



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Desarrollo de un colorante y saborizante de *Rubus glaucus* por maceración en frío para su posterior análisis fitoquímico, de estabilidad y sensorial.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autor:

Andrés Patricio Crespo Donoso

CI: 0104109632

Correo electrónico: andrescrespo1994@gmail.com

Directora:

Dra. Silvana Patricia Donoso Moscoso, MSc.

CI: 0102590569

**Cuenca - Ecuador**

22-junio-2020



## Resumen

El presente trabajo se llevó a cabo en el periodo de noviembre 2019 – febrero 2020, en el Laboratorio de Alimentos del Departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca, en donde se extrajo el colorante y saborizante de la mora (*Rubus glaucus*) por el método de maceración en frío, con el fin de presentar una opción natural a los colorantes y saborizantes artificiales de venta comercial. Se realizaron pruebas cualitativas para la identificación de flavonoides por el método de Shinoda, Zn/HCl e NaOH 1N y de antocianinas por el método de pH ácido y alcalino, los cuales presentaron resultados positivos para presencia de dichas sustancias. Se desarrollaron estudios de estabilidad del producto a diferentes temperaturas, pH y condiciones de luz; se observó que el extracto obtenido posee mayor estabilidad en obscuridad y a temperatura de refrigeración. Al ser el producto para consumo alimenticio, este debe ser inocuo para el consumidor por lo que se realizaron pruebas de control microbiológico para *E. coli*, Coliformes totales, Mohos y Levaduras obteniendo resultados negativos para todos estos microorganismos. Una vez finalizada las pruebas microbiológicas, se procedió a hacer el análisis sensorial de aceptación por el consumidor del producto, obteniéndose que a una concentración de 17,5 ml del extracto en 100 ml de yogurt natural hubo la mayor aceptación.

**Palabras Clave:** Mora, *Rubus glaucus*, Colorante natural, Saborizante natural, Antocianinas, Flavonoides.



## **Abstract**

This work was carried out during the period from November 2019 - February 2020, in the Food Laboratory of the Biosciences Department of the “Universidad de Cuenca”. Where the dye and flavoring of the blackberry was extracted using the cold maceration method. Qualitative tests were accomplished using the Shinoda method, Zn/HCl and NaOH 1N for the identification of Flavonoids. And, the acidic and alkaline pH method for the identification of Anthocyanins. These tests presented positive results for such substances. Stability studies of the product were tested at different temperatures, pH, light, and darkness. Which demonstrated that the extract has greater stability in the dark and at refrigeration temperature. The product for being food, it must be harmless to the consumer. So, microbiological control tests were carried out for *E. coli*, total coliforms, molds, and yeasts. Obtaining negative results for all these microorganisms. Once the microbiological tests were completed, the sensorial analysis of consumer acceptance of the product was carried out. The results obtained showed that at a concentration of 17.5 ml of the extract in 100 ml of natural yogurt was the greatest acceptance.

**Keywords:** Blackberry, *Rubus glaucus*, Natural dye, Natural flavors, Anthocyanins, Flavonoids.



## Índice

<b>Introducción</b> .....	9
<b>Objetivos:</b> .....	10
<b>Capítulo I</b> .....	11
<b>Marco Teórico.</b> .....	11
<b>1. Mora</b> .....	11
<b>1.1. Taxonomía de la mora</b> .....	11
<b>1.2. Descripción Botánica</b> .....	11
<b>1.3. Zonas de producción</b> .....	13
<b>2. Sustancias químicas provenientes de la mora</b> .....	16
<b>2.1. Flavonoides</b> .....	16
<b>2.1.1. Estructura química de los flavonoides</b> .....	16
<b>2.2. Antocianinas</b> .....	16
<b>2.2.1. Estructura química de antocianinas</b> .....	17
<b>2.2.2. Propiedades de color de antocianinas</b> .....	17
<b>2.2.3. Biosíntesis de las antocianinas</b> .....	17
<b>2.2.4. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas</b> .....	18
<b>2.2.5. Funciones de las antocianinas</b> .....	20
<b>3. Aditivos</b> .....	21
<b>3.1. Colorantes</b> .....	21
<b>3.1.1. Factores que alteran la estabilidad del colorante</b> .....	22
<b>3.2. Clasificación de los colorantes</b> .....	22
<b>3.3. Ventajas y Desventajas de colorantes naturales</b> .....	25
<b>4.1. Saborizante</b> .....	26
<b>5. Estabilidad</b> .....	27
<b>5.1. Alteraciones de un alimento</b> .....	27
<b>5.2. Mecanismos de conservación de alimentos</b> .....	29
<b>6. Análisis sensorial</b> .....	30
<b>6.1. Aplicaciones del análisis sensorial</b> .....	30
<b>Capítulo II</b> .....	31
<b>7. Metodología</b> .....	31
<b>7.1. Muestra Vegetal</b> .....	31
<b>7.2. Maceración en frío</b> .....	32
<b>7.3. Determinación cualitativa de antocianinas y flavonoides</b> .....	33
<b>7.4. Determinación de estabilidad de pH, luz y temperatura</b> .....	34



<b>7.5. Análisis Microbiológico</b> .....	35
<b>7.6. Análisis Sensorial</b> .....	36
<b>Capítulo III</b> .....	36
<b>8. Resultados y Discusiones</b> .....	36
<b>8.1. Prueba de identificación de Flavonoides y Antocianinas</b> .....	36
<b>8.2. Pruebas de estabilidad</b> .....	38
<b>8.3. Análisis Microbiológico</b> .....	41
<b>8.4. Análisis Sensorial, Interpretación de resultados.</b> .....	42
<b>9. Conclusiones</b> .....	45
<b>10. Recomendaciones</b> .....	46
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	54



