no-destructivos como la colorimetría triestímulo, luz reflectante o mediciones de transmitancia permiten la determinación de antocianina en muestras intactas (frutas, jugos) sin alguna manipulación química previa. Una gran variedad de métodos han sido descritos, y el registro de absorción, reflectancia, y espectro de emisión y la medición física del color expresado por valores triestímulos son ampliamente aplicados. La relación entre los tres atributos hue, luminosidad y saturación (croma) es gráficamente representado en el patrón de color (patrón Munsell, patrón Hunter). La retina del ojo humano tiene tres tipos de moléculas

receptoras de color, de tal manera que cada pigmento corresponde a cada uno de los hues primarios rojo, azul y verde. La colorimetría triestímulo simula las moléculas receptoras de color del ojo humano usando un filtro para cada uno de los hues primarios. Los instrumentos de laboratorio Gardner y Hunter usan el patrón Hunter con las siguientes coordenadas: +a (rojo) a -a (verde), +b (amarillo) y -b (azul). Los tres hues cromáticos-rojo, azul y verde-corresponden a los tres tipos de moléculas receptoras en ojos humanos, la colorimetría triestímulo es una buena medida para descripciones reales, visuales de color. La medición triestímulo ha sido por lo tanto ampliamente aplicada a estudios concernientes de estabilidad, deterioración y aceptabilidad de color de antocianinas en productos alimenticios, por ejemplo, en vino de uva, jarabe de grosella negra, jarabe de fresa, jugo y vino de frambuesa y cerezas ácidas congeladas. El parámetro triestímulo a^* (rojizo) y el contenido total de antocianinas fueron correlacionados, por ejemplo, en vino oporto joven $r = -0.906$ y en cerezas ácidas $r = -0.55$ a -0.77 . Para manzanas cv. Red Delicious el coeficiente de determinación (R^2) para la relación entre el contenido de antocianina [método fotométrico: $(A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620})$; $n = 46, 200$] y el radio cromático (a^*/b^*) fue calculado con 0.59 . Así la metodología triestímulo puede ser usada con ciertas reservas para determinar el contenido total de antocianinas de frutas. Esta determinación no destructiva también ha sido empleada para seguir cambios en frutas individuales (manzanas) durante la etapa de crecimiento o para monitorear los efectos de varios tratamientos (Eder, 1996).

Análogo a la colorimetría triestímulo una alta correlación entre mediciones de reflectancia o transmitancia y el contenido de antocianinas de frutas también

fue encontrada. Mientras que las mediciones de reflectancia principalmente han sido usadas para monitorear el color desarrollado en diferentes frutas tales como cerezas y uvas, mediciones de transmitancia han sido exitosamente adaptadas para la clasificación de frutas en categorías de madurez específica (Eder, 1996).

Rodríguez-Saona et al (1998), midieron los parámetros de color (L, a*, b*) en papas rojas como una correlación de la presencia de antocianinas. Las soluciones coloreadas fueron colocadas en una célula de vidrio óptico (2.5 mm de fondo, Yema, Borough Hall Station, NY) y la luminosidad, saturación y pureza del color fueron determinadas usando un colorímetro Hunter Lab CT 1100 ColorQuest (Hunter Associates Laboratorios In., Reston, VA).

c. Electroforesis. Dentro de rangos especiales de pH las antocianinas exhiben una estructura iónica, la cual les origina a ellas la movilidad en un campo eléctrico. Al principio las investigaciones electroforéticas fueron hechas sobre un papel filtro usando diferentes electrolitos como búfer de acetatos, ácido fosfórico 0.3 M, búfer de boratos y ácido cítrico 0.1 M a pH 2.0. Cuando se probaron diferentes sistemas búfer a varios valores de pH, se observó que los puntos isoeléctricos de antocianinas fueron muy cercanos al pH al cual estos pigmentos mostraron un color mínimo. Usando una película de acetato de celulosa en un búfer de acetato 0.05 M a pH 4.2, los pigmentos de antocianinas de varias flores pudieron ser separados en varios, principalmente manchas catiónicas. Más recientemente, quienes emplearon un sistema electrolito conteniendo Triton X-100/ AlCl_3 , reportaron separaciones exitosas de antocianinas. Sin embargo, la electroforesis es raramente usada en el análisis de antocianinas debido a que esta implica

varias desventajas tales como mala selectividad, baja sensibilidad y difícil cuantificación (Eder, 1996).

d. Cromatografía de columna (CC). La CC es un método bien establecido para aislamiento preparativo, purificación de la muestra y cuando es conectada con una unidad fotométrica, para estimación directa de antocianinas individuales. Los materiales de la columna de soporte más comunes son resinas de intercambio iónico, óxido de aluminio, poliamida y PVP (Policlar AT). Al principio la cromatografía de intercambio iónico fue probada con poco éxito debido al débil intercambio catiónico (Amberlita CG-50) no fijaba algunas antocianinas mientras intercambiadores catiónicos fuertes (Amberlita IRA-120) enlazaron algunas antocianinas irreversiblemente, la cual causó recuperación incompleta y resultados cuantitativos variables. Con el objetivo de mejorar la recuperación se usaron solventes muy polares tales como HCl-agua, HCl-metanol, ácido fórmico dimetilsulfóxido, los que respectivamente también causaron descomposición de pigmentos. Sin embargo, más recientemente antocianinas oenociánicas fueron separadas en una resina de intercambio catiónico de sulfoxietilcelulosa en seis fracciones. Resinas de intercambio iónico fueron también exitosamente usadas para remover trazas de metales de antocianinas y llevar a cabo una separación preliminar. La separación de antocianinas de frambuesa roja y negra fue obtenida con una resina de celulosa en polvo y como sistema solvente n-butanol/ácido acético/agua (5:1:4) (Eder, 1996).

El PVP ha sido ampliamente usado para el aislamiento y purificación de antocianinas individuales de material de plantas tales como fresas, ruibarbo y

frambuesas. Usando PVP insoluble como la fase estacionaria, se separó exitosamente 3,5-diglocósidos o peonidina, petunidina, cianidina, delphinidina y malvidina de uvas.

Con la CC de poliamida fue posible resolver las mezclas de antocianinas complejas de rábanos rojos y hojas de repollo rojo también como para detectar y enriquecer antocianinas menores presentes en cantidades extremadamente bajas. La filtración con gel en Sefadex con acetona acuosa como eluyente fue exitosamente aplicado para separar condensados y antocianinas monoméricas de vino. Recientemente la purificación y concentración de antocianinas fue llevada a cabo sobre polímeros porosos como resinas formofenólicas o poliacrílicas. Puesto que las desventajas de la CC tradicional (resoluciones limitadas, tiempo de análisis largo, consumo alto de químicos) son superadas por HPLC, la cuantificación de pigmentos de antocianinas es hoy en día raramente hecho con CC (Eder, 1996).

e. Cromatografía de Gases (GC). Como las antocianinas exhiben una volatilidad baja ellas tienen que ser derivatizadas previo al análisis por GC. Usando trimetilclorosilano (TMCS) y hexametildisilano (HMDS) para la derivatización, se produjeron derivados volátiles conteniendo nitrógeno los cuales, después de la inyección al sistema de GC, fueron transformados a compuestos parecidos a la quinolina. La separación de la GC con una columna de tubos silanizados enrollados conteniendo 0.5 % OV-101 de fase líquida cargada sobre un cromosorbo silanizado W HP (100-120 malla) dio picos bien separados. El subsecuente registro del espectro de masa coincidió con los correspondientes derivados de antocianinas. A pesar de estos

excelentes resultados el análisis por GC es complicado por la derivatización requerida, tanto que esta es raramente usada para el análisis de antocianinas (Eder, 1996).

f. Cromatografía en Papel (PC). El uso de la PC fue introducido para el estudio de antocianinas por Bate-Smith en 1948. El exitosamente separó las antocianinas de varias flores en papel filtro desarrollado con alcohol butilo/ácido acético/agua (BAW, 4:1:5) y publicó los valores R_f de numerosas antocianinas. Desde entonces la PC ha sido ampliamente usada para la separación, purificación e identificación de antocianinas encontradas en muchas especies de plantas. En particular, se identificaron más de 100 diferentes antocianinas y tabuló los valores de R_f en diferentes sistemas solventes para un gran número de pigmentos. Así la composición de antocianinas de varias frutas y vegetales como las uvas, fresas, ruibarbo, rábano, cebollas y arándanos, fue elucidada. Usualmente la separación es llevada a cabo en papel filtro Whatman No. 1 o 3. La elección del solvente usado depende del contenido de sustancias de interferencia (azúcares, pigmentos degradados) en la muestra. Si la muestra contiene relativamente poco azúcar o productos de degradación, el papel debe ser primero corrido en BAW. Si el contenido de sustancias de interferencia es alto, 1% de HCl en agua debe ser usado como primer solvente. Los solventes usados pueden ser divididos en dos grupos principales acuosos y aceitosos. Generalmente los solventes acuosos requieren tiempos más cortos para su corrido (4-8 hr) que los solventes aceitosos (14-18 hr), los cuales son por lo tanto más convenientemente corridos durante la noche. Los cromatogramas son normalmente desarrollados con el solvente descendiendo del papel, pero

esto ha sido señalado que resultados más confiables pueden ser obtenidos con BAW ascendiendo por el papel. Después de la separación cromatográfica, los cromatogramas obtenidos deben ser secados por ~20 min; subsecuentemente, las manchas de diferentes antocianinas pueden ser visualizadas bajo luz de día o luz UV. La identificación de antocianinas individuales esta basada en sus propiedades espectrofotométricas y cromatográficas. Información adicional puede ser obtenida a través hidrólisis ácida o alcalina de la muestra previa a la PC. Se aplicó la PC para discriminar variedades de uva americana (*V. riparia*, *V. rupestris*), las cuales contienen antocianinas fluoresecentes 3,5-diglucósidos y variedades de uva europea (*V. vinifera*), las cuales carecen de aquellos pigmentos fluorescentes. Fueron detectadas adulteraciones en jugos de frutas coloreados y jugos de uvas por PC con BAW (6:1:2) como solvente. Ocasionalmente, la PC dos-dimensional es empleada, pero las antocianinas tienden a decolorarse y formar grandes, manchas difusas, así que este método no ha sido a menudo usado. Como la PC tiene algunos defectos (resolución, tiempo de análisis, sensibilidad) esta es cada vez más sustituida por más técnicas sofisticadas como TLC y HPLC (Eder, 1996).

Puech et al (1975), caracterizaron las antocianinas de higo (*Ficus carica* L.) usando cromatografía de papel. Ellos reportan que toda la PC fue de tipo descendente, usando varios sistemas solventes.

2. Métodos Recientes

g. Cromatografía de Capa Fina (TLC). La TLC ha sido exitosamente aplicada a la separación, aislamiento y detección de antocianinas. Comparada con la

PC esta ofrece las ventajas de tiempos de análisis más cortos, cantidades más pequeñas de muestras, menos difusión y mejor cuantificación reproducible. Inspirada por la efectividad de la PC, capas finas de celulosa y microcelulosa han sido ampliamente usadas para numerosas aplicaciones en análisis de antocianinas tales como la separación de antocianinas de frambuesa, el aislamiento de antocianinas de uva y la detección de adulteraciones en jugo de frambuesa negra. La mayoría de los investigadores han trabajado con polvo de celulosa MN 300, el cual fue calentado a 105° C por 5 min antes de usarse. Como la composición de antocianinas de uvas es muy compleja, numerosos intentos han sido realizados para mejorar su resolución cromatográfica. Se han obtenido buenos resultados con capas finas mezcladas que consisten de silica gel y celulosa (1:1) y un mejoramiento adicional fue alcanzado por el desarrollo de la dos-dimensional o secuencial de las placas de capa fina. La Figura 6 muestra una buena separación de antocianinas de uva de *V. rotundifolia*, la cual fue llevada a cabo por la dos-dimensional y desarrollo secuencial, respectivamente, en placas de TLC mezcladas de silica gel/celulosa (1:1).

Más recientemente, la RP-TLC (C18) fue exitosamente usada para la separación de antocianinas de uva y para la detección de varios colorantes prohibidos. Valores de R_x de 17 antocianinas de uva y de algunos colorantes naturales y artificiales fueron listados. En general, la separación cromatográfica está basada en la polaridad de las antocianinas, la cual se

incrementa con el número de hidroxilos en la molécula (la

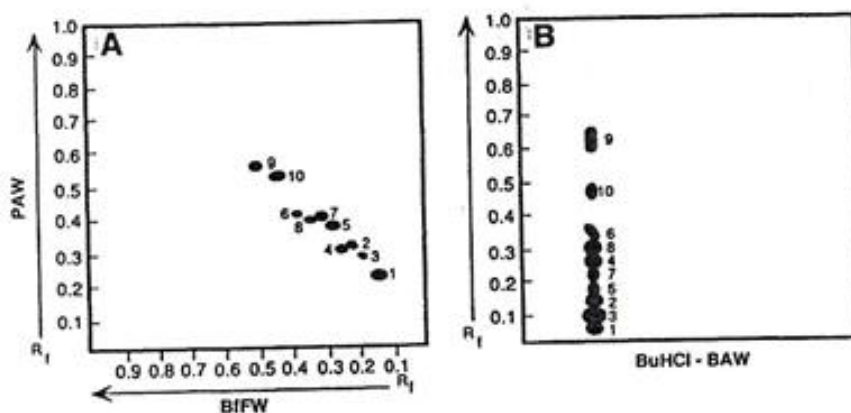


Figura 6. Separación de Antocianinas de Uva (*V. rotundifolia*): (A) TLC dos-dimensional, 1. solvente: PAW, 2. solvente BfFW. (B) TLC secuencial, BuHCl seguida por BAW. (Goldy et al, 1989).

delfinidina es más polar que la cianidina). Además la polaridad depende de la naturaleza y número de los azúcares sustituyentes, con los monoglucósidos acilados siendo menos polares que los no acilados, de los cuales los 3,5-diglucósidos son las antocianinas más polares. Sin embargo, como los valores R_f en la TLC no son tan confiables como en la PC, la aplicación de pigmentos de referencia y el cálculo de los valores de R_x deben ser preferidos. Por medición de las densidades fotométricas de cada mancha cromatográfica las cantidades de cada antocianina puede ser evaluado. Un límite de detección de 10 mg/L de malvidina 3,5 glucósido fue determinado con RP-TLC (Eder, 1996).

h. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Desde el trabajo de Mnaley y Shubiak 1975, quienes fueron los primeros en aplicar la HPLC a

análisis de antocianinas, numerosas técnicas de HPLC han sido desarrolladas para la separación y cuantificación de antocianinas y antocianidinas. Hoy en día la HPLC ha llegado a ser el método de elección debido a que esta ofrece la ventaja de ser un método rápido, sensitivo y cuantitativo. La cuantificación de cromatogramas es, sin embargo, complicado por la falta de disponibilidad de estándares puros de antocianinas. Aunque en el pasado algunos estándares de antocianinas han estado comercialmente disponibles, en muchos casos el aislamiento preparativo de antocianinas puras es todavía necesario. Dicho de otra manera, esto es una práctica común que solamente un estándar de antocianina es usado (malvidin 3-glucósido) y que todos los otros picos de antocianinas son cuantificados en contra de este estándar. Como hay diferencias considerables en los valores cuantitativos de absorbancia y la absorción máxima, esta práctica dará ligeramente resultados incorrectos (Eder, 1996).

La separación por HPLC de antocianinas ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en columnas C18. Ocasionalmente columnas de silica enlazadas con octil (C8) y hexil (C6) han sido también usadas. El promedio de diámetro de partícula de los empaques para HPLC es típicamente entre 3 y 10 μm , con 5 μm siendo el más frecuentemente usado. En la RP-HPLC las antocianinas eluyen de acuerdo a sus polaridades (delfinidina<cianidina<petunidina<pelargonidina<peonidina<malvidina). La elusión de pigmentos es usualmente llevada a cabo por un gradiente de elusión, pero ocasionalmente la elusión isocrática es también suficiente, por ejemplo, con frutas las cuales tienen un modo relativamente simple de

antocianina tal como el mango o para la separación de mezclas de antocianinas. Sistemas solventes para análisis de antocianinas por HPLC siempre incluyen un ácido para alcanzar valores bajos de pH (< 2.0), el cual asegura que la mayoría de las antocianinas están presentes en forma del catión rojo flavilium. El ácido fórmico (hasta 10%) es más ampliamente usado. Este es, sin embargo, bastante corrosivo y el ácido perclórico y el ácido trifluoroacético son igualmente agresivos. Comúnmente alternativas usadas son el ácido acético 15%, el ácido fosfórico 3-4%, el buffer de fosfatos. Esto debe, sin embargo, ser considerado que el uso prolongado de solventes más ácidos que pH 2 pudieran resultar en una pobre reproducibilidad y corta vida de uso de la columna debido a la pérdida de fases de enlace de la superficie del soporte de sílica de la fase estacionaria. El empleo de no sílica, columnas poliméricas, las cuales son estables de pH 1 a 13, permite el uso de solventes con ácidos fuertes, así causando picos más definidos debido a que las antocianinas están completamente en su forma de catión flavilium. Comúnmente el metanol o acetonitrilo es usado como modificador orgánico, pero algunos investigadores sustituyeron acetona por metanol y obtuvieron separaciones similares (Eder, 1996).

Las eluciones de antocianinas son monitoreadas con sistemas de detección UV-Vis o matriz de fotodiodo. Usualmente la longitud de onda de detección es fijada en el rango de entre 510 y 545 nm. Dependiendo de la sensibilidad del sistema detector y del pigmento antocianina, un límite de detección de 0.5-1.0 mg/L de antocianina puede ser asumido generalmente. La identificación de antocianinas puede ser llevada a cabo por cocromatografía de conocimiento, estándares disponibles o basados en tiempos de retención,

los cuales son comúnmente comparados con datos de la literatura. Por escaneo del espectro de absorción en línea, detección de matriz de fotiodo hacen una caracterización estructural adicional de posibles pigmentos. Químicamente las antocianinas pueden ser identificadas por hidrólisis ácida y la subsecuente determinación de la antocianidina y el azúcar mayoritario o por una hidrólisis alcalina suave y la subsecuente determinación del componente acil. Además de la elucidación de la estructura, especialmente para antocianinas aciladas, puede ser confirmada por espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos y espectroscopia NMR (Eder, 1996). Cuando las muestras contienen altas cantidades de material de interferencia (azúcares, coloides) un procedimiento de limpieza de muestra es recomendado. Una preparación de muestra con cartuchos de extracción de fase sólida (C18) fue encontrado a ser bastante útil y efectivo. Previo al análisis por HPLC todas las muestras deben ser filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 μm o más pequeño (Eder, 1996).

Durante las últimas dos décadas el análisis por RP-HPLC ha sido exitosamente usado para estudiar antocianinas en numerosos productos alimenticios. Para demostrar el potencial de esta técnica una separación por RP-HPLC de jugo de grosella negra es mostrado en la Figura 7. A pesar de los altos costos de adquisición y mantenimiento, la técnica por RP-HPLC probablemente permanecerá como el mejor método calificado para análisis de antocianinas en los siguientes años debido a que esta ofrece, comparada con otros métodos, tiempos de análisis más cortos, mejor selectividad, alta versatilidad y mejor sensibilidad.