## Cláusulas

### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Andrés Patricio Crespo Donoso en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Desarrollo de un colorante y saborizante de *Rubus glaucus* por maceración en frío para su posterior análisis fitoquímico, de estabilidad y sensorial”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22/06/2020

---

Andrés Patricio Crespo Donoso

C.I: 0104109632



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Andrés Patricio Crespo Donoso autor del trabajo de titulación “Desarrollo de un colorante y saborizante de *Rubus glaucus* por maceración en frío para su posterior análisis fitoquímico, de estabilidad y sensorial”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 22/06/2020

---

Andrés Patricio Crespo Donoso

C. I: 0104109632



## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios, a mis padres y hermanos que me dieron el apoyo para seguir adelante y me ayudaron a lo largo de mi carrera, a mis amigos que me apoyaron durante todo este proceso, a mis profesores quienes fueron los que impartieron sus conocimientos para mi aprendizaje, a la Dra. Silvana Donoso quien me dio la oportunidad de trabajar en este proyecto de titulación y me guio durante todo el proceso.

## **Dedicatoria**

Me gustaría dedicar este proyecto de titulación a mis padres ya que ellos han sido un pilar fundamental en mi vida, me han apoyado en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y sobre todo han estado presentes cuando más los necesitaba.



## Introducción

El color en los alimentos es una cualidad importante, e incluso se lo considera como un factor psicológico de aceptación al momento de la selección del alimento. El color y sabor es un parámetro que nos asegura una buena calidad del producto (Calvo Domper, 2017). Los colorantes alimenticios tienen un papel relevante entre los aditivos ya que la apariencia de un alimento es de gran importancia y estos pueden ser utilizados para resaltar el color original del alimento o aportarle el color perdido por la manipulación del mismo durante su producción (Rocío Sánchez, 2013).

La utilización de colorantes naturales se remonta a miles de años, en la edad media, la gente ya usaba colorantes como el ocre, los extractos de acelgas, de zanahorias o de hierbas para darle un mejor aspecto a sus comidas y sin causarles daño en su salud. Se conoce que en el siglo XIX los colorantes naturales fueron sustituidos por cromato de plomo, sulfito de mercurio, arseniato de cobre o brea de hulla, los cuales fueron prohibidos en 1887 por sus efectos tóxicos. Más tarde en la mitad del siglo XIX fueron descubiertos los colorantes azoicos que por principio solo utilizaban en productos textiles y que, posteriormente, fueron usados en los alimentos. Sin embargo, en 1939 científicos japoneses pudieron determinar que al usar frecuentemente un colorante azoico producía cáncer en los animales de experimentación, lo cual llevó a la prohibición de estos para fines alimenticios. Después de largos estudios a lo largo de los años estos colorantes fueron permitidos nuevamente en el mercado. Hoy en día aún se sigue discutiendo sobre la toxicidad de los colorantes azoicos (Rocío Sánchez, 2013).

En los últimos años se ha podido observar una gran mejora con respecto a la calidad y variedad de colorantes provenientes de fuentes naturales. Estos son más inocuos que los colorantes sintéticos ya que presentan distintas propiedades beneficiosas para la salud, tal es el caso de los carotenoides y antocianinas, compuestos que son conocidos por sus efectos antioxidantes, así como efectos protectores contra enfermedades crónicas degenerativas y distintos tipos de cáncer (Carmona, 2013).

Las investigaciones en busca de nuevas fuentes de colorantes naturales continúan, por lo que el presente trabajo se basó en obtener un colorante y saborizante natural a partir de *Rubus glaucus* (mora andina) por el método de maceración en frío.



Esta investigación tuvo como objetivo dar a conocer una nueva fuente de colorante y saborizante natural como lo es la mora andina, ya que en el Ecuador se puede acceder fácilmente a esta fruta y así abrir paso a una nueva industria alimentaria en donde se pueda usar más colorantes y saborizantes naturales en diversos productos alimenticios.

**Objetivos:**

**Objetivo General:**

- Desarrollar un colorante y saborizante de *Rubus glaucus* (mora andina) por maceración en frío para su posterior análisis fitoquímico, de estabilidad y sensorial.

**Objetivos Específicos:**

- Determinación cualitativa de antocianinas y flavonoides del extracto.
- Determinación de la estabilidad de las características organolépticas del producto con respecto a condiciones de almacenamiento de pH, luz y temperatura.
- Análisis microbiológico del extracto.
- Análisis sensorial del producto terminado, para su aceptación por el consumidor.

## Capítulo I

### Marco Teórico.

#### 1. Mora

La mora silvestre, también denominada zarzamora o frambuesa negra, se trata de un fruto que crece en arbustos de la familia de las Rosáceas (Luis Román, 2012). Es una fruta con un aporte calórico bajo ya que presenta baja cantidad de hidratos de carbono, su aporte calórico es de 23 kcal por 100g de fruta que es alrededor del 2% de la cantidad diaria necesaria (Villarreal, 2014).

##### 1.1. Taxonomía de la mora

Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Rubus
Especie	glaucus
Nombre científico	<i>Rubus glaucus</i>
Nombre común	Mora de castilla, mora andina, zarzamora azul

**Tabla 1.** Taxonomía de la mora (López González & Gómez Santos, 2008).

##### 1.2. Descripción Botánica

###### 1.2.1. Raíces

Las raíces son de tipo fasciculado las cuales se distribuyen de forma horizontal entre los primeros 30 centímetros del suelo y con longitudes entre 0.5 m a 1.2 m dependiendo del tipo de suelo, la existencia de nutrientes, la humedad y temperatura del suelo. Las raíces cumplen funciones de sostén y a lo largo de las raíces primarias se extienden raíces secundarias y terciarias con funciones de absorber el agua y nutrientes del suelo (Castro Retana & Cerdas Araya, 2005; Germán et al., 2002).