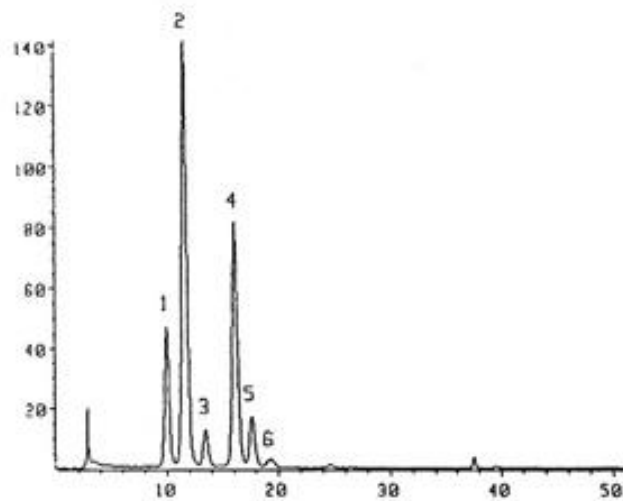


Figura 7. Separación por RP-HPLC de Jugo de Grosella Negra. Picos: 1 = definidina 3-glocósido; 2 = definidina 3-rutinósido; 3 = cianidina 3-glucósido; 4 = cianidina 3-rutinósido; 5 = pelargonidina 3-glucósido (= Int. Std); 6 = pelargonidina 3-rutinósido.

García-Viguera et al (1999), determinaron el contenido de antocianinas de fresa por RP-HPLC.

Jing y Giusti (2007), analizaron cualitativamente antocianinas de maíz morado por HPLC.

Salinas-Moreno et al (2005), determinaron el perfil de antocianinas de 15 variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) por HPLC.

Rodríguez-Saona et al (1998), caracterizaron la composición de antocianinas de papas rojas por HPLC.

2.3.3. Desarrollo de Nuevos Métodos Analíticos

Los métodos anteriormente mencionados son bien aceptados para la separación y cuantificación de antocianinas monoméricas. Sin embargo, la

determinación de antocianinas poliméricas es todavía un problema abierto. Nuevos métodos analíticos como la electroforesis capilar o la cromatografía supercrítica de fluidos (SFC) quizás hará posible el análisis de estos pigmentos poliméricos. Debido a sus ventajas como velocidad y selectividad eso puede ser asumido que la HPLC se quedará como el método de elección para el análisis de antocianinas monoméricas en los próximos años. Mejores separaciones de mezclas de antocianinas complejas pueden ser realizadas a través del uso de micro-HPLC y novedosas fases estacionarias desarrolladas. La cuantificación de antocianinas individuales optimistamente será mejorada por un incremento en la aplicación de estándares puros de antocianinas. Por combinación directa de HPLC con MS una nueva avenida en la caracterización en línea e identificación de antocianinas podrá ser abierta (Eder, 1996).

2.3.4 Aplicación en Análisis de Alimentos

El contenido y distribución de antocianinas en frutas y vegetales ha sido el objeto de numerosas investigaciones durante el siglo pasado. Los análisis químicos han hecho esto posible de seguir los cambios en la composición de las antocianinas que ocurren durante la maduración, procesamiento y almacenamiento de frutas y para determinar los factores que afectan la estabilidad de estos pigmentos. Estudios quimotaxonómicos han descubierto diferencias cuantitativas y cualitativas en la distribución de antocianinas individuales entre cultivos y variedades. Estos valores encontrados han sido aplicados para la caracterización y verificación de cultivos. Usualmente las variedades difieren solamente en la cantidad relativa de las antocianinas

presentes, ya que estas cantidades son determinadas no solamente por la genética sino por factores ambientales, estimaciones estadísticas extensivas son necesarias para la clasificación de variedades. Los perfiles de antocianinas distintivos han sido una herramienta útil para la detección de adulteraciones en productos de jugos de frutas los cuales son ricos en pigmentos de antocianinas. En vinos rojos el análisis de perfil de antocianinas por HPLC también ha sido usado para clasificaciones geográficas y determinaciones fotométricas de antocianinas han sido aplicadas para medir la edad química. Debido a la historia extensa en el análisis de antocianinas, varias técnicas han sido empleadas para análisis de alimentos (Eder, 1996). Como ejemplos de todas las posibles aplicaciones, tres procedimientos analíticos son descritos en detalle.

1. Determinación Espectrofotométrica del Contenido en Antocianinas en Jugo de Fruta de Zarzamora:

Un búfer a pH 1.0: Combinar 125 mL de KCl 0.2 N y 385 mL de HCl 0.2 N, ajustar a pH 1.0 y diluir a 1 L con agua.

Un búfer a pH 4.5: Combinar 400 mL de acetato de sodio 1 M y 240 mL de HCl 1 N, ajustar a pH 4.5 con las mismas soluciones y diluir a 1 L con agua. Una alícuota de la muestra del jugo de fruta es diluida con el búfer a pH 1.0 para que la absorbancia a 510 nm sea menor de 1.0. Entonces otra alícuota de la misma muestra es diluida a la misma concentración con el búfer a pH 4.5. La absorbancia a la longitud de onda de máxima absorbancia (510 nm) y a 700 nm es medida en ambas muestras. Entonces la absorbancia a 700 nm, la cual es causada por turbidez, es

restada de aquella a 510 nm. Subsecuentemente, la diferencia en absorbancia a 510 nm entre las muestras a pH 1.0 y pH 4.5 es determinada. El contenido de antocianina, estimado como cianidina 3-glucósido, es calculado por la siguiente ecuación:

$$c(\text{mg/L}) = \frac{A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000}{eL}$$

Para la cianidina 3-glucósido: $e = 29600$, $\text{MW} = 445$, y $L = 1.0\text{-cm}$, $\text{DF} =$ factor de dilución.

2. Determinación de Antocianinas en Vino Rojo y Jugo de Fruta por Medio de RP-TLC.

Vino rojo, jugo de fruta o extractos metanólicos (0.1% HCl) de uvas y frutas son aplicados en líneas sobre las placas de la RP-TLC (SIL-RPC18). El cromatograma es primero desarrollado con metanol al 20%, HCl 0.25 M hasta que el frente casi ha alcanzado la parte superior de la placa. La placa de TLC es entonces secada por 30 min en un refrigerador y subsecuentemente desarrollada con un segundo solvente, metanol al 40%, HCl 0.25 M. Después de que las antocianinas han sido suficientemente separadas la placa de TLC es rociada con HCl al 1% y las manchas de los pigmentos son evaluadas bajo luz visible y radiación UV. Este método rápido y confiable puede ser usado para varias aplicaciones.

3. Separación de Antocianinas de Vino Rojo o Jugo de Fruta por RP-HPLC.

Previo al análisis por HPLC, la muestra de vino o de jugo es transferida cuantitativamente sobre un cartucho de extracción de fase sólida C18 el cual ha sido preconditionado con 2 mL de metanol y 2 mL de agua. El cartucho cargado es lavado con 2 mL de agua y después secado a vacío. Las antocianinas son lentamente eluidas con 1 mL de metanol conteniendo HCl al 0.1%. Subsecuentemente, 10 μ L de este extracto metanólico de antocianinas es inyectado en el sistema del HPLC y separado con una columna analítica LiChrospher 100 RP (5 μ m, 250 x 4 mm), la cual es protegida por una precolumna corta (4 x 4 mm) rellena con el mismo material. La elusión de antocianinas es llevada a cabo con un gradiente de búfer de fosfatos, pH 1.8 y metanol, la velocidad de flujo es establecida a 0.8 mL/min y la temperatura de la columna a 40° C. La elusión de los pigmentos es monitoreada con un detector de arreglo de fotodiodo a 525 nm. La Figura 8 muestra un cromatograma típico de vino rojo variedad “Zweigelt”.

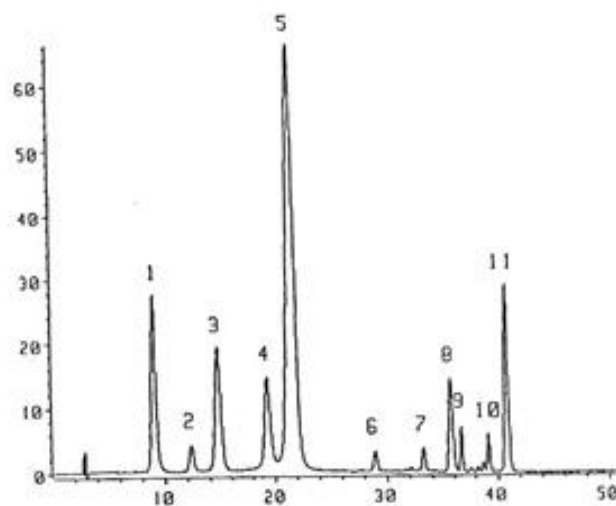


Figura 8. Separación de Antocianinas de Vino Rojo cv. 'Zweigelt' por RP-HPLC.

2.4 Preparación Comercial

El método comercial más común involucra el tratamiento de las pieles de uva con agua conteniendo hasta 3000 ppm de dióxido de sulfuro o su equivalente en bisulfito o metabisulfito. Después de 48 a 72 h, el líquido es removido de las pieles, filtrado, desulfurado y concentrado. Algunas veces una etapa de fermentación es permitida previa a la extracción, en el cual el alcohol es removido durante el subsiguiente procesamiento. El producto final es un líquido libre de partícula de alto poder tintorial. El concentrado líquido puede también ser secado para producir un polvo seco soluble. La presencia del dióxido de sulfuro en el medio extraente genera un incremento en la extracción de los pigmentos también como de un incremento en la estabilidad del producto final. El complejo antocianina-sulfito es incoloro, por lo que el sulfito debe ser removido previo a la concentración final y etapa de filtración. La adición de ácidos hace que la etapa de extracción sea más eficiente, pero la adición de ácidos minerales requiere de una neutralización en la misma etapa. La adición de ácido tartárico puede ser removida por adición de hidróxido de potasio donde el precipitado resultante del tartrato de potasio puede ser fácilmente removido por filtración. La purificación del extracto crudo puede ser terminada pasando el extracto a través de una resina de intercambio iónico con la ventaja adicional de que el colorante eluido puede ser fraccionado. La primera porción de la elusión será más roja que la porción final azulada, debido a que los compuestos de peso molecular más altos pasarán a través de la resina a una velocidad más lenta. El tratamiento con resinas produce un compuesto más puro pero a un alto costo. Los procedimientos aprobados por La Administración de Drogas y Alimentos

(FDA) para la extracción son especificados en la sección CFR 73.170 para Extraer Piel de Uva.

La extracción de pieles de uvas es mucho más eficiente con metanol acidificado o etanol, pero esto requiere otra etapa para remover el alcohol. Las vinerías son usualmente familiares con el manejo de alcohol, pero otros productos colorantes potenciales parecen renuentes a poner una unidad de recuperación de alcohol en una planta alimenticia. A pesar de todo, la extracción de alcohol no parece tener una atracción comercial.

El énfasis actual es un intento por hacer colorantes conteniendo antocianinas más estables. Un considerable énfasis en la investigación ha sido sobre la copigmentación o asociación de antocianinas con ellas mismas o con una serie de otros compuestos tales como flavonoides, polisacáridos, proteínas, taninos y otros compuestos polifenólicos (Francis, 2000).

2.4.1 Secado por Aspersión

Para deshidratar alimentos Mani et al (2002) enuncian diferentes técnicas como el uso de aire caliente, vacío, liofilización y secado por aspersión. Entre ellos, el secado por aspersión es el método más simple y comercialmente usado para transformar una amplia variedad de líquidos alimenticios en forma de polvos. La pulpa o el jugo de frutas pueden ser deshidratados por aspersión añadiendo aditivos. Algunas frutas que se deshidratan por aspersión, son tomates, plátanos, cítricos, duraznos y mangos. También se usa para deshidratar productos lácteos, químicos farmacéuticos finos, plasma sanguíneo, numerosos químicos orgánicos e inorgánicos, polvos cerámicos, detergentes y otros productos (Fikolvá y Mujumdar, 1995).

En cuanto al secado por aspersión, Pegg y Shahidi (1999) señalan que es el método de encapsulación más ampliamente utilizado en la industria de alimentos y es típicamente usado para la preparación de aditivos y sabores secos y estables.

El secado por aspersión se usa para remover agua de una mezcla líquida de libre flujo, transformándolo así en un producto en polvo. El fluido que va a ser secado se atomiza primero bombeándolo a través de un atomizador de boquilla o rotatorio, formando pequeñas gotitas con una gran área superficial. Las gotas entran en contacto inmediatamente con una corriente de aire caliente. El líquido se evapora rápidamente, minimizando el tiempo de contacto y el daño por calor. Las partículas nunca llegarán a temperaturas más altas que la temperatura de bulbo húmedo del aire de secado y su tiempo de residencia es corto, generalmente entre 3 y 30 segundos. Las desventajas incluyen que el tamaño del equipo que se requiere para lograr el secado es muy grande y que los materiales muy aceitosos pueden requerir una preparación especial para remover los niveles excesivos de grasa antes de la atomización (Heldman y Lund, 1992; Fikolvá y Mujumdar, 1995; Ré, 1998; Rahman y Perera, 1999; Büchi Labortechnik AG, 2002).

Como mencionan Jayaraman y Das (1995), las aplicaciones del secado por aspersión a frutas y vegetales están muy limitadas. Los jugos de frutas, pulpas y pastas pueden ser secadas por aspersión con aditivos. Las frutas que han sido secadas por aspersión incluyen tomates, plátano, y en una extensión limitada, frutas cítricas, duraznos y albaricoques.

Mani et al (2002) utilizaron la maltodextrina comercial como agente auxiliar en el secado de pulpa de mango a diferentes proporciones en base a los sólidos

solubles totales, los cuales se determinaron directamente con un refractómetro manual Abbey. Las proporciones de sólidos de pulpa de fruta:maltodextrina fueron 50:50, 55:45 y 60:40 bajo las siguientes condiciones de operación: velocidad de flujo de la alimentación, 22 kg/h; contenido de sólidos en la alimentación, 19%; contenido de sólidos en el producto final, 95%; Flujo de aire, 950 kg de aire seco/h; temperatura de la alimentación, 60°C; temperatura del aire de entrada, 167.3°C y temperatura del aire de salida, 89°C.. Se obtuvo un polvo de libre flujo con las proporciones 50:50 y 55:45. Con la proporción de 60:40 el producto se depositó sobre las paredes del secador y no se produjo polvo. La proporción de 55:45 se consideró la mejor para la producción de mango en polvo. Esta proporción fue comparable con el trabajo de Bhandari et al, citado por Mani et al (2002), quienes encontraron que la relación óptima de sólidos de frutas: maltodextrina en base a sólidos secos para albaricoque, zarzamora y frambuesa era 60:40, 65:35 y 55:45 respectivamente.

2. 4.2 Liofilización

El liofilizado ha sido usado en un número de aplicaciones por muchos años, la mayoría comúnmente en la industria de alimentos y farmacéutica. Hay, sin embargo, muchos otros usos para el proceso incluyendo la estabilización de materiales vivos tales como cultivos microbianos, preservación de especímenes de animales enteros para exposición en museos, la restauración de libros y otros artículos dañados por agua y la concentración y recuperación de productos de reacción.

El liofilizado involucra la remoción de agua u otro solvente de un producto congelado por un proceso llamado sublimación. La sublimación ocurre cuando un líquido congelado pasa directamente al estado gaseoso sin pasar por la fase líquida. En contraste, el secado a temperatura ambiente de la fase líquida, usualmente resulta en cambios en el producto y puede ser deseable solamente para algunos materiales. Sin embargo, en el liofilizado, el material no pasa por la fase líquida y esto permite la preparación de un producto más estable que es más fácil de usar y estético en apariencia.

Las ventajas del liofilizado son obvias. Propiamente, los productos liofilizados no necesitan refrigeración y pueden ser almacenados a temperatura ambiente. Debido al costo del equipo especializado requerido para la liofilización puede ser sustancial. Sin embargo, los ahorros realizados por la estabilización de productos inestables a temperatura ambiente, eliminando la necesidad de refrigeración, es compensado por la inversión en el equipo de liofilización.

Principios del liofilizado

El proceso de liofilización consiste de tres etapas: precongelado, secado primario y secado secundario.

Precongelado: Dado que la liofilización es un cambio de estado de la fase sólida a la fase gaseosa, el material a ser liofilizado debe ser primero adecuadamente precongelado. El método de precongelamiento y la temperatura final del producto congelado puede afectar la capacidad para liofilizar exitosamente el material.

Enfriamientos rápidos producen cristales de hielo pequeños, útil en la preservación de estructuras a ser examinadas microscópicamente, pero resultando un producto que es más difícil de liofilizar. Enfriamientos lentos producen cristales de hielo grandes y menos canales restrictivos en la matriz durante el proceso de secado.

Secado primario: Después del precongelamiento del producto, las condiciones deben de ser establecidas en las cuales el hielo pueda ser removido del producto congelado vía sublimación, resultando un producto seco, estructuralmente intacto. Esto requiere un control muy cuidadoso de dos parámetros, temperatura y presión, involucrados en el sistema de liofilización. La velocidad de sublimación del hielo de un producto congelado depende de la diferencia en vapor de presión del producto comparada con la presión de vapor del colector del hielo. Las moléculas migran de la muestra de presión más alta al área de presión más baja. Dado que la presión de vapor está relacionada con la temperatura, es necesario que la temperatura del producto este más caliente que la temperatura de la trampa de frío (colector de hielo). Esto es extremadamente importante que la temperatura a la cual el producto es liofilizado este balanceada entre la temperatura que mantiene la integridad congelada del producto y la temperatura que maximiza la presión de vapor del producto.

Secado secundario: Después de que el liofilizado primario está completo, y todo el hielo ha sublimado, agua ligada todavía está presente en el producto. El producto aparenta estar seco, pero el contenido de agua residual puede

ser tan alto como 7-8%. Un secado continuo es necesario a una temperatura más caliente para reducir el contenido de humedad residual a valores más óptimos. Este proceso es llamado desorción isotermal donde el agua ligada es desorbida del producto.

El secado secundario es continuado normalmente a una temperatura del producto más alta que la ambiente pero compatible con la sensibilidad del producto. Todas las otras condiciones, tales como presión y temperatura del colector, permanecen constantes. Debido a que el proceso es desorptivo, el vacío debe estar tan bajo como sea posible (no presión elevada) y la temperatura del colector tan fría como pueda ser alcanzada. El secado secundario es usualmente llevado a cabo en aproximadamente 1/3 a 1/2 del tiempo requerido para el secado primario (Labconco, 1998).

2.4.3 Adición de Antocianinas en Alimentos

Actualmente, una de las principales aplicaciones de la enocianina (antocianina), un término genérico para colorantes de las uvas, fue para impartir el color al vino. En los Estados Unidos, las bebidas de frutas son el más grande mercado. Los colorantes que contienen antocianinas han sido sugeridos para bebidas, gelatinas, mermeladas, helados, yogur, postres de gelatina, frutas enlatadas, salsa de frutas, dulces y confitería, y rellenos para panadería (Francis, 2000).

La estabilidad de antocianinas de uva adicionadas a una bebida carbonatada fue probada, donde se estudió la estabilidad de estos pigmentos en una

bebida no alcohólica carbonatada para lo cual las antocianinas fueron añadidas como colorantes (Palamadis y Markakis, 1975).

Los pigmentos de uva concord como colorantes para bebidas y postres de gelatina fueron estudiados, donde el estudio fue iniciado en un intento por definir las características de estabilidad de las antocianinas de uva concord en productos alimenticios (Clydesdale et al, 1978).