###### 1.2.2. Tallo

Los tallos son bianuales, estos son de longitud variable entre 3 y 4 metros y pueden alcanzar hasta una altura de 2 metros de alto, miden entre 1.5 a 2.5 centímetros de diámetro, contienen espinas curvas, su coloración va desde un cenizo al rojo, también pueden estar cubiertas de un fino polvo color azul blanquecino y otros pueden tener un

color verde y café oscuro, los tallos están compuestos por tallos primarios también conocido como tallos productivos, tallos secundarios como vegetativos y los terciarios o látigo que no producen frutos (Gráfico 1) (Castillo, 2013; Villarreal, 2014).



**Gráfico 1. Tallos de la planta de la mora (Infoagro Systems, S.L., s. f.).**

### 1.2.3. Flor

Las flores son hermafroditas y actinomorfas, de color blancas de 2 a 2.5 centímetros de diámetro y se disponen en racimos en las puntas de las ramas o a veces toda la rama, poseen 5 sépalos permanentes y 5 pétalos, poseen estambres y carpelos los cuales están compuestos de 1 ovario, 2 óvulos y 1 pistilo largo (Gráfico 2) (Castillo, 2013; Germán et al., 2002).



**Gráfico 2. Flor de la planta de la mora (Infoagro Systems, S.L., s. f.).**

#### 1.2.4. Fruto

El fruto es de tipo compuesto y agregado, cada bolita que se puede diferenciar en un fruto de mora se llama drupa que en su interior contiene la semilla y está unida a un eje común, tienen forma esférica o elipsoide y pueden ser de diferentes tamaños (grande, mediano o pequeño), los frutos pueden madurar de forma dispareja ya que la floración no es homogénea, miden entre 1.5 a 2.5 centímetros de largo y 1.5 a 2 centímetros de diámetro, su coloración también depende del estado de maduración del fruto estos pueden ser un color rojo a un púrpura o rojo oscuro, su peso es de 3 a 5 gramos, su consistencia es dura y su sabor es agridulce cuando es tierna y mientras va madurando se va haciendo más dulce (Gráfico 3) (Castillo, 2013; Castro Retana & Cerdas Araya, 2005; Villarreal, 2014).



**Gráfico 3. Fruto de la planta de la mora** (Infoagro Systems, S.L., s. f.).

#### 1.2.5. Hojas

Poseen hojas trifoliadas y/o pentafoliadas, su ubicación en los tallos es alterna de peciolo blanquecino, cilíndrico y cubierto de espinas, los folíolos son ovoides de 5 a 12 centímetros de largo, verde oscuro en el haz y blanquecinos en el envés (Castillo, 2013; Castro Retana & Cerdas Araya, 2005).

#### 1.3. Zonas de producción

En América la mora se encuentra en zonas altas tropicales principalmente en Ecuador, Colombia, Panamá, Guatemala, Honduras, México y El Salvador (Villarreal, 2014). En

Ecuador gracias a los datos del tercer censo nacional agropecuario realizado por la INEC en el año 2000 la producción de mora se estima en 10283 toneladas/año (Delgado Orellana, 2012).

Según el INEC (2000), las provincias de mayor producción de mora de castilla son: Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Gráfico 4), siendo Tungurahua la principal provincia que produce la mora de Castilla, con un 70% de superficie plantada aproximadamente 2200 ha. (Castillo, 2013; Martínez Salinas et al., 2007).



**Gráfico 4.** Distribución de las zonas más productoras de mora del Ecuador INEC (2000).

La mora es una de las frutas de mayor consumo diario por las familias ecuatorianas, con una demanda de 2 kg/familia/semana, especialmente en la región costa. (Martínez Salinas et al., 2007).

A continuación, se muestra en la Tabla 2 la composición nutricional de la mora de castilla.

**Tabla 2. Composición nutricional de mora de castilla.**

<b>Factor Nutricional</b>	<b>Cantidad / 100g de fruto</b>
Ac Ascórbico	8 mg
Agua	92.8 g
Calcio	42 mg
Calorías	23 Kcal
Carbohidratos	5.6 g
Cenizas	0.4 g
Fibra	0.5 g
Fósforo	10 mg
Grasa	0.1 g
Hierro	1.7 mg
Niacina	0.3 mg
Proteínas	0.6 g
Riboflavina	0.05 mg
Tiamina	0.02 mg

Fuente: (Martínez Salinas et al., 2007)

La mora andina también es fuente de vitaminas y polifenoles, dentro de las vitaminas podemos encontrar la vitamina A, C, E, K y el ácido fólico. La vitamina A ayuda con la visión, su deficiencia puede producir ceguera nocturna, otra función es en la diferenciación de las células en el sistema inmune el cual va a producir un buen funcionamiento de este, evitando así enfermedades infecciosas (Harper et al., 2013). La vitamina C es necesaria para la síntesis de colágeno, mejora la absorción de hierro provenientes de alimentos de origen vegetal y está relacionada a ayudar a disminuir la duración y la intensidad de los síntomas de una gripe común (Harper et al., 2013; Takaki et al., 2013). La vitamina E actúa como antioxidante protegiendo a los lípidos y a otros componentes de las células del estrés oxidativo (Takaki et al., 2013). La vitamina K permite la absorción de calcio y ayuda en la coagulación sanguínea (Ávila Cubillos, 2015). El ácido fólico ayuda a la formación del ADN y desarrollo de los glóbulos rojos. Los polifenoles están relacionados con la prevención del cáncer ya que estos son antioxidantes y dentro de estos se encuentra las antocianinas (que le confieren color a la mora) y el ácido elágico (Ávila Cubillos, 2015).

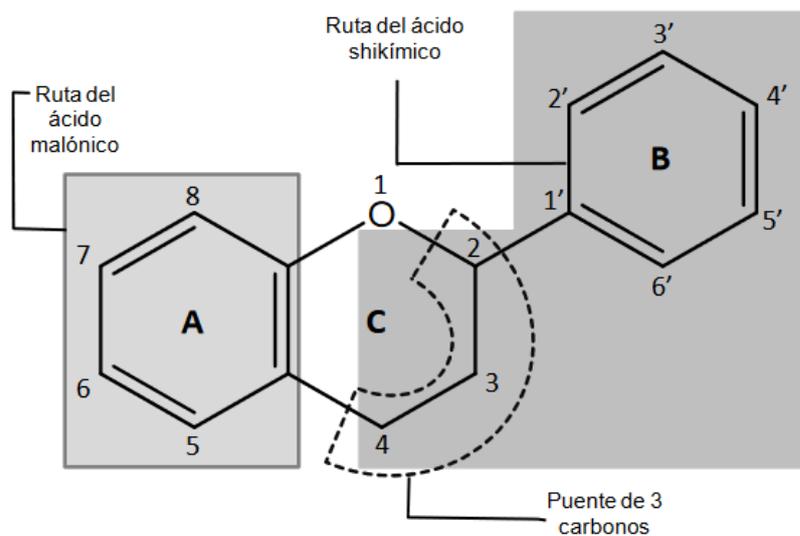
## 2. Sustancias químicas provenientes de la mora.

### 2.1. Flavonoides

Son compuestos fenólicos que forman parte del metabolismo secundario de las plantas, estos son solubles en agua y de bajo peso molecular, son sintetizados en el cloroplasto o citoplasma de la célula y posteriormente son glicosilados y transportados a las vacuolas en donde son almacenados (Castañeda Vázquez, 2010).

#### 2.1.1. Estructura química de los flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura química con un esqueleto común (Gráfico 5). De manera general tiene dos anillos bencénicos que están unidos a través de una cadena de 3 átomos de carbono ( $C_6C_3C_6$ ). Los átomos de carbono en los anillos A y C se numeran del 2 al 8 y los del anillo B desde el 1' al 6' (Martínez Flórez et al., 2002; Martínez M, 2005).



**Gráfico 5.** Estructura general de los flavonoides, proveniente de los productos de la ruta del ácido shikímico y el ácido malónico. La numeración es de acuerdo a la posición de los sustituyentes de cada flavonoide (Castañeda Vázquez, 2010).

### 2.2. Antocianinas

Son compuestos fenólicos que pertenecen a la familia de los flavonoides y forman parte del metabolismo secundario, son pigmentos solubles en agua y son los encargados de transferir el color rosa, rojo, violeta y azulado a flores y frutos, son sintetizados en el



citoplasma y almacenadas en las vacuolas, la función de las antocianinas en las plantas es para atraer a insectos y así ayudar en la polinización y para la protección contra efectos de la radiación ultravioleta e incluso contra la contaminación microbiana (Castañeda Vázquez, 2010; Díaz Rincón, 2019).

### **2.2.1. Estructura química de antocianinas**

Las antocianinas al ser de la familia de los flavonoides comparten la misma estructura química (Gráfico 5), es decir está compuesto por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de tres átomos de carbono.

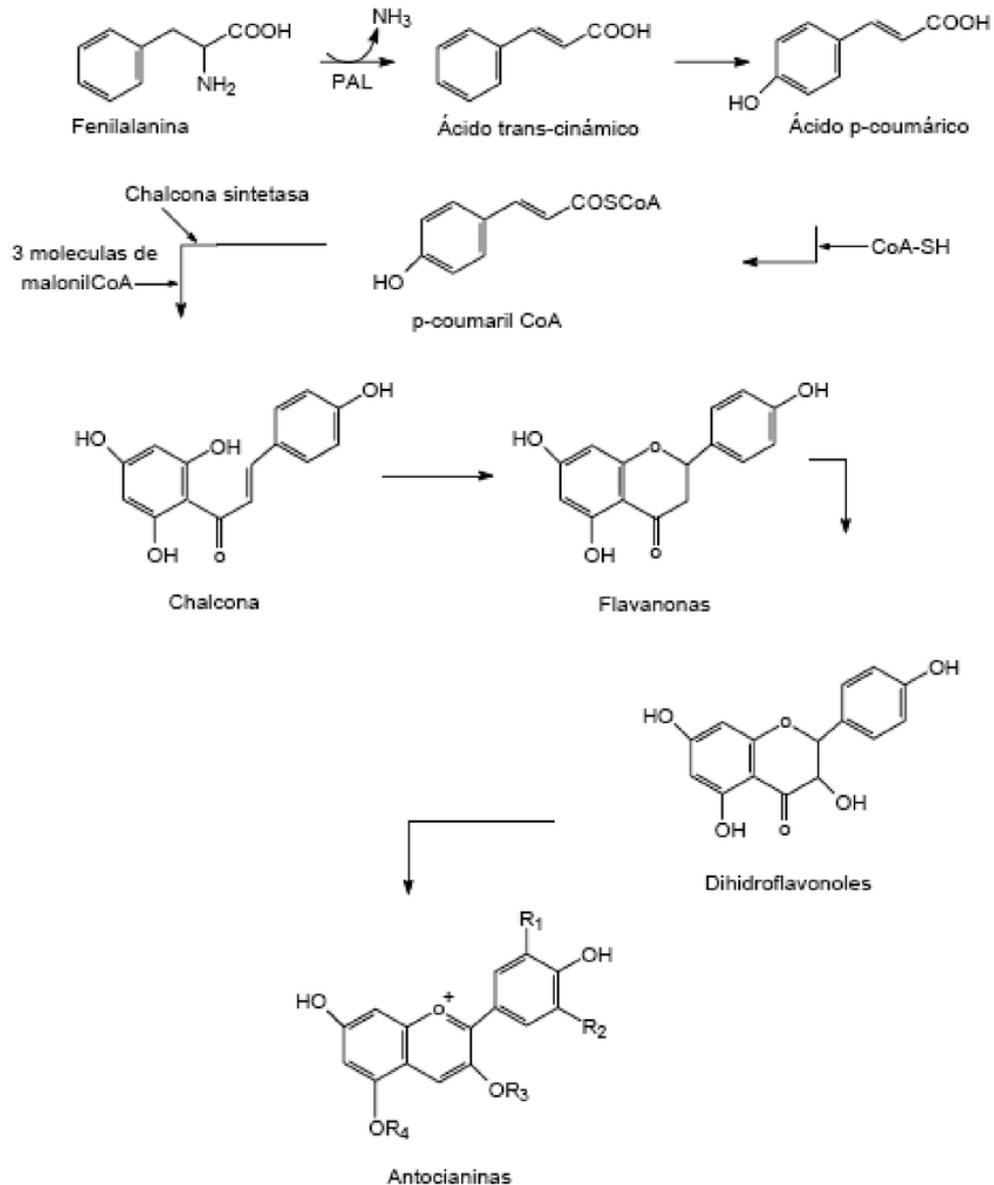
### **2.2.2. Propiedades de color de antocianinas**