La extracción y uso de pigmentos del grano de maíz (*Zea mays* L.) como colorantes en yogur fue estudiada, donde se determinó el uso potencial de las antocianinas extraídas de granos de maíz, como colorantes en yogur (Salinas et al, 2005). Estos autores reportan que las antocianinas extraídas de la fracción pericarpio-capa de aleurona fueron añadidas a un yogur natural comercial, en concentración de 1 mg/100 g de yogur.

Las antocianinas de arándano y uva como colorantes en cereales para desayuno fue estudiada, donde se evaluó la estabilidad y aceptabilidad de antocianinas de arándano y de uva en cereales extruidos (Camire et al, 2002). Estos autores reportan que los cereales para desayuno parecen ser un alimento deseable para la fortificación de antocianinas. A pesar de la pérdida durante la extrusión, cantidades suficientes de colorantes permanecen para producir un color púrpura. Las condiciones de extrusión deben ser optimizadas para minimizar la pérdida del pigmento, y adecuar el azúcar que debe ser adicionada para reducir la acidez. Otras fuentes de

estos pigmentos pueden demostrar ser más estables durante el procesamiento.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR, ÁREA Y PERIODO DE ESTUDIO

El proyecto de investigación se llevó cabo en el periodo comprendido de septiembre del 2003 a diciembre del 2006, en dos instituciones. En la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el taller de alimentos y en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango donde se caracterizó y valoró la estabilidad del pigmento del higo bajo diferentes condiciones de almacenamiento, además se deshidrataron extractos acuosos de la cáscara del higo y finalmente estos se adicionaron a un yogur natural como colorante evaluando la estabilidad en almacenamiento en frío por medio del color.

3.2 IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Para caracterizar y evaluar la estabilidad del pigmento del higo, así como deshidratar extractos acuosos de la cáscara se trabajó con higo (*Ficus carica*) variedad misión cultivado en el Ejido Álvaro Obregón, Municipio de Lerdo, Durango.

3.3 CONCEPTUALIZACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Las variables involucradas en este trabajo se definen enseguida:

Illuminación. Es el tipo de iluminación donde fueron almacenados los extractos metanólicos de la cáscara de higo (Tsimidou y Tsatsaroni, 1993;

Giusti y Wrolstad, 1996; Baublis et al, 1994). Los tipos de iluminación usadas fueron luz y oscuridad.

pH. Es el valor del pH de los extractos metanólicos de la cáscara de higo, ajustado con soluciones estandarizadas de NaOH y HCl y medido con un potenciómetro ThermoOrion 210 (Tsimidou y Tsatsaroni, 1993; Giusti y Wrolstad, 1996; Baublis et al, 1994). Los valores de pH utilizados fueron 3, 6 y 8.

Temperatura de almacenamiento. Se refiere a la temperatura a la cual fueron almacenados los extractos metanólicos de la cáscara de higo (Tsimidou y Tsatsaroni, 1993; Giusti y Wrolstad, 1996; Baublis et al, 1994). Las temperaturas empleadas fueron 4, 25, 40 y 60°C.

Color. Medida del cambio de color total de los extractos metanólicos en términos de luminosidad, matiz y cromaticidad del yogur adicionado con pigmento obtenido de la cáscara de higo, a través del colorímetro Minolta CR-300 mediante el sistema CIELab. La luminosidad es expresada por el parámetro L, y la cromaticidad y el matiz, por los parámetros a* y b* (Minolta, 2003).

Cambio de color total. Es el cambio de color dado por la diferencia aritmética de la luminosidad y los parámetros a* y b* al inicio y al final del almacenamiento de los extractos metanólicos.

Se calcula $\Delta E = \sqrt{(L_0-L_1)^2 + (a_0-a_1)^2 + (b_0-b_1)^2}$

Matiz. Es el tono (hue) del yogur adicionado con pigmento de cáscara de higo que se calcula $H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, cuando $a^* > 0$ y $b^* \geq 0$. De acuerdo con el ángulo calculado los colores son: $0^\circ =$ rojo profundo, $90^\circ =$ amarillo, $180^\circ =$ verde y $270^\circ =$ azul.

Cromaticidad. Indica la pureza del color (a valores más altos, colores más

vivos). Se calcula: Cromaticidad
$$= \frac{\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}}{a}$$

Luminosidad. Indica luminosidad u oscuridad (a valores mayores más luminoso el color) y se expresa con el parámetro L.

Contenido de pigmento antociánico monomérico (CPAM). Es la cantidad de pigmento antociánico monomérico presente en los extractos metanólicos de la cáscara de higo que sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH manifestado por espectros de absorbancia diferentes, donde la forma oxonium coloreada predomina a pH 1.0 y la forma hemiketal decolorada a pH 4.5 (Giusti-Wrolstad, 2000).

Análisis de antocianinas por HPLC. Es la identificación de antocianinas en la cáscara de higo por medio de la cromatografía líquida de alta resolución, usando una mezcla de estándares de referencia (Rivas, 1989 y GarcíaViguera et al, 1997).

Concentración de pigmento. Es la cantidad de pigmento en polvo obtenido por aspersion y liofilización (Cai y Corke, 2000), adicionado al yogur natural

como colorante (Salinas et al, 2005). Las concentraciones usadas fueron 0.8, 1.0 y 1.2 g.

Nivel de agrado. Se refiere a la valoración del grado de satisfacción que los consumidores le confieren a un alimento determinado, en este caso yogur de fresa comercial y yogur natural adicionado con pigmento en polvo obtenido de la cáscara de higo, utilizando una prueba de ordenamiento y de preferencia en base al color.

Las variables y sus indicadores se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Operacionalización de Variables

Variables	Indicadores	Alternativas de respuesta	Escala de medición
Iluminación	Tipo	Luz y oscuridad	Nominal
pH	Potencial de hidrógeno	3, 6 y 8	Intervalo
Temperatura	°C	4, 25, 40 y 60	Intervalo
Concentración de pigmento	g	0.8, 1.0 y 1.2	Intervalo
Color	Cambio de color Luminosidad Matiz (H°) Cromaticidad	2.18 – 9.99 37.87 - 45.76 8.55 – 26.14 3.23 – 6.10	Intervalo
Contenido de Pigmento Antociánico Monomérico	mg/L	3.61 – 222.32	Intervalo
Análisis de antocianinas por HPLC	Cianidina g/g muestra	0.0559 – 0.6505	Intervalo
Nivel de agrado	Gusto del consumidor en base al color	Prueba de ordenamiento Prueba de preferencia	Ordinal

3.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO Y TÉCNICAS DE ANÁLISIS

El estudio se llevó a cabo en tres etapas, en la primera se trabajó con la caracterización de los extractos, la segunda con la estabilidad térmica utilizando 21 tratamientos y en la tercera con la estabilidad tecnológica de los pigmentos usando tres tratamientos y un control.

Los higos *Ficus carica* variedad Misión fueron adquiridos directamente de la planta procesadora de higo, ubicada en Álvaro Obregón, Mpio. de Lerdo, Dgo. Los higos fueron cosechados en un estado de maduración industrial. Los lotes de higos frescos fueron almacenados en un cuarto frío de 0-5°C conforme llegaban de la planta procesadora. Posteriormente, se midió el color por medio del método del triestímulo (L^* , a^* y b^*), con un colorímetro Minolta CR-300. Después se separó la cáscara y la pulpa del tejido manualmente con un cuchillo. Una vez separadas las cáscaras, se almacenaron en un congelador a -20°C aproximadamente en bolsas de plástico hasta el momento de ser analizadas. Enseguida las cáscaras de higo congeladas se liofilizaron usando un liofilizador Labconco Freezone-7753510. Un proceso no-continuo de extracción fue empleado durante el experimento. El proceso se basó en hacer una comparación obteniendo un extracto metanólico (metanol:agua:ácido fórmico) y un extracto acetónico (concentrándolo a vacío y resuspendiéndolo en agua acidificada), a partir de la cáscara de higo congelada, donde posteriormente se hizo un barrido a diferentes longitudes de onda en un espectrofotómetro HACH DR/4000V en la región visible (510, 515, 520, 535, 546 y 550 nm, respectivamente) con el fin de determinar cuál de estos dos métodos extraía mejor. Después de lo anterior se utilizó el extracto metanólico para llevar a cabo un barrido de pH

y color (titulando con ácido y base), usando cáscara de higo congelada y liofilizada.

Previo al análisis de antocianinas por HPLC, se midió el CPAM de cada una de las muestras por duplicado, para finalmente llevar a cabo el análisis de antocianinas por HPLC de muestras congeladas y liofilizadas (no hidrolizadas e hidrolizadas), como se puede observar en la Figura 9.

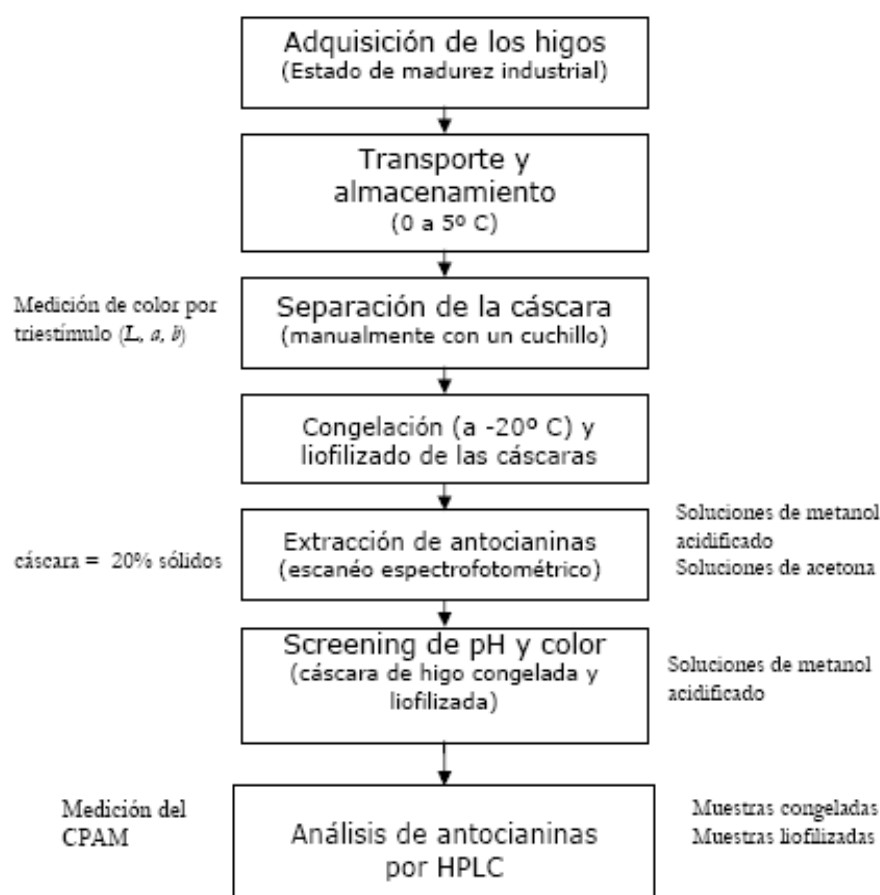


Figura 9. Diagrama de Flujo de la Caracterización de los Pigmentos de la Cáscara de Higo.

Para la segunda etapa, el proceso se basó en obtener extractos metanólicos (metanol:agua:ácido fórmico) a partir de la cáscara de higo congelada, donde posteriormente se analizó la estabilidad de tales extractos bajo diferentes condiciones de almacenamiento como son: iluminación/obscuridad, diferentes valores de pH (3, 6, 8) y diferentes temperaturas (4, 25, 40 y 60°C). Por medio de la medición de cambio de color total (L, a y b) la estabilidad fue probada a diferentes tiempos de almacenamiento (0-14 días), como se indica en la Figura 10.

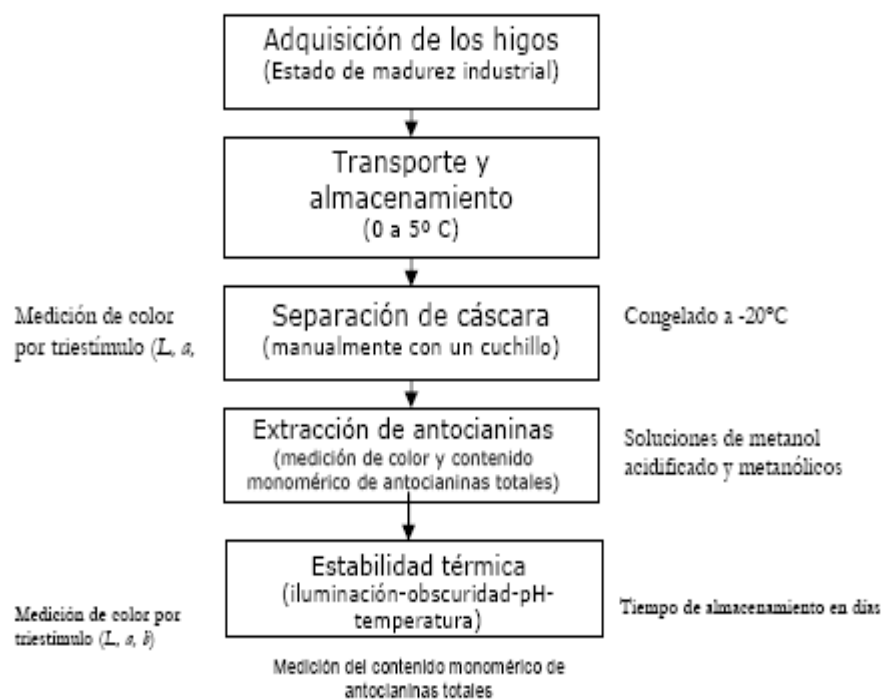


Figura 10. Diagrama de Flujo de la Estabilidad Térmica de los Pigmentos de la Cáscara de Higo.

Después de lo anterior, se realizaron pruebas adicionales, manejando otras condiciones de almacenamiento y valorando otros parámetros. El proceso se basó en obtener extractos metanólicos acidificados (metanol:agua:ácido

fórmico) y metanólicos a partir de la cáscara de higo congelada donde se nuevamente se analizó la estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento como son: iluminación-obscuridad, a diferentes valores de pH (3, 6, 8) y a diferentes temperaturas (4 y 25°C). Por medio de la medición del color (L, a y b) y el Contenido de Pigmento Antociánico Monomérico (CPAM), la estabilidad fue probada a diferentes tiempos de almacenamiento (0-14 días).

Para la etapa final del proyecto, el proceso se basó en obtener extractos acuosos a partir de la cáscara de higo congelada, donde posteriormente se ajustó 20% de sólidos con maltodextrina 30 DE para encapsular el extracto y estabilizar el pigmento por medio de secado por aspersion y liofilización. El extracto acuoso y el encapsulante se alimentaron al secador por aspersion experimental marca Buchi modelo B-191, donde se seleccionó la temperatura del aire de entrada, cuyo valor fue de 180 ± 2 °C. La velocidad de alimentación se ajustó de manera que la temperatura máxima del aire a la salida fuera de 92-96°C. El procedimiento para la operación del secador se detalla en el Apéndice A. Para el liofilizado de los extractos, previamente se precongelaron en un ultracongelador y después se introdujeron en el portamuestras del liofilizador. La temperatura de la cámara de congelamiento fue de -44°C y el vacío del sistema fue de 596×10^{-3} Mbar. Una vez obtenido el polvo de cáscara de higo en cada proceso, se colocó en frascos de vidrio y se cubrieron con papel aluminio adentro de una bolsa de polietileno. Luego se almacenaron en un lugar fresco y seco, debidamente etiquetados.

Previamente, se caracterizaron en base a color y pH, tres marcas comerciales de yogur sabor fresa para tener una referencia con respecto al color de estos productos. Una vez estabilizado el pigmento (secado por aspersion y liofilizado) se adicionó a un yogur natural en diferentes concentraciones (0.8, 1.0 y 1.2 g/50 g de yogur, respectivamente). Primero se pesaron las cantidades correspondientes del polvo obtenido de cada proceso, luego se midieron 10 mL de una solución de ácido láctico al 3% y se mezcló junto con el polvo hasta su incorporación total (color rojo).

Después, esta mezcla se adicionó a 50 g de yogur natural y se agitó manualmente hasta su disolución. Finalmente, se evaluó la estabilidad del pigmento midiendo el color (Luminosidad, hue y cromaticidad) y el pH cada 5 días durante 25 días de almacenamiento bajo refrigeración a $4^{\circ}\text{C} \pm 2$ en oscuridad. También, se realizaron pruebas sensoriales de ordenamiento y de preferencia en base al color del yogur comercial (sabor fresa) y el adicionado con pigmento en polvo de la cáscara de higo obtenido por aspersion, como se puede observar en la Figura 11.

A continuación se describen las técnicas de análisis para la medición de cada una de las variables dependientes.

Medición del color

Extractos metanólicos de la cáscara de higo. Se midió por triplicado con un colorímetro Minolta CR-300 sobre la superficie de 10 mL de extracto en un vaso de precipitado, calculando la media de los parámetros L, a^* y b^* . Después, se calculó el cambio de color total.

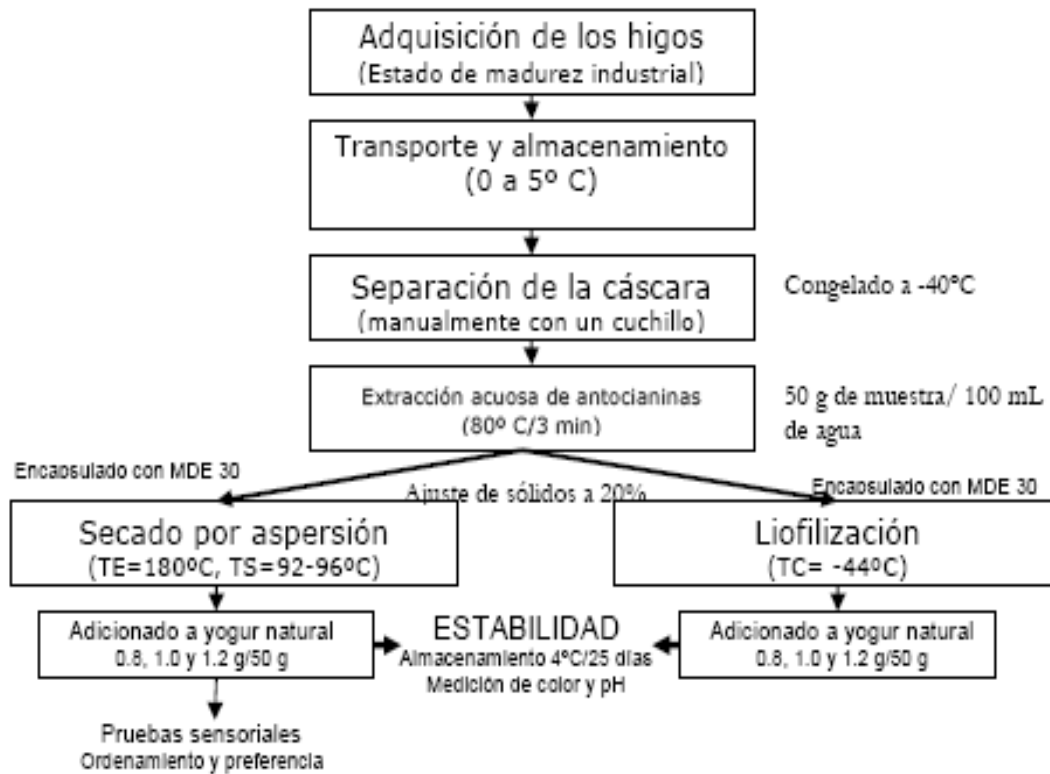


Figura 11. Diagrama de Flujo de la Estabilidad Tecnológica de los Pigmentos de la Cáscara de Higo y su Adición como Colorante a un Yogur Natural.