El color de las antocianinas va a depender de los números y orientaciones de los grupos hidroxilo (OH) y metoxilo (OCH<sub>3</sub>) de la molécula, mientras más grupos OH tenga la molécula dará una tonalidad azulada y mientras más grupos OCH<sub>3</sub> tenga dará una tonalidad roja. Las antocianinas pueden presentar sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 en forma de mono, di o trisacárido, dentro de estas sustituciones podemos tener la glucosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentiobiosa. Otra variación en la estructura de las antocianinas tenemos la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos, estos pueden ser alifáticos o aromáticos, con estas sustituciones tanto glicosídica y acilaciones aromáticas en la posición 5 producen una tonalidad púrpura (Garzón, 2008).

### **2.2.3. Biosíntesis de las antocianinas**

La síntesis de las antocianinas comienza en el anillo A con la ruta del ácido malónico mediante la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que la síntesis del anillo B comienza por la ruta del ácido shikímico (Gráfico 5). El ácido shikímico da paso a la fenilalanina por la acción de la enzima fenilalanina amonía liasa (PAL) y con una posterior pérdida de NH<sub>3</sub> se convierte en ácido p-coumárico, con la adición de una CoA-SH para transformarse en p-coumaril CoA el cual participa en una reacción de condensación con las moléculas de malonil CoA para formar una chalcona de 15 átomos de carbono por la enzima chalcona sintetasa, esta molécula de 15 átomos de carbono se transforma en una flavona catalizada por la enzima chalcona isomerasa. Finalmente, la flavona es transformada en la antocianidina por la adición de un grupo hidroxilo (OH) en

el carbono 3 seguido por una deshidratación (Gráfico 6). La molécula de antocianidina se puede estabilizar por una glicosilación del heterociclo o por metilaciones de OH después de la alcanoilación (Díaz Rincón, 2019; Garzón, 2008).



**Gráfico 6.** Ruta general de biosíntesis de las antocianinas (Delgado Vargas et al., 2000).

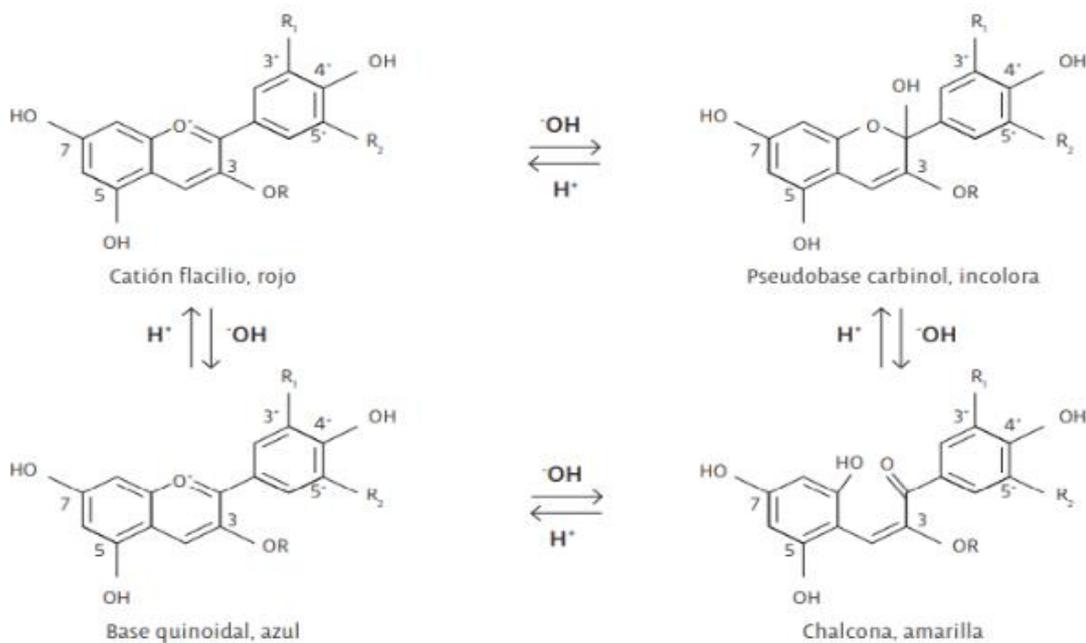
#### 2.2.4. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

Existen varios factores que afectan la estabilidad y degradan el colorante de las antocianinas debido a que es un compuesto inestable y se puede sufrir cambios por la variación de pH, temperatura, luz, oxígeno y ácido ascórbico.