Yogur natural adicionado con pigmento en polvo. Se midió por triplicado con un colorímetro Minolta CR-300 sobre la superficie de 50 g de yogur natural y adicionado con pigmento en polvo obtenido por aspersión y liofilizado en un vaso de plástico, calculando la media de los parámetros L, a* y b*. Después, se calculó el matiz y la cromaticidad.

Contenido de Pigmento Antocianico Monomérico

Según Giusti y Wrolstad (2000), los pigmentos antocianos sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH manifestado por cambios en los espectros de absorción. La forma oxonium coloreada predomina a pH 1.0 y la forma hemiketal decolorada a pH 4.5. El

método de diferencial de pH esta basado en esta reacción, permitiendo mediciones rápidas y exactas de antocianinas totales, aún en la presencia de pigmentos polimerizados degradados y otros compuestos de interferencia.

Una vez obtenidos los extractos, se determinó el factor de dilución apropiado por dilución con un búfer de KCl, pH 1.0, hasta que la absorbancia del extracto a la $\lambda_{\text{vis-max}}$ esté dentro del rango lineal del espectrofotómetro (menos de 1.2). Se dividió el volumen final del extracto entre el volumen inicial para obtener el factor de dilución. El espectrofotómetro debe ser calibrado a cero con agua destilada. Enseguida, preparar dos diluciones del extracto, una con búfer de KCl, pH 1.0 y otra con búfer de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, pH 4.5, diluyendo con el factor de dilución previamente determinado. Se permitió que estas diluciones se equilibren por 15 min. Después de este tiempo, medir la absorbancia de cada dilución a la $\lambda_{\text{vis-max}}$ y a 700 nm. Se calculó la absorbancia de la muestra diluida (A) como sigue:

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

Calcular la concentración de pigmento antociánico monomérico en la muestra original usando la siguiente formula:

$$\text{Pigmento antociánico monomérico (mg/L)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

donde PM es el peso molecular, FD factor de dilución y ϵ es la absortividad molar.

Extracción de antocianinas

Se utilizó el método propuesto por Kalt y MacDonald (2002), con algunas modificaciones. Se usó 1.2 g de muestra de cáscara de higo congelada homogenizada en un molino para especies Krups-203 y 0.800 g de muestra de cáscara de higo liofilizada homogenizada de igual manera. Enseguida, cada una de las muestras se colocó en un vaso de vidrio para licuadora (previamente enfriado) conteniendo éste 10 mL de una solución fría de metanol acidificado (MeOH:H₂O:ácido fórmico; 70:28:2). La mezcla se molió en una licuadora (Osterizer) por espacio de 10 min a una velocidad de 4. Después de la molienda, la mezcla obtenida se filtra a vacío. Finalmente, el filtrado se deja reposar por 1 hora en la oscuridad en viales de color ámbar. Una vez transcurrido este tiempo, se midió el color triestímulo (L, a* y b*), el pH y el contenido de pigmento antociánico monomérico (CPAM) por el método de diferencial de pH según Giusti y Wrosltad (2000). 1 mL de cada extracto fue adsorbido en un cartucho Sep-Pak C-18 (Waters) y lavado con 3 mL de agua con ácido fórmico 5% y después eluído con 4 mL de ácido clorhídrico 0.01% en metanol, esto se repitió dos veces hasta completar 8 mL de extracto purificado. El extracto metanólico fue concentrado con una corriente de nitrógeno a baño maría hasta obtener 3 mL_≈, los cuales fueron ajustados con metanol acidificado. Este extracto concentrado fue hidrolizado tomando 0.5 mL de este mezclándolo con 1.5 mL de HCl 6 M y 2 mL de ácido fórmico 25% en metanol, después se colocó en un baño maría en ebullición por una hora. El extracto hidrolizado se purificó nuevamente donde el volumen obtenido fue de 2 mL y este se concentró como se hizo anteriormente hasta un volumen final de 1 mL _≈. Este volumen se ajustó a 4

mL con metanol al 100% y se conservó en un vial ámbar en refrigeración para su posterior inyección en el HPLC.

Análisis de antocianinas por HPLC

Para la identificación de antocianinas de los extractos metanólicos acidificados de cáscara de higo congelada (sin hidrolizar e hidrolizados) y liofilizada (sin hidrolizar e hidrolizados), los extractos metanólicos fueron inyectados en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Waters con detector PDA modelo 2996, sistema de bomba binario modelo 1525, con automuestreador modelo 717 plus. Cada muestra fue analizada en una columna simetry C18 de 4.6 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 micras, usando una fase móvil de agua (fase A) y acetonitrilo (fase B). La elución fue desarrollada a 1 mL min⁻¹ usando un gradiente de inicio con 0% de fase B, incrementando a 30% B a 30 min y nuevamente a 0% B a los 35 min. La detección fue llevada a cabo a un rango de 210-650 nm.

La identificación de antocianinas se basó en el tiempo de retención de la mezcla de cinco estándares conocidos de la marca Sigma. Los cromatogramas correspondientes se presentan en el Apéndice B.

Para cada unidad experimental, se extrajeron las antocianinas de la cáscara de higo y se inyectaron al HPLC. Este procedimiento se hizo por duplicado. Para determinar la concentración de las antocianinas en cada caso, se comparó el área del pico de la muestra con el área del pico del estándar; además se hicieron los cálculos pertinentes para reportarla en mg /100 g de muestra.

Nivel de agrado

Para llevar a cabo esta prueba, se eligió el polvo de cáscara de higo obtenido por aspersión por presentar valores más altos de matiz y cromaticidad con respecto al polvo liofilizado. Este polvo adicionado al yogur natural en las concentraciones establecidas como se mencionó anteriormente así como tres yogures comerciales sabor fresa (sin trozos de fresa) fueron los tratamientos utilizados en la prueba de ordenamiento por color. Para la prueba de preferencia por color se usaron muestras de dos tratamientos, uno el yogur adicionado y el otro del comercial marca C.

Las claves utilizadas para el proceso de medición incluidas en la hoja de respuestas se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos y sus Claves Empleados en la Evaluación del Nivel de Agrado del Yogur Adicionado.

Tratamiento	Yogur adicionado	Yogur comercial A	Yogur comercial B	Yogur comercial C
Clave	0661	9707	5947	6224

En la evaluación del nivel de agrado participaron 30 jueces consumidores, cuyas edades se encuentran entre 18 y 25 años, quienes declararon su opinión utilizando la hoja de respuestas que se muestra en la Figura 12.

“Prueba de Ordenamiento”

Nombre: _____ Fecha: _____

Producto: Yogur

Observe las 4 muestras marcadas con claves y acomódelas de menor a mayor intensidad de color.

Escriba el número de la clave

de cada muestra,
según corresponda

Menor intensidad de color _____

Mayor intensidad de color _____

Comentarios

Muchas Gracias

“Prueba de Preferencia”

Nombre: _____ Fecha: _____

Observe las 2 muestras que se le presentan.
Primero observe la muestra marcada con _____
y después la muestra _____

INDIQUE CUAL DE LAS DOS MUESTRAS
PREFIERE USTED POR SU COLOR

PREFIERO LA MUESTRA

Comentarios

Muchas Gracias

Figura 12. Hoja de Respuestas para la Evaluación del Nivel de Agrado del Yogur Adicionado con Polvo de Cáscara de higo.

3.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS DE DATOS

Para la valoración de la estabilidad de los extractos metanólicos de cáscara de higo, se aplicó un diseño trifactorial con dos niveles para la iluminación, tres niveles para el pH y cuatro niveles para la temperatura. Se hicieron tres repeticiones por cada tratamiento. En la Tabla 4 se muestra el esquema del diseño experimental y el orden en que se procesaron las muestras. Para la estabilidad del polvo de cáscara de higo adicionado a un yogur natural, se

aplicó un diseño unifactorial con tres niveles para la concentración de pigmento. Se hicieron tres repeticiones por cada tratamiento.

En la estabilidad del yogur adicionado se usó un experimento unifactorial con tres niveles para la concentración de pigmento, tanto para el polvo obtenido por aspersión como para el obtenido por liofilización. Se hicieron 12 tratamientos en el orden que se presenta en la Tabla 5.

Tabla 4. Diseño Experimental de la Estabilidad Térmica y Orden de Proceso de las Unidades Experimentales.

Iluminación	Luz			Oscuridad		
pH	3	6	8	3	6	8
Temp.	25,40,60	25,40,60	25,40,60	4,25,40,60	4,25,40,60	4,25,40,60
	3	1	8	14	10	17
Repet.	2	16	6	11	9	4
	12	13	7	15	18	5

Para analizar el cambio de color (L, a y b) y el CPAM en los extractos metanólicos bajo almacenamiento térmico, los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y para la comparación de medias, la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Se usó un nivel de significancia de 0.05.

Tabla 5. Diseño Experimental de la Estabilidad Bajo Frío del Yogur Adicionado con Polvo Obtenido de Cáscara de Higo.

Concentración de pigmento (g)	Estabilidad bajo refrigeración(días)					
	0	5	10	15	20	25
Control						
ASP 0.8						
ASP 1.0						
ASP 1.2						
LIO 0.8						
LIO 1.0						
LIO 1.2						

Para analizar el color (L, matiz y cromaticidad) y el pH bajo almacenamiento refrigerado, los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y para la comparación de medias, la prueba de Rangos Múltiples de Duncan. Se usó un nivel de significancia de 0.05.

Para el nivel de agrado se usó el análisis de varianza de datos transformados para la prueba de ordenamiento y para la prueba de preferencia la tabla de significancia para pruebas de dos muestras. Se empleó el programa Statistica versión 4.2.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentan y se discuten los resultados obtenidos en cada una de las etapas mencionadas en el capítulo anterior.

4.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA

Para caracterizar el color del higo fresco, se midió por el método de triestímulo. Los valores promedio se muestran a continuación. Color higo fresco: $L = 27.4$ $a = +2.1$ $b = -1.65$.

Para elegir cual método de extracción de antocianinas era el más idóneo, se compararon los valores de absorbancia (510-550 nm) de los extractos metanólicos acidificados (EMA) y los extractos acetónicos (EA), donde se valoraron, además, diferentes tamaños de muestra. En la Tabla 6 y 7 se muestran los valores promedio y la desviación estándar de los extractos.

Tabla 6. Valores Promedio de Absorbancia de EMA de Antocianinas en la Región Visible a Diferentes Tamaños de Muestra.

Tamaño de muestra, g	Longitudes de Onda, λ					
	510	515	520	535	546	550
2	3.006	3.069	3.115	3.016	2.628	2.396
4	3.692	3.736	3.705	3.678	3.476	3.283
6	3.831	3.825	3.788	3.789	3.749	3.683

Media = 3.414, mínimo = 2.3960, máximo = 3.8310, desv. std. = 0.4440

Las soluciones de metanol acidificado fueron efectivas en la extracción de antocianinas de cáscara de higo congelada a diferentes tamaños de muestra, como se puede observar en la Tabla 6., donde la tendencia observada fue que el valor de la absorbancia aumentó conforme se pasó de una onda de longitud pequeña a una más grande, sin embargo al llegar a 520 nm aquí se registraron los valores más altos y a partir de este valor nuevamente descendió el valor de la absorbancia. De la misma manera pasó con el tamaño de muestra. Con lo anterior, se confirma que a mayor tamaño de muestra se extraen mejor las antocianinas y que la mejor lectura se da en 520 nm en la región visible, usando el método de metanol acidificado.

Tabla 7. Valores Promedio de Absorbancia de EA de Antocianinas en la Región Visible a Diferentes Tamaños de Muestra.

Tamaño de muestra, g	Longitudes de Onda, λ					
	510	515	520	535	546	550
2	3.338	3.399	3.402	3.194	2.783	2.488
4	3.646	3.662	3.648	3.512	3.178	3.185
6	3.789	3.786	3.811	3.731	3.511	3.365

Media = 3.4154, mínimo = 2.4880, máximo = 3.8110, desv. std. = 0.3549

A tamaños de muestras superiores a 2 g, se recomiendan soluciones de acetona. Como se puede observar en la Tabla 7, los valores de absorbancia obtenidos de esta corrida experimental son similares aunque ligeramente

Menores a los obtenidos por el método del metanol acidificado, pero con una menor dispersión entre los datos.

De acuerdo al tamaño de muestra, el método de metanol acidificado es más sensible, menos complicado y con menos tiempos de espera que el de la acetona.

Para la extracción de antocianinas de muestras liofilizadas y resuspendidas en agua (MLR) y no resuspendidas en agua (MLNR), los resultados fueron satisfactorios. Posteriormente, se tomaron las lecturas de absorbancia para cada una de las muestras. Los resultados se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Valores Promedio de Absorbancia de EMA en MLNR y MLR en la Región Visible a Diferentes Tamaños de Muestra.

Tamaño de Muestra, mg	Longitudes de Onda, λ					
	510	515	520	535	546	550
MLNR 800	3.635	3.659	3.709	3.660	3.484	3.337
MLR 4000	3.640	3.677	3.686	3.633	3.326	3.110

Media = 3.5463, mínimo = 3.1100, máximo = 3.7090, desv. std = 0.19058

Se puede observar en la Tabla 8 que se obtiene un valor de absorbancia más alto en muestra liofilizada no resuspendida con agua que en muestra liofilizada y resuspendida en agua.

Por otro lado, al ser titulados con el HCl 0.1 N los extractos metanólicos (EM) intensifican su color rojo débil a un rojo más fuerte conforme desciende el valor del pH. Los resultados pueden ser observados en la Tabla 9. De acuerdo con Nollet (1996), en medios fuertemente ácidos (a valores por debajo de 2) las antocianinas existen en su forma coloreada roja como cationes de flavilium. Al

ser titulados con el NaOH 0.1 N, los EM obtenidos de cáscara de higo congelada y liofilizada, disminuyen su color rojo débil y cambia de rojo a azul oscuro con forme aumenta el valor del pH.

Tabla 9. Valores de pH y Color del EM de Antocianinas de Cáscara de Higo Titulado con HCl 0.1 N.

pH	L	a	b
6.98	26.27	-0.30	+0.63
6.10	11.77	+1.07	-0.53
5.56	11.31	+1.67	-0.30
5.12	9.39	+2.01	-0.04
4.58	11.97	+1.58	-0.04
4.17	12.39	+1.17	-0.07
3.60	12.49	+2.24	-0.19
3.09	12.17	+2.26	-0.08
2.59	13.13	+2.20	0.12
2.06	13.67	+2.47	0.009

Según Nolle (1996), comenta que a valores de pH débilmente ácidos, neutros y básicos, el carbinol y las formas de la base quinonoidal dominan al catión flavilium, tanto que el color decrece y cambia de rojo a azul. Tal comportamiento se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores de pH y Color del EM de Antocianinas de Cáscara de Higo Titulado con NaOH 0.1 N.

pH	L	a	b
6.21	12.44	+0.86	-0.64
6.28	13.00	+0.61	-0.71
6.45	12.71	+0.60	-0.64
6.81	12.36	+0.73	-0.71
7.14	12.93	+0.27	-0.60
7.45	12.33	+0.51	-0.69
7.71	12.92	+0.61	-0.67
7.92	13.00	+0.40	-0.69
8.14	13.42	+0.18	-0.56

El CPAM medido por el método de diferencial de pH en cada una de las muestras congeladas y liofilizadas es mostrado en la Tabla 11.

Tabla 11. El CPAM en Cáscara de Higo Congelada y Liofilizada.

Muestra	CPAM, mg/L
Congelada	196.275
Liofilizada	222.325

De acuerdo a los valores promedio observados en la Tabla 11, se puede decir que se obtienen valores más altos del CPAM en muestras liofilizadas que congeladas, esto puede ser debido al estado físico de la muestra donde el

método de conservación utilizado como lo es la liofilización presenta menos daños a nivel molecular de los componentes presentes que el congelado.

Para el análisis por HPLC de antocianinas de cáscara de higo congelada y liofilizada de extractos metanólicos acidificados, los cromatogramas obtenidos se compararon con los de una mezcla de seis estándares de antocianinas. Los cromatogramas para los estándares de delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina pueden verse en el Apéndice B.

Los tiempos de retención y el área del pico para cada uno de ellos son: delphinidina-17.044 y 0.048 UA, cianidina-18.733 y 0.108 UA, petunidina-19.785 y 0.062 UA, pelargonidina-20.591 y 0.114 UA, peonidina-21.661 y 0.098 UA y malvidina-22.392 y 0.056 UA.

En la Figura 10 se muestra el cromatograma para el extracto metanólico acidificado de cáscara de higo de una de las repeticiones de muestra liofilizada hidrolizada; en ella se señala el pico de la antocianina presente que fue la cianidina. Los demás cromatogramas pueden verse en el apéndice C.

El cálculo de la concentración de cianidina se hizo tomando como base la relación entre la concentración conocida del estándar y el área del pico correspondiente; así, conociendo el área del pico en cada muestra, se pudo calcular la concentración respectiva.

En la Tabla 12 se pueden ver los promedios de la concentración de cianidina, en g/g de muestra.

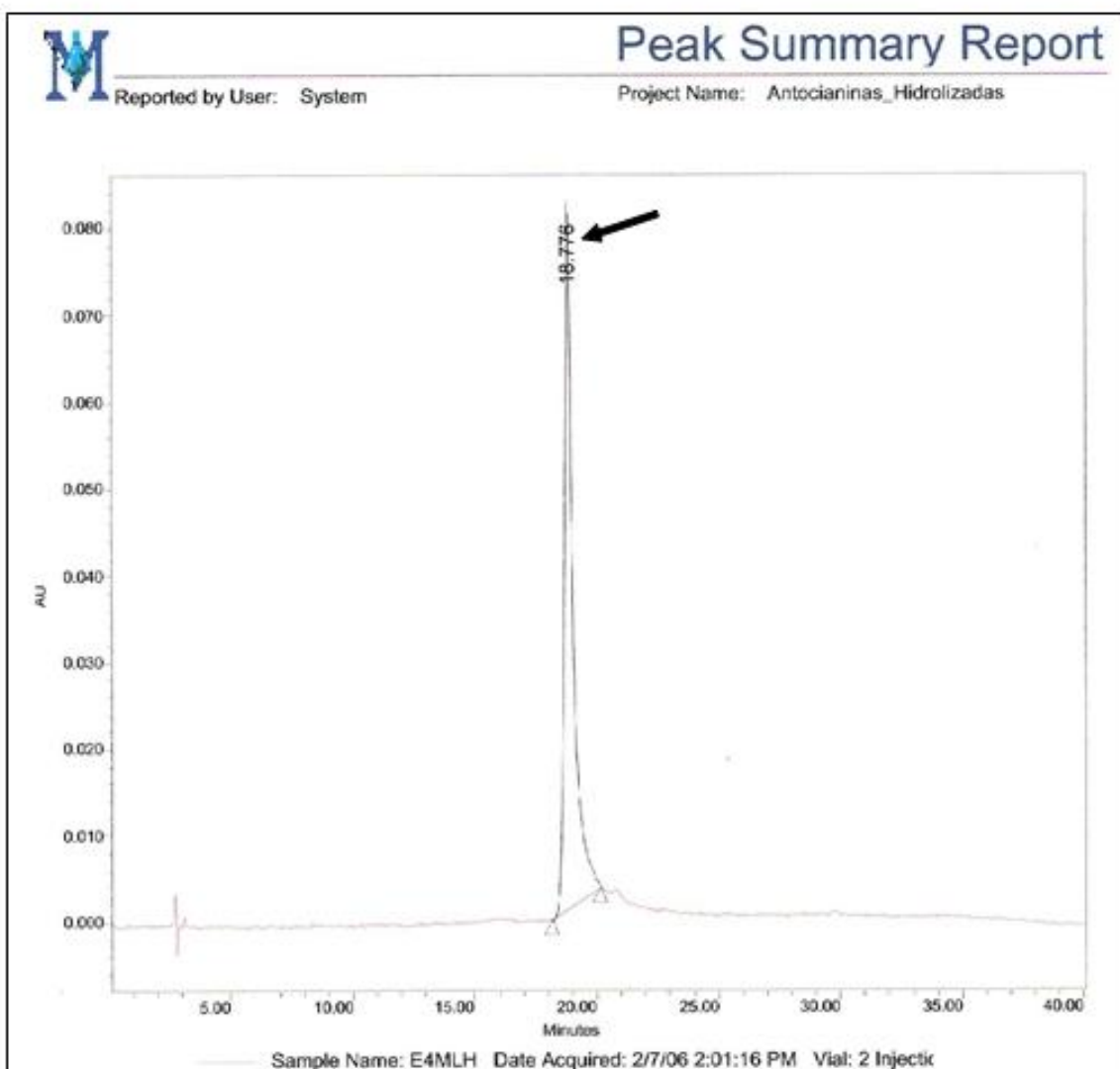


Figura 13. Cromatograma de los EMA de Cáscara de higo.

Tabla 12. Concentración de Cianidina en g/g de Muestra de Cáscara de Higo Congelada y Liofilizada.

Antocianina	Muestra Congelada		Muestra Liofilizada	
	mg/L	g/g	mg/L	g/g
	Media	Media	Media	Media
Cianidina sin hidrolizar	63.90	0.5325	78.07	0.6505
Cianidina hidrolizada	6.71	0.0559	19.52	0.1626

Los datos obtenidos del HPLC demuestran la presencia de la antocianina cianidina en la cáscara de higo, correlacionando este dato con los cromatogramas obtenidos de la mezcla de estándares de antocianinas que fueron analizadas previamente en el cromatógrafo. Además, como se puede observar en la Tabla 12, la concentración de la cianidina fue mayor en las muestras liofilizadas sin hidrolizar que en las congeladas sin hidrolizar. Se observa el mismo comportamiento en las muestras hidrolizadas, aunque la concentración fue más baja en las muestras hidrolizadas que en las no hidrolizadas.

4.2 RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA

Para valorar la estabilidad de los extractos metanólicos acidificados y extractos metanólicos bajo diferentes condiciones de almacenamiento, se midió por la metodología triestímulo (cambio de color total).

El color inicial de los extractos fue medido al tiempo cero de almacenamiento, los valores promedio se pueden observar en la Tabla 13. Donde se demuestra lo reportado por Nollet (1996) que los EMA a valores de pH cercanos a 2 son de un color rojo, como se puede observar con el parámetro a del color. Además, en estos extractos al virar el pH a 6 y 8 el valor del parámetro a decrece significativamente; y por lo tanto también el color rojo.

El cambio de color total valorado a los EMA de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 14.

Tabla 13. Color Inicial de los EMA de Antocianinas al Tiempo

0 de

Almacenamiento.

pH	Temperatura	Color Triestímulo		
		L	a	b
3	25	15.23	+9.30	+4.23
3	40	13.70	+10.45	+4.71
3	60	12.60	+10.21	+6.50
6	25	15.26	+3.85	+2.31
6	40	15.77	+3.34	+1.74
6	60	15.92	+3.30	+1.97
8	25	15.05	+1.61	+1.70
8	40	14.80	+1.54	+1.37
8	60	16.49	+0.59	+2.82

Tabla 14. Cambio de Color Total de los EMA de Antocianinas con

Iluminación a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	25	2.063	3.546	4.474	5.297	6.107	6.643	6.957
3	40	3.584	5.721	7.310	7.922	8.974	9.481	9.952
3	60	5.465	8.496	9.267	9.745	12.555	13.375	16.978
6	25	2.419	2.840	3.078	3.042	3.196	3.136	3.600
6	40	1.711	2.167	2.863	2.924	2.735	2.934	3.263
6	60	2.382	4.317	3.901	3.889	3.568	4.376	4.619
8	25	4.427	3.485	3.183	3.492	3.573	3.796	4.290
8	40	4.591	4.354	4.038	2.966	3.612	4.360	4.853
8	60	2.348	2.364	2.010	2.170	1.534	2.046	2.641

El comportamiento de los EMA de antocianinas es mostrado en la Tabla 14, para el caso del primer diseño (iluminación, pH, temperatura) estadísticamente se encontró que el pH y la interacción pH-temperatura son los que tiene efecto bajo estas condiciones de almacenamiento. Referente al cambio de color total con iluminación, pH 6 y 40°C fue la que mostró menor cambio de color total durante los primeros 4 días de almacenamiento, sin embargo, con iluminación, pH 8 y 60°C mostró menor cambio de color total después de los 4 días hasta el final del almacenamiento. También con iluminación, pH 3 y 25°C mostró menor cambio de color total, aunque este comportamiento se reduce al final del almacenamiento. Con todo lo anterior, se sugiere que las condiciones bajo iluminación pH 3 y 25°C y pH 6 y 60°C pueden ser establecidas para un manejo de extractos de antocianinas bajo condiciones de procesamiento y a pH 8 y 60°C para almacenamiento.

El cambio de color total valorado a los EMA de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 15.

El comportamiento de los EMA de antocianinas es mostrado en la Tabla 15, para el caso del segundo diseño (oscuridad, pH, temperatura) estadísticamente se encontró que el pH tuvo efecto en el cambio de color total a los dos días de almacenamiento; a los 4 y 6 días de almacenamiento no tuvieron efecto significativo en el cambio de color total ni el pH ni la temperatura; la interacción pH-temperatura tuvo efecto a los 8 días de almacenamiento; la temperatura y la interacción pH-temperatura tuvieron efecto a los 10 de almacenamiento; el pH, temperatura y la interacción tuvieron efecto a los 12 días de almacenamiento y por último la temperatura tuvo efecto a los 14 días de almacenamiento.

Referente al cambio de color total bajo estas condiciones de almacenamiento, oscuridad, pH 3 y 4°C, con oscuridad, pH 6 y 4°C y oscuridad, pH 8 y 4°C fueron las que presentaron menor cambio de color total durante el almacenamiento.

Tabla 15. Cambio de Color Total de los EMA de Antocianinas en Oscuridad a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	4	1.816	1.729	5.129	2.340	3.323	2.526	3.196
3	25	1.307	1.868	2.681	3.437	4.619	4.996	6.074
3	40	1.327	5.001	4.392	3.665	3.722	5.408	5.924
3	60	2.893	4.202	5.422	7.057	17.512	17.512	17.512
6	4	1.855	1.803	2.511	2.169	1.965	2.660	2.732
6	25	3.851	3.859	6.625	3.626	4.392	3.673	3.788
6	40	5.057	4.447	4.598	5.414	4.603	5.091	4.683
6	60	4.844	4.632	5.328	5.857	5.718	6.269	20.092
8	4	2.278	2.615	2.403	2.668	2.850	2.056	2.614
8	25	7.282	7.125	6.881	7.106	5.527	6.488	6.793
8	40	5.909	4.919	5.742	6.509	4.914	4.949	5.192
8	60	3.375	3.837	3.039	2.885	8.745	19.925	19.925

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EMA iluminados a un tiempo de almacenamiento de dos días, es mostrado en la Tabla 16.

Como se puede observar en la Tabla 16, se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 6 siendo menor el cambio con respecto a pH 3 y 8. Para el caso de la temperatura, estadísticamente no se encontró diferencia

significativa entre las medias, sin embargo, el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 25°C. Con todo lo anterior, se puede decir que los EMA iluminados con un tiempo de almacenamiento de dos días, las mejores condiciones son pH 6-temperatura 25°C.

Tabla 16. Estabilidad de los EMA con Iluminación (2 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias *		
pH	8	3	6
	3.7892 ^a	3.7048 ^a	2.1712 ^b
Temperatura	60	40	25
	3.3991 ^a	3.2961 ^a	2.9701 ^a

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EMA iluminados a un tiempo de almacenamiento de 14 días, es mostrado en la Tabla 17.

Tabla 17. Estabilidad de los EMA con Iluminación (14 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias *		
pH	3	8	6
	11.296 ^a	3.9285 ^b	3.8275 ^b
Temperatura	60	40	25
	8.0795 ^a	6.0231 ^b	4.9494 ^b

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

Como se puede observar en la Tabla 17, se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 6 y 8 siendo menor el cambio con respecto a pH

3. Para el caso de la temperatura, se encontró diferencia significativa para temperatura 25 y 40°C, sin embargo, el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 25°C. Con todo lo anterior, podemos corroborar que los EMA iluminados con un tiempo de almacenamiento de 14 días, nuevamente las mejores condiciones son pH 6-temperatura 25°C.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EMA en oscuridad a un tiempo de almacenamiento de 2 días, es mostrado en la Tabla 18.

Tabla 18. Estabilidad de los EMA en Oscuridad (2 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias *			
pH	8	6	3	
	4.7112 ^a	3.9022 ^b	1.8363 ^b	
Temperatura	25	40	60	4
	4.1471 ^a	4.0982 ^a	3.7043 ^{ab}	1.9832 ^b

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

De acuerdo a la Tabla 18, se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 6 y 3 siendo menor el cambio con respecto a pH 8. Para el caso de la temperatura, se encontró diferencia significativa para temperatura 4°C, donde el valor más bajo para el cambio de color se encontró a esta temperatura. Con lo anterior, se establece que los EMA en oscuridad con un tiempo de almacenamiento de 2 días, presenta las mejores condiciones para su almacenamiento en oscuridad, pH 3 y a una temperatura de 4°C.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EMA en oscuridad a un tiempo de almacenamiento de 14 días, es mostrado en la Tabla 19.

Tabla 19. Estabilidad de los EMA en Oscuridad (14 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias*			
pH	8	3	6	
	8.6317 ^a	8.1770 ^a	7.8242 ^a	
Temperatura	60	25	40	4
	19.177 ^a	5.5520 ^b	5.2671 ^b	2.8477 ^c

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

Se puede observar en la Tabla 19, que no se encontró diferencia significativa para el cambio de color en el pH, sin embargo, el menor cambio se presentó en pH 6. Para el caso de la temperatura, se encontró diferencia significativa para temperatura 4, 25 y 40°C, donde el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 4°C. Con lo anterior, se establece que los EMA en oscuridad con un tiempo de almacenamiento de 14 días, presenta las mejores condiciones para su almacenamiento en oscuridad, pH 6 y a una temperatura de 4°C. En forma general, los EMA almacenados en oscuridad a un pH 3 y a una temperatura de 4°C son las mejores condiciones de almacenamiento.

La comparación por medio de una prueba de t student de los tratamientos iluminados con respecto a los oscuros se puede observar en la Tabla 20.

Tabla 20. Prueba de t Student de los Tratamientos de EMA Iluminados y Oscuros.

Tratamiento	Cambio de color	
	2	14
Iluminados	3.2217 ^a	6.35 ^a
Oscuros	3.4832 ^a	8.21 ^a
	p=0.643	p=0.225

De acuerdo con la Tabla 20, no existe diferencia estadística entre los tratamientos iluminados y oscuros a los dos días de almacenamiento; sin embargo, a los 14 días de almacenamiento los tratamientos iluminados son los que presentan menor cambio de color, aunque de forma visual no se observe.

Por otra parte, se obtuvieron extractos metanólicos (EM) sin acidificar de la cáscara de higo, el color inicial de los extractos metanólicos fue medido al tiempo cero de almacenamiento, los valores promedio se pueden observar en la Tabla 21, donde se demuestra y corrobora nuevamente el mismo comportamiento reportado en la Tabla 13.

El cambio de color total valorado a los EM de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 22, bajo estas condiciones de iluminación, pH y temperatura estadísticamente se encontró que el pH y la temperatura son los que tienen efecto bajo estas condiciones de almacenamiento. Referente al cambio de color total con iluminación, pH 3 y 25°C, fue la que mostró menor cambio de color total durante los primeros 10 días de almacenamiento, sin embargo, la condición 4

(iluminación, pH 6, 25°C) mostró menor cambio de color total entre los 10 y 14 días de almacenamiento. En base a lo anterior, se sugiere que bajo iluminación, pH 3 y 25°C, y pH 6 y 25°C, pueden ser establecidas para un manejo de extractos de antocianinas bajo condiciones de procesamiento.

Tabla 21. Color Inicial de los EM de Antocianinas al Tiempo 0 de Almacenamiento.

pH	Temperatura	Color Triestímulo		
		L	a	b
3	25	11.47	+9.11	+4.22
3	40	10.13	+8.63	+3.67
3	60	10.95	+9.02	+3.71
6	25	13.13	+4.56	+2.05
6	40	11.62	+5.24	+2.43
6	60	11.02	+5.01	+2.24
8	25	12.72	+0.94	+2.57
8	40	9.51	+1.99	+0.91
8	60	11.14	+1.4	+2.22

El cambio de color total valorado a los EM de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 23.

El comportamiento de los EM de antocianinas es mostrado en la Tabla 23, bajo estas condiciones de oscuridad, pH y temperatura estadísticamente se encontró que el pH, la temperatura y la interacción pH-temperatura son los que tiene efecto bajo estas condiciones de almacenamiento.

Tabla 22. Cambio de Color Total de los EM de Antocianinas con Iluminación a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	25	0.747	1.548	1.450	1.671	2.951	3.435	4.328
3	40	1.534	1.873	2.884	3.161	3.555	4.137	4.629
3	60	2.114	3.073	5.960	6.980	11.323	11.573	14.673
6	25	1.812	1.523	2.236	2.281	2.827	2.975	4.298
6	40	1.744	1.635	2.766	3.019	3.036	4.510	3.575
6	60	2.493	3.978	4.898	4.932	7.360	7.173	10.101
8	25	1.787	2.285	2.884	3.743	3.422	3.947	3.394
8	40	2.605	3.137	4.357	4.446	4.549	5.443	5.049
8	60	4.858	5.116	5.678	5.070	10.317	10.063	9.911

Referente al cambio de color total bajo oscuridad, pH 3 y 4°C fue la que mostró menor cambio de color total durante 12 días de almacenamiento, sin embargo, la condición oscuridad, pH 6 y 25°C mostró menor cambio de color total al final del almacenamiento. En base a lo anterior, se sugiere que el almacenamiento bajo oscuridad, pH 3 y 4°C, y pH 6 y 25°C, pueden ser establecidas para un manejo de extractos de antocianinas bajo condiciones de procesamiento.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EM iluminados a un tiempo de almacenamiento de 2 días, es mostrado en la Tabla 24.

Tabla 23. Cambio de Color Total de los EM de Antocianinas en Oscuridad a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	4	0.425	0.929	0.863	0.891	1.268	1.078	1.552
3	25	2.130	1.246	2.311	1.968	1.838	1.421	1.442
3	40	4.725	6.255	6.195	5.744	5.269	5.458	5.122
3	60	1.941	3.450	5.496	7.826	12.101	14.490	14.490
6	4	1.596	1.354	1.417	1.226	1.842	1.799	1.885
6	25	2.145	1.254	1.385	1.078	1.529	1.359	1.182
6	40	5.340	4.579	4.555	3.026	2.304	2.125	6.366
6	60	1.841	1.341	2.105	6.628	10.297	10.533	10.442
8	4	1.080	1.259	1.186	1.255	1.560	1.438	1.877
8	25	1.188	1.380	1.479	1.614	1.491	1.312	1.476
8	40	2.873	2.446	2.166	1.945	2.433	1.650	2.728
8	60	2.802	3.233	2.792	3.768	3.179	4.447	4.001

Tabla 24. Estabilidad de los EM con Iluminación (2 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias *		
pH	8	6	3
	3.0841 ^a	2.0165 ^b	1.4656 ^b
Temperatura	60	40	25
	3.1555 ^a	1.9615 ^b	1.4493 ^b

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

Se puede observar en la Tabla 24, se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 6 y 3 siendo menor el cambio con respecto a pH 8. Para

el caso de la temperatura, estadísticamente se encontró diferencia significativa para temperatura 25 y 40°C, sin embargo, el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 25°C. Se puede establecer que los EM iluminados con un tiempo de almacenamiento de dos días, las mejores condiciones son pH 3-temperatura 25°C.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EM iluminados a un tiempo de almacenamiento de 14 días, es mostrado en la Tabla 25.

Tabla 25. Estabilidad de los EM con Iluminación (14 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias*		
pH	3	6	8
	7.8771 ^a	6.1185 ^a	5.9918 ^a
Temperatura	60	40	25
	11.562 ^a	4.4180 ^b	4.0073 ^b

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

De acuerdo con la Tabla 25, no se encontró diferencia significativa para el cambio de color en el pH. Para el caso de la temperatura, estadísticamente se encontró diferencia significativa para temperatura 25 y 40°C, sin embargo, el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 25°C. En base a lo anterior, los EM iluminados con un tiempo de almacenamiento de 14 días, donde las mejores condiciones son pH 8-temperatura 25°C.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EM en oscuridad a un tiempo de almacenamiento de dos días, es mostrado en la Tabla 26.

Tabla 26. Estabilidad de los EM en Oscuridad (2 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias*			
	6	3	8	
pH	2.73102 ^a	2.3034 ^b	1.9861 ^b	
Temperatura	40	60	25	4
	4.3096 ^a	2.1954 ^b	1.8214 ^{bc}	1.0344 ^d

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

Se puede observar en la Tabla 26, que se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 3 y 8, siendo menor el cambio con respecto a pH 6. Para el caso de la temperatura, se encontró diferencia significativa para temperatura 4, 25 y 60°C, donde el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 4°C. Con lo anterior, se establece que los EM en oscuridad con un tiempo de almacenamiento de 2 días, presenta las mejores condiciones para su almacenamiento en oscuridad, pH 8 y a una temperatura de 4°C.

La prueba de rangos múltiples de Duncan para el cambio de color de EM en oscuridad a un tiempo de almacenamiento de 14 días, es mostrado en la Tabla 27.

Tabla 27. Estabilidad de los EM en Oscuridad (14 días). Prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Fuente de variación	Valor de las medias*			
pH	3	6	8	
	5.6519 ^a	4.9694 ^{ab}	2.5209 ^b	
Temperatura	60	40	4	25
	9.6452 ^a	4.7393 ^b	1.7717 ^c	1.3609 ^c

* medias con diferente letra son diferentes significativamente

De acuerdo a la Tabla 27, se encontró diferencia significativa para el cambio de color en pH 6 y 8, siendo menor el cambio con respecto a pH 3. Para el caso de la temperatura, se encontró diferencia significativa para temperatura 4, 25 y 40°C, donde el valor más bajo para el cambio de color se encontró a 25°C. En base a lo anterior, se establece que los EM en oscuridad con un tiempo de almacenamiento de 14 días, presenta las mejores condiciones para su almacenamiento en oscuridad, pH 8 y a una temperatura de 25°C. En forma general, los EM almacenados en oscuridad a un pH 8 y a una temperatura de 4°C son las mejores condiciones de almacenamiento.

La comparación por medio de una prueba de t student de los tratamientos iluminados con respecto a los oscuros se puede observar en la Tabla 28.