### 2.2.4.1. Efecto del pH

El pH en las antocianinas va a tener un efecto en la estructura química y en su estabilidad (Gráfico 7), en algunos de estos casos el efecto puede ser reversible por la variación del pH debido a que estos compuestos son más estables a pH ácido ya que la acidez tiene un efecto protector en la molécula. A pH inferiores que dos se encuentra en forma de ion oxonio o catión flavilio que es su forma más estable mostrando así una coloración roja intensa. A pH más elevados ocurre la adición de una molécula de agua en la posición 2 y la pérdida de un protón dando lugar a la forma pseudobase carbinol y chalcona que dan una coloración incolora y amarilla respectivamente. A un pH mayor a 7 se va a producir la forma quinoidal que nos produce una coloración azulada que se degrada rápidamente por el oxígeno (Díaz Rincón, 2019; Garzón, 2008).

**Gráfico 7.** Efectos del pH en las antocianinas (Sunganya et al., 2012).



Referencia: (Castañeda Sánchez & Guerrero Beltrán, 2015).

### 2.2.4.2. Efecto de la temperatura

La temperatura es un factor a tener en cuenta en la estabilidad de las antocianinas ya que a una temperatura mayor de 40 °C produce la ruptura del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula provocando la formación de aglicona y la ruptura hidrolítica que genera la formación de chalconas incoloras (Díaz Rincón, 2019; Garzón, 2008).



### **2.2.4.3. Efectos de la luz**

Las antocianinas al estar en contacto con la luz producen cambios en la molécula con la sustitución del hidroxilo en el carbono cinco el cual produce que los pigmentos sean más sensibles a la fotodegradación. Sin embargo, las antocianinas tienen una propiedad de interacción molecular con otros pigmentos llamado copigmentación que pueden ser con flavonoides, alcaloides, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos metales y aminoácidos que sirven contra los ataques nucleofílicos del agua que generan la decoloración de dicha sustancia (Díaz Rincón, 2019).

### **2.2.4.4. Efecto del oxígeno y ácido ascórbico**

Ya que la mayoría de frutas contiene ácido ascórbico esto va a influir junto con la luz, madurez del fruto y con la disponibilidad del oxígeno ya que va a producir formación de peróxido de hidrógeno durante la oxidación y de esta forma va a ver una degradación del color (Díaz Rincón, 2019).

### **2.2.5. Funciones de las antocianinas**

La principal función de las antocianinas es de aportar el color rojo, azul o violeta a los frutos, flores y hojas (Leguizamón et al., 2005), sin embargo, las antocianinas tienen muchas más funciones como las de cumplir papeles de defensa, papel de señal química y tener efectos sobre las enzimas. Las antocianinas ayudan a la defensa de las plantas contra agentes externos y ante situaciones de estrés, entre estos agentes tenemos los rayos UV, los microorganismos tanto bacterias como hongos y los insectos. Dentro de las señales químicas las antocianinas sirven para guiar a insectos polinizadores hacia el néctar y de esta manera facilitar este proceso (Cartaya & Reynaldo, 2001; Castañeda Vázquez, 2010). Las antocianinas funcionan contra los radicales libres en plantas al generar sustancias antioxidantes, estos radicales libres se pueden formar en las plantas al estar en contacto con periodos fuertes o largos de luz solar y al estar a temperaturas extremas, por ellos también funcionan como fotoprotectores y evitan de esta forma la fotooxidación (Castañeda Vázquez, 2010). Dentro de los últimos años se ha visto un gran interés en dicha sustancia ya que también nos aporta funciones farmacológicas y terapéuticas, en mamíferos se ha visto que durante el paso de antocianinas del tracto digestivo al torrente sanguíneo estas permanecen intactas y así ejercen su efecto terapéutico como por ejemplo reducir enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales,



antiinflamatorios y antidiabéticos, estos efectos terapéuticos están relacionados por su actividad antioxidante (Aguilera Ortiz et al., 2011).

### **3. Aditivos**

Según la norma general para los aditivos alimentarios (CODEX STAN 192-1995, IDT) lo define como “Cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.”

#### **3.1. Colorantes**

Según la (FDA, 2019) un colorante se define como “Un color, pigmento o sustancia el cual es capaz de colorear alimentos, medicamentos, cosméticos o alguna parte del cuerpo humano”

Los colorantes en los alimentos se utilizan por varias razones:

1. Para compensar la pérdida de color por luz, temperaturas altas, aire y condicione de almacenamiento
2. Para corregir la variación natural del color
3. Intensificar el color de algunos alimentos si estos son débiles o poco uniformes
4. Mejorar el aspecto de ciertos alimentos y así hacerlos más llamativos y apetecibles

Los colorantes para ser utilizados deben tener ciertos requisitos:

- Ser inocuo, es decir que no sean perjudiciales para la salud del consumidor
- Tener un gran poder tintóreo, es decir que se utilice la menor cantidad posible del colorante para incorporarlo al producto
- Ser estable al calor y a la luz



- No deben poseer ni transmitir olores ni sabores desagradables al producto que se lo vaya a usar
- Ser indiferente al pH, agentes oxidantes y reductores
- Ser lo más económico posible (Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

### **3.1.1. Factores que alteran la estabilidad del colorante**

La luz y la temperatura son las principales causas del deterioro de los colorantes, otra causa también es el pH ya que los colorantes no son estables a todos los rangos de este (Rojano et al., 2012). Algunos colorantes sufren alteraciones por la presencia de metales o cuando son expuestos a ciertos azúcares, aldehídos, peróxidos y ácidos. Para evitar la descomposición del colorante por agentes microbianos se deben utilizar métodos como la pasteurización o liofilización o la adición de sustancias como sal o conservantes (Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

## **3.2. Clasificación de los colorantes**

### **3.2.1. Colorantes Naturales**

Según la (FDA, 2019) un colorante natural o colorante no certificado son aquellos pigmentos derivados de fuentes naturales como vegetales, minerales o animales.

Entre los colorantes naturales se distinguen los hidrosolubles o solubles en agua, los liposolubles o solubles en grasa o aceite y los minerales (Tabla 3) (Voss & Cécile, 2006).

**Tabla 3. Clasificación de colorantes naturales.**

<b>COLORANTES NATURALES HIDROSOLUBLES</b>	
Curcumina (E 100)	Riboflavina, lactoflavina o B2 (E 101)
Cochinilla o ácido carmínico (E 120)	Caramelo (E 150)
Betanina o rojo de remolacha (E 162)	Antocianos (E 163)
<b>COLORANTES NATURALES LIPOSOLUBLES</b>	
Clorofila (E 140 y 141)	Carotenoides (E 160)
Xantofilas (E 161)	
<b>MINERALES</b>	
Carbón vegetal (E 153)	Carbonato cálcico (E 170)
Dióxido de titanio (E 171)	Óxidos e hidróxidos de hierro (E 172)
Aluminio (E 173)	Plata (E 174)
Oro (E 175)	

Fuente: (Voss &amp; Cécile, 2006)

### **3.2.1.1. Colorantes hidrosolubles**

Como su nombre lo indica, son colorantes que son solubles en agua sin que pierdan sus características y funciones, al ser diluidos en agua el colorante es más homogéneo y de fácil aplicación, estos colorantes se pueden encontrar en forma de polvo o en su presentación líquida como la curcumina, cochinilla, antocianos, caramelo, entre otros (QuimiNet, 2011).

### **3.2.1.2. Colorantes liposolubles**

Como su nombre lo indica son colorantes que son solubles en aceite o grasa, dentro de estos colorantes tenemos a la clorofila que aporta un color verde y es utilizado en chicles, dulces y licores. Los carotenoides que aportan un color naranja amarillento y protege de la descomposición por oxidación. Las xantofilas que aportan un color naranja que proviene del aceite de palma o de la yema de huevo es utilizado en salsas, condimentos, pasteles y galletas, todos estos colorantes se consideran inocuos (Rocío Sánchez, 2013).

### **3.2.1.3. Colorantes minerales**

Los colorantes minerales son provenientes de la naturaleza entre estos tenemos carbón vegetal que aportan el color negro y son utilizados en quesos y grageas. El carbonato

cálcico que aporta un color blanco grisáceo que también se utilizan en quesos, grageas y alimentos para bebés. Dióxido de titanio que aporta un color blanco, pero este no es muy recomendable su uso ya que se ha descrito efectos cancerígenos. Plata que aporta un color plateado, este es bactericida y es utilizado en licores, este resulta inofensivo si es ingerido en mínimas cantidades (Rocío Sánchez, 2013).

### 3.2.2. Colorantes Artificiales

Dentro de este grupo constan aquellos colorantes que no se encuentran en la naturaleza y deben ser sintetizados mediante procesos de síntesis química (Ortega Parra, 2004).

Entre los colorantes artificiales se distinguen los colorantes azoicos y no azoicos (Tabla 4).

Los colorantes azoicos deben su color al grupo azo  $-N=N-$  conjugando con anillos aromáticos por ambos extremos (Gráfico 8) (Rocío Sánchez, 2013).

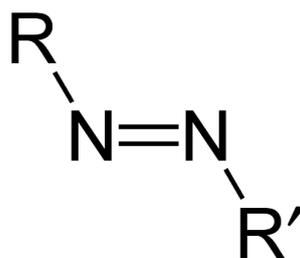


Gráfico 8. Estructura química del grupo azoico.

Tabla 4. Clasificación de colorantes sintéticos.

COLORANTES SINTÉTICOS AZOICOS	
Tartazina (E 102)	Rojo allura AC (E 129)
Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E 110)	Negro brillante BN (E 151)
Amaranto (E 123)	Marrón FK (E 154)*
Rojo cochinilla A o rojo Ponceau 4R (E 124)	Litol Rubina BK (E 180)**
Rojo 2G (E 128)*	Marron HT (E 155)*
Azorrubina, carmoisina (E 122)	
COLORANTES SINTÉTICOS NO AZOICOS	
Amarillo de quinoleína (E 104)	Indigotina o carmín de índigo (E 132)
Eritrosina (E 127)	Azul brillante FCF (E 133)



Azul patentado V (E 131)	Verde ácido brillante BS (E 142)
--------------------------	----------------------------------

Fuente: (Voss & Cécile, 2006)

\* Se utilizan, entre los países desarrollados, prácticamente sólo en el Reino Unido.

\*\* Se utiliza exclusivamente para teñir la corteza de algunos quesos.

Este tipo de colorantes son solubles en agua ya que presentan grupos de ácido sulfónico, estos son fáciles de usar cuando están en forma de sales sódicas, en líquidos y materiales pastosos. Además de ser mucho más fáciles de usar que los colorantes naturales estos son más resistentes a la temperatura, pH y luz con algunas excepciones como la indigotina, eritrosina y el verde ácido brillante que son sensibles a la exposición con la luz (Rocío Sánchez, 2013).

### **3.3. Ventajas y Desventajas de colorantes naturales**

Aunque los colorantes sintéticos son más efectivos al momento de teñir o aportar el color, también no hay que perder de vista que estos pueden causar un daño a la salud del consumidor (Ulloa Alvarado María, 2017).

#### **3.3.2. Colorantes naturales.**

##### **Ventajas**

- Tienen efectos positivos sobre la salud al contener sustancias como antocianinas, flavonoides, carotenoides, etc.
- Son ricos en vitaminas
- Son inocuos para el consumidor
- No son tóxicos
- No producen alergias, hiperactividad ni déficit de atención en niños
- No tienen efectos carcinogénicos

##### **Desventajas**

- Carecen de fuerza tintórea
- Pueden aportar sabores y olores indeseados al producto.

(Ulloa Alvarado María, 2017).