Se puede observar en la Tabla 28, que no existe diferencia estadística entre los tratamientos iluminados y oscuros a los 2 y 14 días de almacenamiento, sin

embargo, a los 14 días de almacenamiento los tratamientos oscuros son los que presentan menor cambio de color, aunque de forma visual no se observe.

Tabla 28. Prueba de t Student de los Tratamientos de EM Iluminados y Oscuros.

Tratamiento	Cambio de color	
	2	14
Iluminados	2.1887 ^a	6.6625 ^a
Oscuros	2.3401 ^a	4.3807 ^a
	p=0.6707	p=0.0536

Posteriormente, se llevaron a cabo pruebas adicionales con algunas de las condiciones de almacenamiento probadas anteriormente y valorando además del cambio de color, el contenido de pigmento antocianico monomérico (CPAM) de los extractos.

El cambio de color total valorado a los EMA de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 29.

Tabla 29. Cambio de Color Total de los EMA de Antocianinas con Iluminación a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
6	25	0.75	5.40	2.43	3.38	2.49	2.62	2.83

El comportamiento de los EMA de antocianinas es mostrado en la Tabla 29, referente al cambio de color total se observó que el valor más bajo fue durante

los primeros 2 días de almacenamiento y que después de los 6 días, se mantuvo sin cambios importantes hasta el final del período, corroborando lo discutido en las Tablas 16 y 17.

El cambio de color total valorado a los EMA de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 30.

Tabla 30. Cambio de Color Total de los EMA de Antocianinas en Oscuridad a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	4	2.15	0.65	1.31	1.48	1.47	2.45	2.85
6	4	5.33	3.00	1.75	1.64	1.35	1.46	2.09
8	4	8.21	5.95	5.74	6.06	5.42	5.90	5.60

El comportamiento de los EMA de antocianinas es mostrado en la Tabla 30, referente al cambio de color total bajo oscuridad, pH 3 y 4°C, fue la que mostró menor cambio de color total durante los primeros 8 días de almacenamiento, sin embargo, bajo oscuridad, pH 6 y 4°C mostró menor cambio de color total después de los 10 días hasta al final del almacenamiento. Se puede sugerir que las bajo oscuridad, pH 3 y 4°C y pH 6 y 4°C pueden ser establecidas para un manejo de extractos de antocianinas bajo condiciones de procesamiento. También, se corrobora lo discutido en las Tablas 18 y 19. El cambio de color total valorado a los EM de antocianinas con iluminación a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 31.

Tabla 31. Cambio de Color Total de los EM de Antocianinas con Iluminación a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	25	0.79	0.52	1.09	1.43	2.21	2.88	5.24
6	25	1.43	1.61	1.15	1.77	1.90	2.84	3.52
8	25	0.87	0.78	1.15	1.29	1.87	3.03	4.23

El comportamiento de los EM de antocianinas es mostrado en la Tabla 31, referente al cambio de color total la con iluminación, pH 3 y 25°C, fue la que mostró menor cambio de color total durante los primeros 6 días de almacenamiento, sin embargo, con iluminación, pH 8 y 25°C, mostró menor cambio de color total después de los 8 días hasta al final del almacenamiento.

Por otro lado, con iluminación, pH 6 y 25°C, mostró menor cambio de color total después de los 12 días de almacenamiento. Se sugiere que con iluminación, pH 3 y 25°C y pH 6 y 25°C, pueden ser establecidas para un manejo de extractos de antocianinas bajo condiciones de procesamiento y con iluminación, pH 8 y 25°C, para almacenamiento. Además, esto corrobora lo discutido en las Tablas 24 y 25.

El cambio de color total valorado a los EM de antocianinas en oscuridad a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 32.

Tabla 32. Cambio de Color Total de los EM de Antocianinas en Oscuridad a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

pH	Temp	Tiempo de Almacenamiento, días						
		2	4	6	8	10	12	14
3	4	1.82	0.83	1.48	1.28	1.45	1.90	2.60

El comportamiento de los EM de antocianinas en oscuridad es mostrado en la Tabla 32, referente al cambio de color total se observó que el valor más bajo fue durante los primeros 4 días de almacenamiento y que después de los 6 días, se mantuvo sin cambios importantes hasta el final del período.

El contenido de pigmento antociánico monomérico valorado a los EMA de antocianinas a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 33.

Tabla 33. CPAM de los EMA de Antocianinas a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

Tratamientos			CPAM, mg/L	
Condición	pH	Temp	0	14
Iluminación	6	25	117.56	10.47
Oscuridad	3	4	151.89	149.68
Oscuridad	6	4	139.53	63.65
Oscuridad	8	4	134.52	7.21

El contenido de pigmento antociánico monomérico de los EMA de antocianinas es mostrado en la Tabla 33, como se puede observar bajo oscuridad, pH 3 y

4°C fue la que presentó menor cambio del CPAM durante todo el almacenamiento. Bajo estas condiciones de almacenamiento son más estables las antocianinas al sufrir menos reacciones de degradación.

El contenido de pigmento antociánico monomérico valorado a los EM de antocianinas a diferentes tiempos de almacenamiento es presentado en la Tabla 34.

Tabla 34. CPAM de los EM de Antocianinas a Diferentes Tiempos de Almacenamiento.

Tratamientos			CPAM, mg/L	
Condición	pH	Temp	0	14
Iluminación	3	25	135.24	58.83
Iluminación	6	25	108.61	64.03
Iluminación	8	25	111.14	3.61
Oscuridad	3	4	155.54	151.87

El contenido de pigmento antociánico monomérico de los EM de antocianinas es mostrado en la Tabla 34, como se puede observar bajo oscuridad, pH 3 y 4°C fue la que presentó un menor descenso durante el almacenamiento del CPAM. De acuerdo con Giusti y Wrolstad (1996), esta reducción en el contenido de antocianina puede ser debido a la degradación de la antocianina y/o a la difusión de antocianina de la cáscara hacia la pulpa durante la etapa de refrigeración. Por lo tanto, bajo estas condiciones de almacenamiento son más estables las antocianinas al sufrir menos reacciones de degradación.

4.3 Resultados de la Etapa Final

Para deshidratar los extractos acuosos de la cáscara de higo se usó el método por aspersión y liofilización. El pigmento en polvo obtenido se adicionó a un yogur natural valorando la estabilidad en almacenamiento en frío por medio del color (L, Hue y Chroma).

Las condiciones de operación para el secado por aspersión de pigmentos de higo es reportado en la Tabla 35.

Tabla 35. Condiciones de Operación para el Secado por Aspersión de Pigmentos de Higo.

Temperatura del aire de secado		
Entrada (°C)	Salida (°C)	Velocidad de alimentación (mL/h)
180 ± 2	80 ± 2	520
180 ± 2	90 ± 2	546
180 ± 2	92 ± 4	585

Velocidad de flujo de aire (L/h) 600 ± 50; presión de aire del compresor (bar) 8

De acuerdo con la Tabla 35, se valoraron tres temperaturas de entrada/salida del aire de secado, donde la tercera condición 180 °C de entrada y 92°C de salida resultó ser mejor para la obtención del polvo de pigmento de higo con propiedades visuales ya conocidas de este tipo de material, como lo son, bajo en humedad, polvo fino, etc. (Figura 14). Cai y Corke (2000), reportaron temperaturas de 165 a 180°C/92 a 96°C y 20 a 40% de contenido de sólidos en la alimentación fueron deseables para la producción de extractos betaciánicos de *Amaranthus*. También Jackman y Smith (1992), reportaron el secado por

aspersión de concentrados de antocianinas para uso como colorantes alimenticios.



Figura 14. Polvo de Pigmento Antociánico de Cáscara de Higo, Obtenido por Aspersión.

Las condiciones de operación para la liofilización de pigmentos de higo es reportado en la Tabla 36.

Tabla 36. Condiciones de Operación para el Secado por Liofilización de Pigmentos de Higo.

Temperatura del colector (cámara)	-43°C (inicio)
Temperatura del colector (cámara)	-44°C (final)
Vacío del sistema	596×10^{-3} MBar (inicio)
Vacío del sistema	250×10^{-3} MBar (final)
Tiempo de liofilización	34 horas

Como lo muestra la Tabla 36, bajo estas condiciones se obtuvo un polvo de pigmento de higo, sin embargo, las propiedades visuales no fueron las mismas en comparación con el material obtenido por aspersión. El polvo liofilizado se

observaba granuloso, con un contenido de humedad no tan bajo, ya que cuando se finalizaba el tiempo de liofilizado se obtenía un tipo de torta del pigmento que después era necesario molerla con el pistilo de un mortero.

Además, el tiempo observado para la liofilización es demasiado grande, por lo que aumentaría los costos de su producción.

De acuerdo con Masters, 1985; Desobry et al, 1997; Francis 1999, la liofilización es considerada como la mejor manera para secar pigmentos sensibles de plantas. Sin embargo, el secado por aspersion, si es factible, sería un método más práctico y económico de producción en polvo de colorantes sensible ya que el costo de producción es de 30 a 50 veces menos que por liofilización.

Para valorar la estabilidad en almacenamiento en frío de los yogures naturales adicionados con pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por aspersion, se midió la luminosidad, Hue y Chroma, como se reporta en la Tabla 37.

El pigmento se incorporó fácilmente y en forma homogénea en el yogur, sin que se observara la formación de puntos de color, durante los 25 días de evaluación. Tampoco se observó sinéresis (separación de fases) del color o migración del colorante hacia el suero del yogur. Como se puede observar en la Tabla 37, el color de los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por aspersion y liofilizado fue diferente desde el tiempo cero, a pesar que las concentraciones usadas fueron las mismas para los dos métodos.

Tabla 37. Color de los Yogures sin y Adicionados con Pigmento de Higo Obtenido por Aspersión y Liofilizado, al Inicio y al Final de la Evaluación.

Tratamiento	Valores iniciales			Valores finales		
	L	Hue	Chroma	L	Hue	Chroma
Control	42.7	119.2	3.8	45.8	118.1	4.2
ASP 0.8 g	42.3	10.4	5.5	41.8	18.3	4.5
ASP 1.0 g	40.4	8.0	6.0	38.3	14.1	5.1
ASP 1.2 g	44.2	7.2	6.8	40.0	12.1	5.6
LIO 0.8 g	37.9	22.8	3.2	39.0	32.0	2.8
LIO 1.0 g	38.6	17.1	3.9	37.9	25.5	3.3
LIO 1.2 g	38.2	13.9	4.2	35.9	21.0	3.6
Marca "A"	43.8	24.8	12.4	43.8	24.8	12.4
Marca "B"	46.1	28.0	12.2	46.1	28.0	12.2
Marca "C"	49.1	17.1	10.9	49.1	17.1	10.9

La estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando luminosidad, es presentado en la Tabla 38.

De acuerdo con la Tabla 38, estadísticamente no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y el control al inicio y final del almacenamiento, sin embargo, la luminosidad es más alta tanto en el control como en el yogur adicionado con polvo obtenido por aspersión con respecto al liofilizado, parecido a los valores que arrojaron los yogures comerciales.

Tabla 38. Estabilidad de Yogur sin y Adicionado con Pigmento de Cáscara de Higo, Valorando Luminosidad.

Tratamiento	Luminosidad	
	0	25
ASP 0.8 g	42.28333 ^a	41.75333 ^a
ASP 1.0 g	40.37000 ^a	38.27000 ^a
ASP 1.2 g	44.15000 ^a	39.95667 ^a
LIO 0.8 g	37.87667 ^a	39.00333 ^a
LIO 1.0 g	38.61333 ^a	37.93000 ^a
LIO 1.2 g	38.23333 ^a	35.87667 ^a
Control	42.72667 ^a	45.76333 ^a
	$p = 0.72747$	$p = 0.31173$

La estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando Hue (tono o matiz), es presentado en la Tabla 39.

Tabla 39. Estabilidad de Yogur sin y Adicionado con Pigmento de Cáscara de Higo, Valorando Hue (tono o matiz).

Tratamiento	Hue	
	0	25
ASP 0.8 g	10.4276 ^d	18.3289 ^c
ASP 1.0 g	8.0260 ^d	14.0814 ^c
ASP 1.2 g	7.2045 ^d	12.0680 ^{cd}
LIO 0.8 g	22.7867 ^b	31.9531 ^b
LIO 1.0 g	17.1393 ^c	25.5081 ^b
LIO 1.2 g	13.8570 ^c	20.9730 ^{bc}
Control	119.2462 ^a	118.0671 ^a
	$p = 0.0000$	$p = 0.00000$

De acuerdo con la Tabla 39, estadísticamente se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y el control al inicio y final del almacenamiento, los valores de tono o matiz (Hue) para los yogures

adicionados con polvo obtenido por aspersion fueron menores de 11° al inicio del almacenamiento, que corresponden a un color rojo con tonalidad violeta (rojo profundo), de acuerdo a la escala de color (Minolta, 2003). En el caso del yogur coloreado con el polvo obtenido por liofilización, los valores de Hue fueron menores de 23° y el color rojo se observó que conforme se aumentó la concentración la tonalidad se fue haciendo menos intensa. Ambos polvos sufren un incremento en su valor de Hue al final de la evaluación, como consecuencia de una degradación aparente de la antocianina presente, sin embargo, dicha degradación es mayor en el polvo adicionado obtenido por liofilización. El tono o matiz presentó un ligero incremento entre los días 10 y 15, que se acentuó entre los días 20 y 25 de almacenamiento, como se puede observar en la Figura 15.

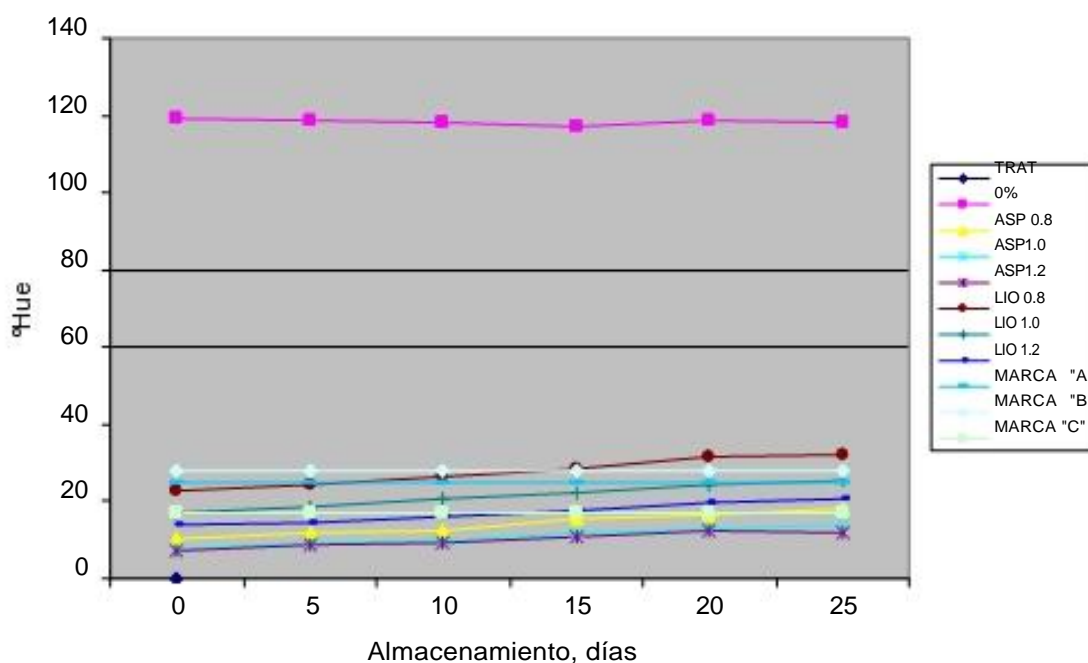


Figura 15. Estabilidad de Yogur sin y Adicionado con Pigmento en Polvo de Cáscara de Higo Obtenido por dos Métodos Diferentes, Valorando Hue.

La estabilidad de yogur sin y adicionado con pigmento de cáscara de higo, valorando Chroma (pureza del color), es presentado en la Tabla 40.

Tabla 40. Estabilidad de Yogur sin y Adicionado con Pigmento de Cáscara de Higo, Valorando Chroma (pureza del color).

Tratamiento	Chroma	
	0	25
ASP 0.8 g	5.49298 ^b	4.54318 ^{bc}
ASP 1.0 g	5.993557 ^{ab}	5.100242 ^{ab}
ASP 1.2 g	6.831591 ^a	5.641628 ^a
LIO 0.8 g	3.215806 ^c	2.840280 ^c
LIO 1.0 g	3.878451 ^c	3.278555 ^c
LIO 1.2 g	4.150332 ^c	3.584799 ^c
Control	3.830059 ^c	4.202505 ^c

p = 0.00003

p = 0.00005

Como se observa en la Tabla 40, existió diferencia significativa entre los tratamientos al inicio y final del almacenamiento, para el caso de los valores de chroma, se observaron colores más vivos en los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por aspersion conforme se aumentó la concentración, no así para el caso de los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por liofilización.

Durante el tiempo de almacenamiento evaluado, los valores de chroma decrecieron ligeramente tanto en los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por aspersion como por liofilización, como se puede observar en la Figura 16.

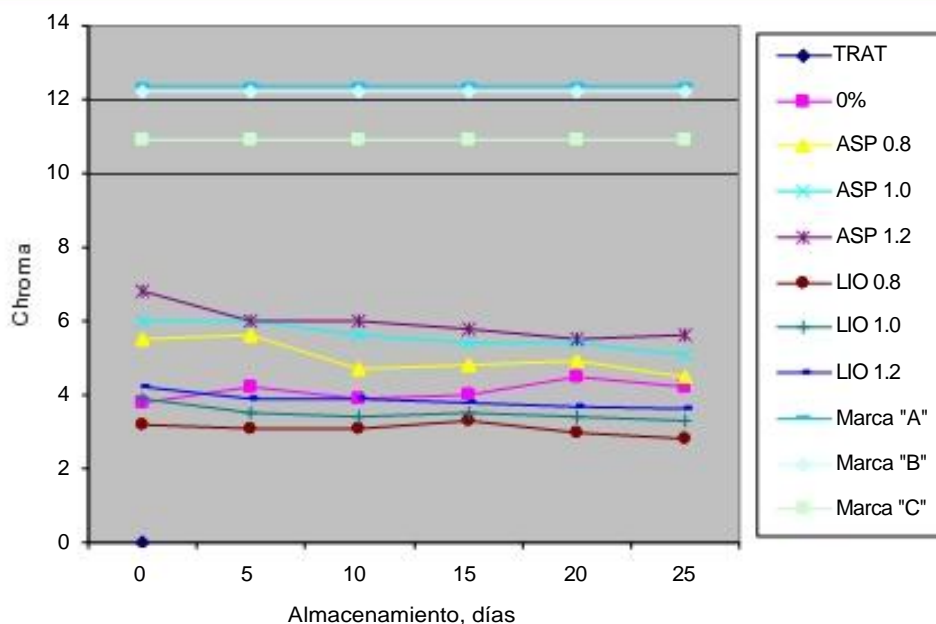


Figura 16. Estabilidad de Yogur sin y Adicionado con Pigmento en Polvo de Cáscara de Higo Obtenido por dos Métodos Diferentes, Valorando Chroma.

La comparación por medio de una prueba de t student de los tratamientos por aspersion con respecto a los liofilizados se puede observar en la Tabla 41 y 42.

Tabla 41. Prueba de t Student para la Estabilidad del Pigmento Obtenido por Aspersion y Liofilizado, Valorando Hue.

Tratamiento	Hue	
	0	25
Aspersion	8.552667 ^a	14.82611 ^a
Liofilización	17.92764 ^b	26.14471 ^b
	p=0.000033	p=0.000351

De acuerdo con la Tabla 41, al comparar el polvo obtenido por aspersion contra el liofilizado, valorando Hue, se encontró diferencia significativa entre cada uno

de ellos al inicio como al final del almacenamiento. El valor de Hue observado en el tratamiento por aspersión al inicio de la evaluación es más cercano a 0° que señala colores más profundos de acuerdo a la escala de color de Minolta, por el contrario el valor para el liofilizado fue cercano a 20° percibiendo colores menos rojizos. El aumento del valor de Hue en ambos tratamientos, se puede interpretar como una degradación aparente de antocianina con el transcurso del tiempo, siendo mayor para el polvo liofilizado.

Tabla 42. Prueba de t Student para la Estabilidad del Pigmento Obtenido por Aspersión y Liofilizado, Valorando Chroma.

Tratamiento	Chroma	
	0	25
Aspersión	6.106043 ^a	5.095020 ^a
Liofilización	3.748196 ^b	3.234544 ^b
	p=0.00006	p=0.000005

Como se observa en la Tabla 42, al comparar el polvo obtenido por aspersión contra el liofilizado, valorando Chroma, se encontró diferencia significativa entre cada uno de ellos al inicio como al final del almacenamiento. El valor de Chroma (pureza del color) observado en el tratamiento por aspersión al inicio y al final de la evaluación es más alto por lo que su color es más vivo, de acuerdo a la escala de color de Minolta, por el contrario el valor para el liofilizado fue más bajo, percibiendo colores más apagados.

De acuerdo con Salinas et al (2005), ninguno de los yogures coloreados con los extractos de antocianinas igualó los estándares de color del yogur comercial de fresa usado como referencia, ya que la industria emplea mezclas de

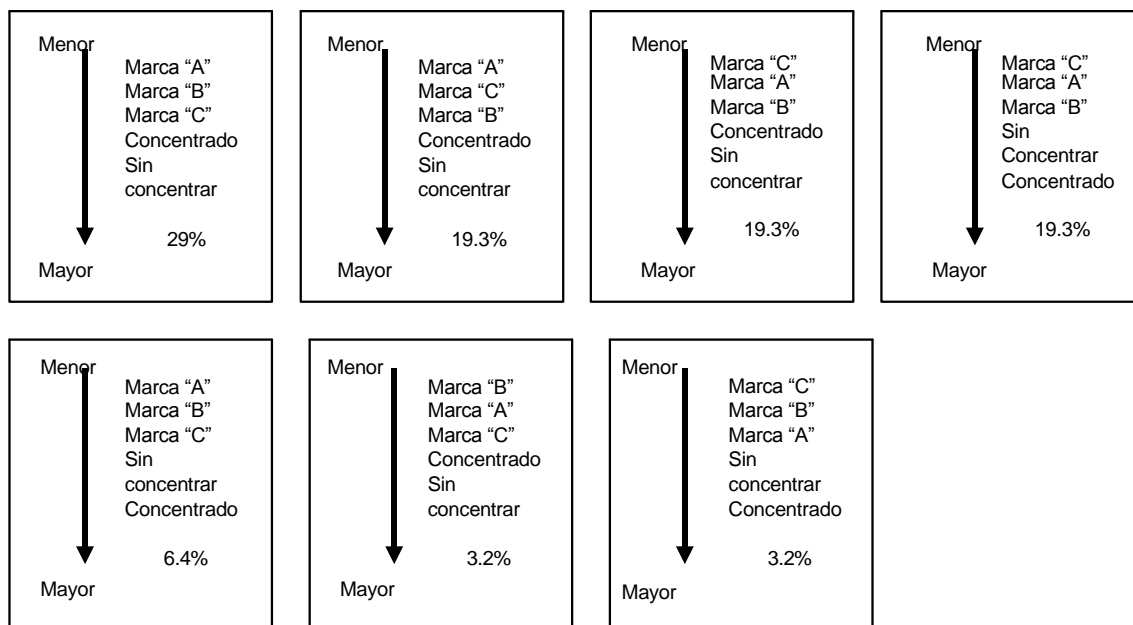
colorantes para lograr los colores que desea, por lo que sería muy difícil con un solo extracto alcanzar tales valores. Sin embargo, los yogures adicionados con polvo de pigmento de cáscara de higo obtenido por aspersion, aunque de manera visual, presenta el color y la pureza más cercanos a los del yogur comercial sabor fresa marca “C”, como se puede apreciar en la Figura 17, por lo que es posible el uso de los pigmentos de cáscara de higo para colorear alimentos de acidez intermedia como el yogur.

Finalmente, los resultados del nivel de agrado llevado a cabo a los yogures adicionados con pigmento en polvo de antocianinas de cáscara de higo y los comerciales, se presentan en la Tabla 43.



Figura 17. Yogur sin y Adicionado con Pigmento en Polvo de Cáscara de Higo Obtenido por Aspersion.

Tabla 43. Prueba de Ordenamiento por Color en Yogur Adicionado con Pigmento en Polvo de Cáscara de Higo Obtenido por Aspersión.



De acuerdo a la Tabla 43, el ordenamiento por color que obtuvo el mayor porcentaje fue de 29%, donde el yogur de menor intensidad (color) fue el de la Marca "A" y el de mayor intensidad fue el yogur adicionado con pigmento en polvo de antocianina de cáscara de higo sin concentrar. Entonces, se reafirma el poder tintorial que posee el pigmento en polvo de la cáscara de higo como colorante natural.

Por otro lado, los resultados de la prueba de preferencia entre un yogur comercial Marca "C" y el yogur adicionado con pigmento en polvo de antocianina de cáscara de higo sin concentrar son presentados en la Tabla 44.

Tabla 44. Prueba de Preferencia por Color en Yogur Adicionado con Pigmento en Polvo de Cáscara de Higo Obtenido por Aspersión.

Yogur	Porcentaje, %
Marca "C"	89.6
Adicionado sin concentrar	10.3

Como se observa en la Tabla 44, hay una clara diferencia entre la preferencia de un yogur a otro. La posible causa fue probablemente el tiempo que transcurrió desde que el pigmento en polvo fue obtenido hasta que fue adicionado. En pruebas preliminares, se estableció la cantidad de pigmento en polvo de cáscara de higo que fue necesaria para intentar igualar el color del yogur comercial y el yogur adicionado. Sin embargo, al momento de adicionar la cantidad previamente establecida, no se logró establecer los mismos parámetros de color, inclusive a simple vista se notaba claramente la diferencia de colores. Por lo que se cree que esta diferencia se debe a un posible cambio en la estabilidad del pigmento (antocianinas), ya que el color obtenido previamente era muy similar al del yogur comercial y cuando se llevó a cabo la prueba de preferencia el color obtenido del yogur adicionado fue violeta. Cabe resaltar que algunos de los comentarios que los jueces consumidores anotaron en las hojas de evaluación al yogur adicionado fueron las siguientes: buena apariencia, apariencia más apetitosa, color a frambuesa, etc.

A pesar de todo lo anterior, se puede asegurar que el pigmento en polvo de cáscara de higo obtenido por aspersión es recomendado como colorante natural en alimentos de acidez intermedia.

CONCLUSIONES

Valorando el tamaño de muestra, el método de extracción de antocianinas de cáscara de higo con metanol acidificado es más sensible, menos complicado y con menos tiempos de espera comparado con el método de extracción con acetona.

El escaneo espectrofotométrico de extractos metanólicos de antocianinas arrojó valores más altos de absorbancia para muestras liofilizadas no resuspendidas en agua que para muestras liofilizadas y resuspendidas con agua.

Los extractos metanólicos de antocianinas de cáscara de higo se comportan dependiendo del pH, rojos a pH 2.0 y azules a pH 8.0; esto más las lecturas de máxima absorbancia a 520 nm corroboran la presencia de antocianinas en el higo.

El contenido de pigmento antociánico monomérico es más alto en muestras liofilizadas que en muestras congeladas.

Por medio del análisis por HPLC de extractos metanólicos acidificados hidrolizados de antocianinas de cáscara de higo se separó e identificó la cianidina como única antocianina presente en el higo.

Además la concentración de cianidina fue mayor en las muestras liofilizadas sin hidrolizar que en las congeladas sin hidrolizar, observando el mismo

comportamiento en las muestras hidrolizadas, aunque la concentración fue más baja en las muestras hidrolizadas que en las no hidrolizadas.

Las mejores condiciones para almacenamiento con iluminación de los extractos metanólicos acidificados de antocianinas de cáscara de higo son pH 6.0 y temperatura de 25°C.

Las mejores condiciones para almacenamiento en oscuridad de los extractos metanólicos acidificados de antocianinas de cáscara de higo son pH 3.0 y temperatura de 4°C.

Las mejores condiciones para almacenamiento con iluminación de los extractos metanólicos de antocianinas de cáscara de higo son pH 8.0 y temperatura de 25°C.

Las mejores condiciones para almacenamiento en oscuridad de los extractos metanólicos de antocianinas de cáscara de higo son pH 8.0 y temperatura de 4°C.

Las mejores condiciones para almacenamiento de los extractos metanólicos acidificados de antocianinas de cáscara de higo que presentaron el menor cambio del contenido de pigmento antociánico monomérico son pH 3.0, temperatura de 4°C y en oscuridad. De igual manera, se observó el mismo comportamiento para los extractos metanólicos.

Es posible secar por aspersión extractos acuosos de antocianinas de cáscara de higo usando una temperatura de entrada del aire de secado de 180°C y una temperatura de salida del aire de secado de 92-96°C.

El secado por aspersión, es factible, por ser un método más práctico y económico de producción en polvo de antocianinas, ya que el costo de producción es de 30 a 50 veces menos que por liofilización.

El tono o matiz (Hue) para los yogures adicionados con polvo obtenido por aspersión fue menor de 11°, que corresponden a un color rojo con tonalidad violeta (rojo profundo).

Para el caso del yogur coloreado con el polvo obtenido por liofilización, el Hue fue menor de 23° y el color rojo disminuyó conforme se aumentó la concentración.

El chroma (colores más vivos) fue mayor en los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por aspersión que en los yogures adicionados con pigmento en polvo obtenido por liofilización.

Los yogures adicionados con polvo de pigmento de cáscara de higo obtenido por aspersión, aunque de manera visual, presentan el color y la pureza más cercanos a los del yogur comercial sabor fresa marca "C".

Es posible el uso de los pigmentos de cáscara de higo para colorear alimentos de acidez intermedia como el yogur.

Recomendaciones

Mejorar el proceso de extracción de antocianinas para recuperar la mayor cantidad de pigmento posible.

Profundizar en el análisis por HPLC de la antocianina presente en el higo, con la ayuda de la espectrometría de masas.

Aumentar la estabilidad bajo almacenamiento de las antocianinas de higo por medio de la co-pigmentación.

Desarrollar el proceso tecnológico para la preparación comercial del polvo del colorante obtenido de la cáscara de higo.

Diversificar la aplicación en alimentos del colorante natural del higo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen O. M. 2000. Anthocyanins. En: Separation of Acylated Anthocyanin Pigments by High Speed CCC (K. Torskaangerpoll, E. Chou and O. M. Andersen, eds.), J. Liq. Chrom. & Rel. Technol., 24 (11 & 12): 1791-1799.
- Baublis A., Spomer A. and Berber-Jiménez. 1994. Anthocianin Pigments: Comparison of Extract Stability. J. Food Sci, 59(6):1219.
- Büchi Labortechnik AG. 2002. Training papers spray drying. www.buchi.com
- Cai Y. Z. and Corke H. 2000. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. J. Food Sci., 65(6): 1248-1252.
- Camire E. M., Chaovanalikit A., Dougherty P. M. and Briggs J. 2002. Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. J. Food Sci., 67(1): 438-441.
- Clydesdale F. M. and Francis F. J. 1976. Pigments. En: Principles of Food Chemistry, Part I, Food Chemistry, 1st ed. Marcel Dekker, New York.
- Clydesdale F. M., Main J. H., Francis J. F. and Damon Jr R. A. 1978. Concord Grape Pigments as Colorants for Beverages and Gelatin Desserts. J. Food Sci, 43:1687.
- Conabio. 2003. Ficus carica L. Disponible en CONABIO World Wide Web Site. www.conabio.gob.mx.
- Daravingas G. and Cain R. F. 1968. Thermal Degradation of Black Raspberry Anthocyanin Pigments in Model Systems. J. Food Sci., 33:138.
- Delpech R. 2000. The Importance of Red Pigments to Plant Life: experiments with anthocyanins. Journal of Biological Education, 34(4): 206-210.
- Desobry S. A., Netto F. M. and Labuzza T. P. 1997. Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. En: Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments (Y. Z. Cai and H. Corke, eds.). J. Food Sci., 65(6): 1248-1252.
- Durante M. J., Pifferi P. G., Spagna G. and Gilioli E. 1995. Partial Caracterización of *Vitis vinifera* grape var. Ancellota, Lebensm. Wiss. U. Technol. 28:635.
- Eder R. 1996. Pigments: anthocyanins. En: Handbook of Food Analysis, Volume I (L. M. Nollet, ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 970.

Ensminger A. H., Ensminger M. E., Konlande J. E. and Robson J. R. K. 1994. En: Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica* var. Mission) fruit and tree components (Jeong W. S. and Lachance P. A, eds.), *J. Food Sci.*, 66(2): 278-281.

Filková I. and Mujumdar A. S. 1995. Secado por aspersion. Mencionado en: Candelas, M. G. 2005. Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersion de Jugo de Tomate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 48.

Floridata. 2003. *Ficus carica*. Disponible en FLORIDATA World Wide Web Site. www.streetside.com.

Francis J. F. 1987. Lesser-known food colorants. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), *J. Food Sci.*, 63(3): 458-465.

Francis J. F. 1993. Pigmentos y Otros Colorantes. En: Química de los Alimentos (O. R. Fennema, ed.), Acirbia, Zaragoza, p. 615.

Francis J. F. 1999. FD&C colorants: anthocyanins and betalains. En: Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments (Y. Z. Cai and H. Corke, eds.). *J. Food Sci.*, 65(6): 1248-1252.

Francis J. F. 2000. Phenolic compounds. Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology. John Wiley and Sons, Inc. p. 376, 1872.

Frankel E. N., Waterhouse A. L., and Teissedre P. L. 1995. Principal Phenolic Phytochemicals in Selected California Wines and Their Antioxidant Activity in Inhibiting Oxidation of Human Low-density Lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* 43:890.

García F. and Cruz-Remes L. 1993. The natural xanthophylls pigment industry. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), *J. Food Sci.*, 63(3): 458-465.

García-Viguera C., Zafrilla P. and Tomás-Barberán F. A. 1997. Determinación of authenticity of fruit jams by HPLC analysis of anthocyanins. En: Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperature (C. GarcíaViguera, P. Zafrilla, F. Romero, P. Abellán, and F. A. Tomás-Barberán, eds.), *J. Food Sci.*, 64(2): 243-247).

García-Viguera., Zafrilla P. and Tomás-Barberán F.A. 1998. The use of acetona as extraction solvent for strawberry fruit anthocyanins. En: Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperature (C. GarcíaViguera, P. Zafrilla, F. Romero, P. Abellán, and F. A. Tomás-Barberán, eds.), *J. Food Sci.*, 64(2): 243-247).

García-Viguera., Zafrilla P., Romero F., Abellán and Tomás-Barberán F.A. 1999. Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperature. *J. Food Sci.*, 64(2):243-247.

Gasiorowski K., Szyba K., Brokos B., Koczyska B., Jankowiak-Wodarczyk and Oszmiński M. 1997. Antimutagenic Activity of Anthocyanins Isolated from *Aronia melanocarpa* Fruits. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), *J. Food Sci.*, 72(7): 363-368.

Giusti M. M. and Wrolstad R. E. 1996. Characterization of Red Radish Anthocyanins *J. Food Sci.*, 61(2):322.

Giusti M. M. and Wrolstad R. E. 2000. *Characterización and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc.

Harborne B. J. 1986. Flavonoids: Advances in Research since 1986. En: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

Harborne B. J. and Grayer J. R. 1988. The Anthocyanins. En: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

Harborne B. J. and Williams A. C. 1988. Flavone and Flavonol Glycosides. En: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

Heldman D. R. and Lund D. B. 1992. Secado por aspersion. Mencionado en: Candelas, M. G. 2005. Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersion de Jugo de Tomate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 49.

Hendry A. G. 1992. Natural Pigments in Biology. En: *Natural Food Colorants* (G. A. Hendry and J. D. Houghton, eds.), Blackie and Son Ltd., Glasgow, p. 1-38.

Jackman L. R. and Smith L. J. 1992. Anthocyanins and Betalains. En: *Natural Food Colorants* (G. A. Hendry and J. D. Houghton, eds.), Blackie and Son Ltd., Glasgow, p. 192.

Jackson M. G., Timberlake C. F., Bridle P. and Vallis L. 1978. Red Wine Quality: Correlation Between Color, Aroma and Flavor and Pigment and other parameters of Young Beaujolais. *J. Sci. Food Agric.* 29:715.

Jayaraman K. S. and Das Gupta D. K. 1995. Drying of Fruits and Vegetables. Mencionado en: Candelas, M. G. 2005. Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersion de Jugo de

Tomate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 49.

Jing P. and Giusti M. M. 2007. Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract. *J. Food Sci.*, 72(7): 363-368.

Kalt W. y MacDonald Jane. 2002. Agriculture and Agri-Food Canada, Kentville, Nova Scotia, Canada.

Koide T., Hashimoto Y., Kamei H., Kojima T., Hasegawa M. and Terabe K. 1997. Antitumor Effect of Anthocyanins Fractions Extracted from Red Soybeans and Red Beans in vitro and in vivo. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), *J. Food Sci.*, 72(7): 363-368.

Kuti O. J. and Konuru B. H. 2004. Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Snidoscolus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 117-121.

Kühnau J. 1976. The Flavonoids: a class of Semiessential Food Components; Their Role in Human Nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.* 24:117.

Labconco. 1998. A Guide to Freeze-Drying for the Laboratory. Labconco Corporation. Kansas City, MO. p. 4.

Lauro G. J. 1991. A primer on Natural Colors. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), *J. Food Sci.*, 63(3): 458-465.

Lepidot T., Harel S., Akiri B., Granit R. and Kaner J. 1999. pH-dependent Forms of Red Wine Anthocyanins as Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 47:67.

Lianju W., Weibin J., Kai M., Zhifeng L., Yelin W. 2003. The Production and Research of Figs (*Ficus carica* L) in China. *Acta Hortic.* 605: 191-196.

Macheix J. J., Fleuriet A. and Billot J. 1990. Pigments: anthocyanins. En: Handbook of Food Analysis, Volume I (L. M. Nollet, ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, p. 968.

Mani S., Jaya S., and Das H. 2002. Sticky Issues on Spray Drying of Fruit Juices. Mencionado en: Candelas, M. G. 2005. Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersión de Jugo de Tomate. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 48.

Masters K. 1985. Spray Drying Handbook. En: Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments (Y. Z. Cai and H. Corke, eds.). *J. Food Sci.*, 65(6): 1248-1252.

Mazza G. and Miniati E. 1993. Introduction. Ch. 1 in anthocyanins in fruits, vegetables, and grains. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), J. Food Sci., 63(3): 458-465.

Minolta Holdings Inc. 2003. Konica Minolta Colour Web. Your Colours. www.konicaminolta.com.

Moreno-Álvarez M. J., Vitoria M. A., López E. y Belén C. D. 2002. Estabilidad de Antocianinas en Jugos Pasteurizados de Mora (*Rubís glaucus* B.). ALAN, 52(2).

Morton J. F. 1987. Higo. En: Frutas de Climas Calientes (Julia F. Morton, ed.), Miami, Florida.

Nollet L.M. 1996. Handbook of Food Analysis. Volume I. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 969.

Nutriverde. 2003. Alimentación Vegetariana (el placer de la salud). Disponible en NUTRIVERDE World Wide Web Site. www.nutriverde.com.ar.

Palamidis N. and Markakis P. 1975. Stability of Grape Anthocyanin in a Carbonated Beverage. J. Food Sci, 40:1047.

Pegg R. B. and Shahidi F. 1999. Secado por Aspersión. Mencionado en: Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersión de Jugo de Tomate (M. G. Candelas, ed.). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 48.

Peterson J. and Dwyer J. 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), J. Food Sci., 72(7): 363-368.

Pierpoint S. W. 1983. Reaction of phenolic compounds with proteins and their relevance to the production of leaf protein. En: Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

Puech A. A., Rebeiz A. C, Catlin B. P. and Crane C. J. 1975. Characterization of Anthocyanins in Fig (*Ficus carica* L.) Fruits. J. Food Sci., 40: 775-779.

Rahman M. S., Perera C. O. 1999. Secado por aspersión. Mencionado en: Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersión de Jugo de Tomate (M. G. Candelas, ed). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 49.

Ré M. I. 1998. Secado por aspersión. Mencionado en: Estabilidad del Licopeno Bajo Diferentes Condiciones de Operación del Secado por Aspersión de Jugo

de Tomate (M. G. Candelas, ed.). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N. L. p. 49.

Rivas J. D. L. 1989. Reverse-phase high performance liquid chromatographic separation of lutein and lutein fatty acid esters from marigold flower petal powder. En: Characterization and Stability of Pigments Extracted from Terminalia catappa Leaves (E. López-Hernández, E. Ponce-Alquicira, F. CruzSosa and I. Guerrero-Legarreta, eds.). J. Food Sci., 66(6): 832-836.

Rodríguez Saona L. E., Giusti M. M. and Wrolstad R. E. 1998. Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes. J. Food Sci., 63(3): 458-465.

Salinas M. Y, Rubio H. D. y Díaz V. A. 2005. Extracción y Uso de Pigmentos del Grano de Maíz (Zea mays l) Como Colorantes en Yogur. ALAN., 55(3).

Salinas-Moreno Y., Rojas-Herrera L., Sosa-Montes E. y Pérez-Herrera P. 2005. Composición de Antocianinas en Variedades de Frijol Negro (Phaseolus vulgaris L.) Cultivadas en México. Agrociencia 39:385-394.

Scalver A., Manach C. and Morand C. 2005. Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45: 287-306.

Schnetzler K. A. and Breene W. M. 1994. Food uses and amaranth product research: a comprehensive review. En: Production and Properties of Spraydried Amaranthus Betacyanin Pigments (Y. Z. Cai and H. Corke, eds.) J. Food Sci., 65 (6): 1248-1252.

Solomon A, Golubowicz S, Yablowicz Z, Grossman S, Bergman M, Gottlieb EH, Altman A, Kerem Z, and Flaishman A. 2006. Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (Fig carica L.). J. Agric. Food Chem 54(20), 7717-7723.

Steinmetz K. A. y Potter J.D. 1996. Vegetables, Fruits, and Cancer Prevention: a Review. J. A. Diet. Assoc. 96:1027.

Strack D. and Wray V. 1994. The anthocyanins. En: Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

Tsimidou . and Tsatsaroni E. 1993. Stability of saffron pigments in aqueous extracts. En: Characterization and Stability of Pigments Extracted from Terminalia catappa Leaves (E. López-Hernández, E. Ponce-Alquicira, F. CruzSosa and I. Guerrero-Legarreta, eds.). J. Food Sci., 66(6): 832-836.

Vinson J. A. 1998. Flavonoids in Foods as in Vitro and in Vivo Antioxidants. Adv. Exp. Med. Biol. 439:151.

Vinson J. A. 1999. The Functional Food Properties of Figs. Cereal Foods World. 4:82-87.

Vinson J. A., Zubik L., Bose P., Samman N., Proch J. 2005. Dried Fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.* 24: 44-50.

Winkel-Shirley B. 2001. Flavonoids Biosynthesis. A colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. *Plant Physiology*, 126: 485-493.

Yang C. S., Landau J. M., Huang M.-T. and Newmark H. L. 2001. Inhibition of Carcinogenesis by Dietary Polyphenolic Compounds. *Ann. Rev. Nutr.* 21:381.

Zhao C., Giusti M. M., Malik M., Moyer M. P. and Magnuson B. A. 2004. Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. En: *Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (Zea mays L.) Color Extract* (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), *J. Food Sci.*, 72(7): 363-368.

Apéndice A

Instrucciones para la operación del Secador Büchi B-191

- a) Abrir el aire del compresor, el cual debe tener una presión de salida de 8 bar.
- b) Activar el “switch” principal.
- c) Abrir la válvula para el flujo de aire de aspersión (el fabricante recomienda (600 L/h).
- d) Fijar la capacidad del aspirador mediante las teclas con flechas (el fabricante recomienda 100%).
- e) Fijar la temperatura del aire de entrada deseada con las teclas de flechas correspondientes (170, 180 ó 190 °C, según el caso). Entonces encender el calentador.
- f) Tan pronto como la temperatura de entrada se estabilice, la temperatura de salida se ajusta usando agua destilada (en este caso se ajustó alrededor de 92-96°C, y la bomba de alimentación registró entre 45-55%). La temperatura de salida se controla aumentando o disminuyendo la salida de la bomba de alimentación. La temperatura de salida corresponde a la máxima temperatura del producto.
- g) Poner agua destilada en un vaso en el soporte de la alimentación e introducir la manguera de alimentación.
- h) Fijar un valor nominal pequeño en la bomba de alimentación e ir incrementándolo poco a poco hasta llegar a la temperatura de salida deseada (la máxima velocidad de alimentación es de 1300 mL/h). Entonces, encender la bomba. Cuando el valor de la temperatura de salida se alcance, el producto puede ser introducido. Quite la manguera de alimentación del agua destilada e inmediatamente póngala en la

solución que va a ser deshidratada. Dependiendo de la concentración del producto, la temperatura de salida puede ser reajustada.

- i) El proceso de secado lleva aproximadamente una hora por cada lote. El polvo obtenido se deposita en el recipiente de recolección.

- j) Al terminar de secar el producto, inmediatamente se enjuaga la manguera de alimentación volviéndola a poner en un vaso con agua destilada. Una vez que se ha enjuagado la manguera y la boquilla de aspersión, la unidad puede ser apagada de acuerdo con los pasos que siguen.

- k) Apagar el calentador. Para evitar que la temperatura de salida aumente mucho, la bomba de alimentación debe permanecer funcionando por poco tiempo.

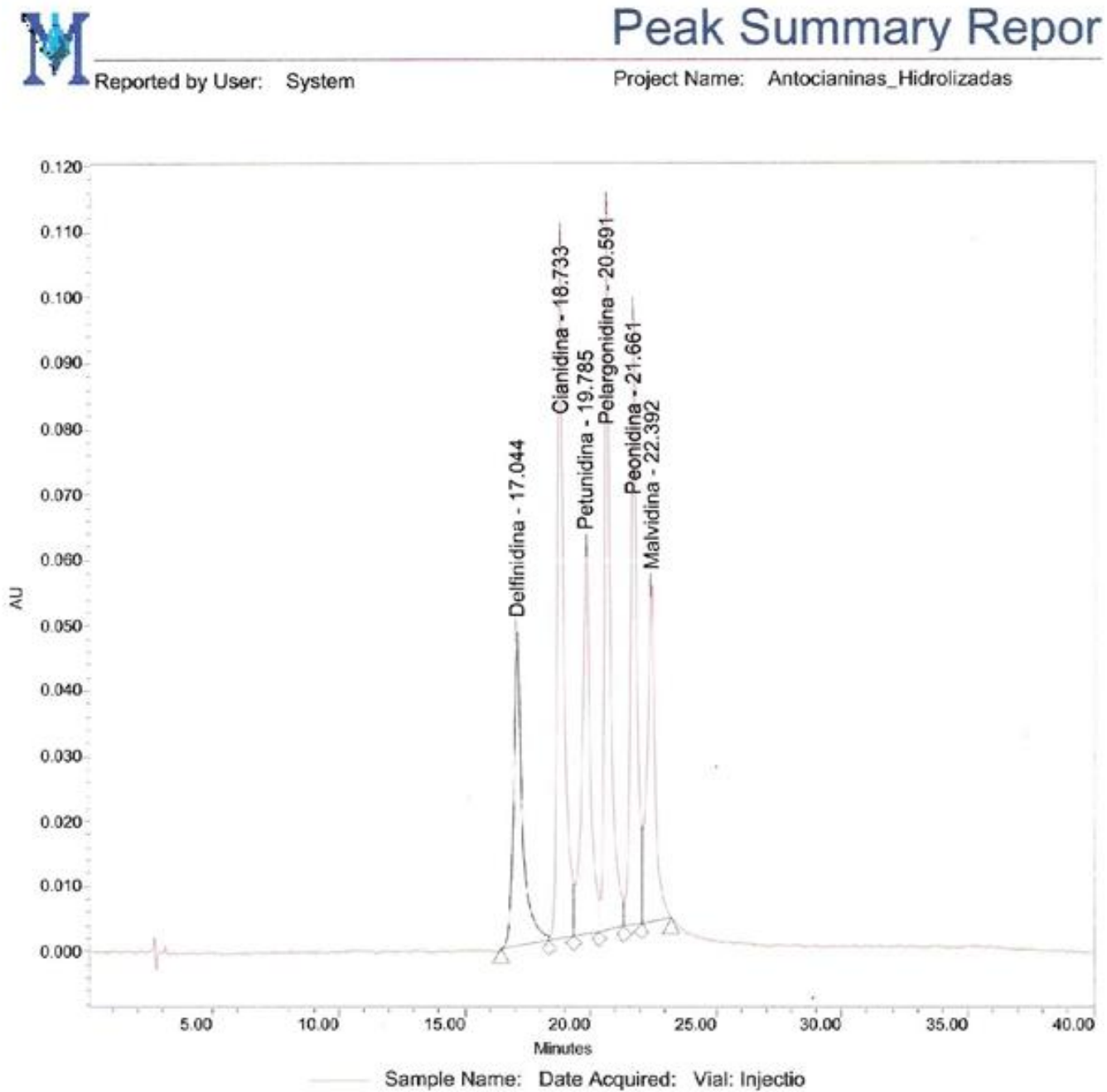
- l) Apagar la bomba de alimentación cuando la temperatura de entrada esté por debajo de los setenta grados.

- m) Apagar el aspirador.

- n) Desmontar el recipiente conteniendo el producto. Recoger el polvo y almacenarlo.

Apéndice B

Cromatogramas de los Estándares



Cromatograma de delfinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina y malvidina.

Apéndice C

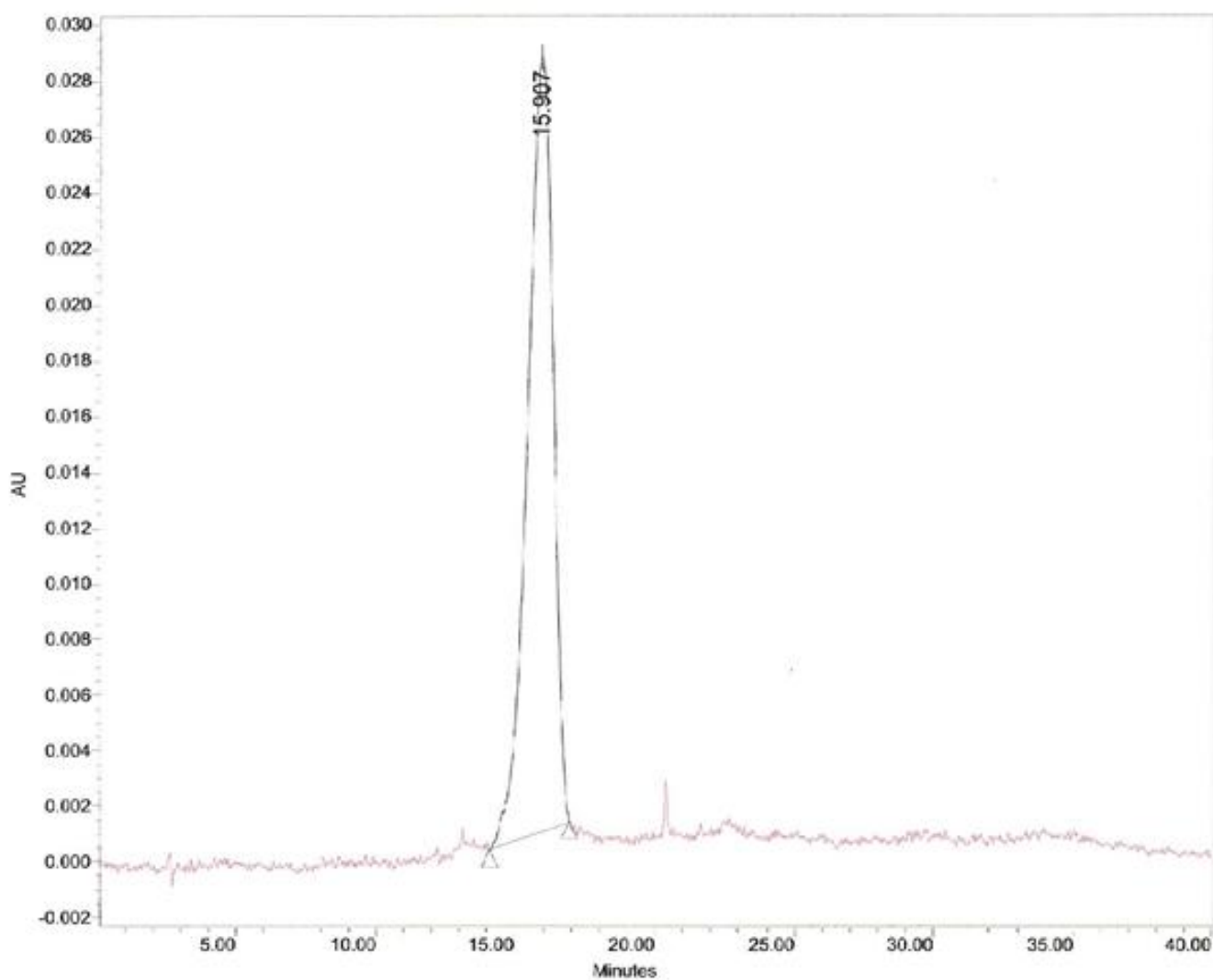
Cromatogramas de los extractos de la cáscara de higo



Reported by User: System

Peak Summary Report

Project Name: Antocianinas_Hidrolizadas



Sample Name: E4MLSH Date Acquired: 2/7/06 7:40:34 PM Vial: 4 Injecti

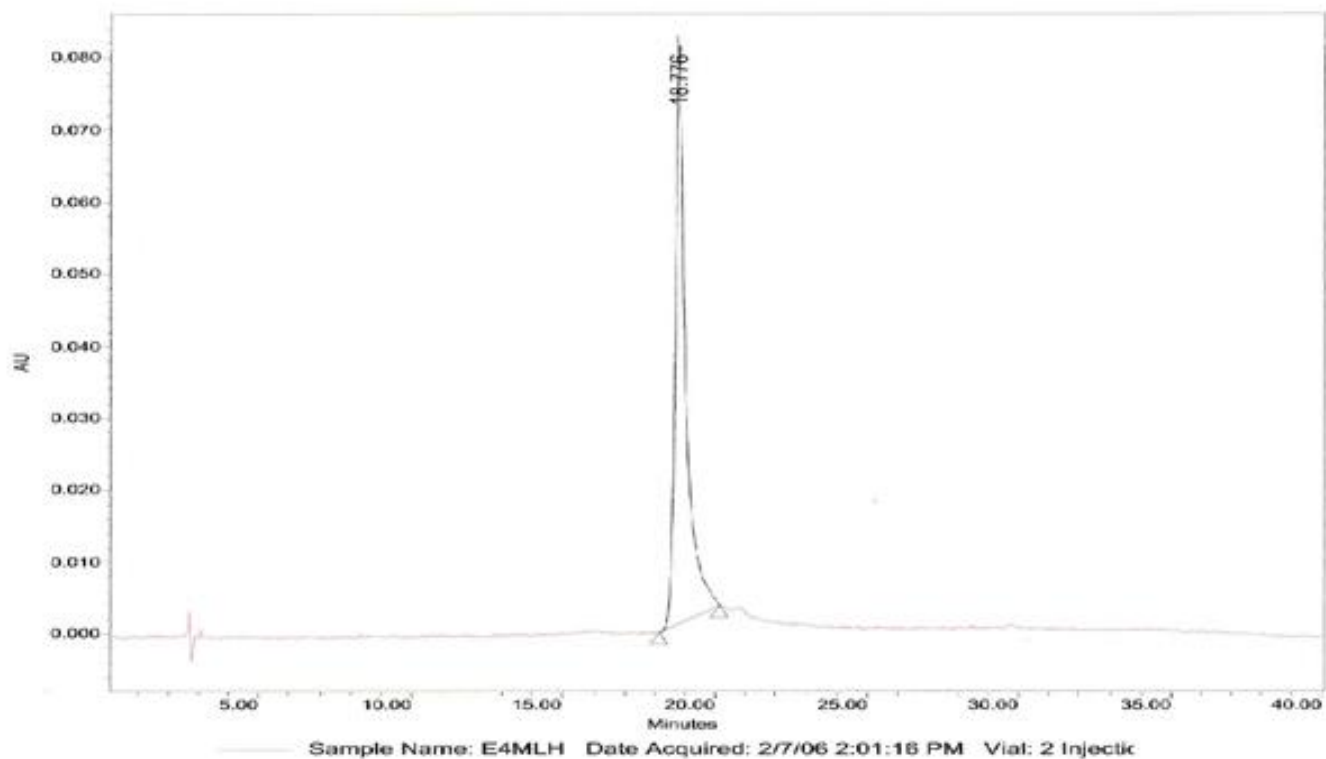
Muestras liofilizadas sin hidrolizar



Reported by User: System

Peak Summary Report

Project Name: Antocianinas_Hidrolizadas



Muestras liofilizadas hidrolizadas

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Miguel Aguilera Ortíz

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: CARACTERIZACIÓN Y ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE HIGO Ficus carica VARIEDAD Misión CULTIVADO EN CIUDAD LERDO DURANGO, MÉXICO

Campo de Estudio: Ciencia de Alimentos

Biografía:

Nacido en La Aurora, Durango el 19 de agosto de 1971, hijo de Margarito Aguilera Urbina (†) y Genoveva Ortiz Fernández.

Educación:

Ingeniero en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, egresado de la Escuela de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Título obtenido en 1994.

Maestro en Ciencias en Alimentos, egresado del Instituto Tecnológico de Durango. Título obtenido en 1998.

Experiencia Profesional:

Docente en nivel superior desde 1996.

Profesor de tiempo completo en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango desde Agosto de 1999 a la fecha.

Actividades de investigación científica desde 1998 en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Miembro del cuerpo académico "Ciencia y Tecnología de Alimentos" de la FCQ de la UJED.