## **4. Sabor**

Según la RAE define al sabor como “Sensación que ciertos cuerpos producen en el órgano del gusto” (RAE, 2019). El término “sabor” denota un conjunto complejo de propiedades olfativas y gustativas que son percibidos al probar y que pueden ser influenciados por el tacto, temperatura, dolor e incluso efectos sinestésicos (Astray et al., 2007).

### **4.1. Saborizante**

Son sustancias con propiedades sápidas capaces de intensificar o conferir sabor a los alimentos (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

El saborizante de mora obtenido por maceración en frío brinda un auténtico sabor a mora natural y madura que puede ser utilizado en diversos productos alimentarios como yogurt, jugos, pasteles, entre otros.

Dentro de los saborizantes se cuentan con los naturales y sintéticos.

Los saborizantes naturales son aquellos que son obtenidos a partir de materia prima natural, se entiende como materia prima natural a los productos de origen animal o vegetal aceptables para el consumo humano que contengan sustancias sápidas (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

Dentro de este grupo están:

#### **Aceites esenciales:**

- Se obtienen a partir de los productos volátiles de origen vegetal mediante procesos físicos como el método de arrastre de vapor con agua (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

#### **Extractos:**

- Se obtienen por agotamiento en frío o caliente con solventes permitidos a partir de productos vegetales o animales. En esta categoría se encuentran los extractos líquidos y secos (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

#### **Bálsamos:**

- Se obtienen a partir de productos vegetales mediante exudación libre o provocada (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

Los saborizantes artificiales o sintéticos son aquellos compuestos que son obtenidos por procesos químicos o por síntesis (Mercosur/GMC/RES. N 10/06).

## 5. Estabilidad

Según (Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2014) definen a la vida útil del alimento como “El tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento, en las que tendrá una pérdida de sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas y sufrirá un cambio en su perfil microbiológico”.

Entre los factores que influyen la vida útil del alimento tenemos:

- La naturaleza de la materia prima
- Ingredientes y aditivos que contenga el alimento
- Condiciones sanitarias del proceso
- Empaque o envase del producto
- Buenas condiciones de almacenamiento y distribución
- Buenas practicas del consumidor.

(Carrillo Inungaray & Reyes Munguía, 2014).

### 5.1. Alteraciones de un alimento

Dentro de las alteraciones se observan tres agentes principales, los agentes físicos, agentes químicos y agentes biológicos (Tabla 5).

**Tabla 5.** Causas de alteraciones de los alimentos.

<b>Agentes Físicos</b>	Mecánicas
	Temperatura
	Humedad
	Aire
	Luz
	Etc.
<b>Agentes Químicos</b>	Pardeamiento
	Enranciamiento
	Etc.

<b>Agentes Biológicos</b>	Enzimáticos	
	Parásitos	
	Microorganismos	Bacterias
		Hongos
Levaduras		

Fuente: (Juliarena & Gratton, 2016)

### 5.1.1. Agentes físicos

Estos suelen actuar durante la cosecha y los tratamientos posteriores y no suelen alterar las características nutricionales del alimento, pero sí su sabor y aspecto. Dentro de los agentes físicos están.

- **Mecánicos:** como cortes, golpes que suponen una disminución en la vida útil del alimento.
- **La temperatura:** acelera el proceso de descomposición ya que cada 10°C aumenta la velocidad de reacciones químicas y enzimáticas.
- **La humedad:** ayuda al desarrollo de microorganismo.
- **El aire:** al contener oxígeno ayuda a reacciones de oxidación que puede alterar las proteínas produciendo cambio de color.
- **La luz:** puede degradar algunas vitaminas y afecta al color (Juliarena & Gratton, 2016).

### 5.1.2. Agentes químicos

Se manifiestan durante el almacenamiento del producto, pueden producir el enranciamiento o pardeamiento.

- **Pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard:** Reacción compleja entre azúcares y un grupo amino de aminoácidos, péptido o proteína dando lugar a productos como la melanoidina la cual produce un color marrón, este proceso puede ser tecnológico en donde el alimento se encuentra a altas temperaturas o ser espontánea al estar el alimento almacenado por largos periodos de tiempo (Juliarena & Gratton, 2016; Pastoriza de la Cueva, 2013).
- **Enranciamiento de lípidos:** La oxidación de lípidos provoca la destrucción de ácidos grasos esenciales y vitaminas sensibles al calor, esto produce la aparición



de sabores rancios y de radicales libres que ponen en peligro la salud del consumidor (Méndez Cid, 2019).

### **5.1.3. Agentes biológicos**

Este aspecto es el más importante y el que está más relacionado con la alteración de los alimentos dentro de estos tenemos las enzimas y microorganismos.

Las enzimas son capaces de modificar la apariencia del alimento, es decir, estas aumentan la velocidad de reacción para así tener dos posibilidades, la primera pueden obtener un estado más blando de los alimentos y la segunda que los alimentos puedan madurar más rápido (Aguilar Morales, 2012).

Los microorganismos son la principal causa de deterioro del alimento y estos pueden ser perjudiciales para la salud del consumidor ya que estas producen las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs). Entre los microorganismos más comunes tenemos las bacterias tanto por su abundancia como su reproducibilidad, pueden producir toxinas o ser causantes de infecciones. Cabe destacar que algunas bacterias son pertinentes para la elaboración de ciertos alimentos como por ejemplo aquellos que son fermentados (Aguilar Morales, 2012; Juliarena & Gratton, 2016).

## **5.2. Mecanismos de conservación de alimentos**

Estos mecanismos nos van ayudar para evitar que las alteraciones antes descritas puedan llegar a producirse.

Entre los mecanismos más utilizados tenemos el frío que produce una disminución de la velocidad de todos los procesos químicos, metabólicos y de crecimiento de microorganismos. Por lo tanto, un descenso de la temperatura produce un retraso de los cambios en los alimentos durante el almacenamiento que será tanto mayor cuanto más baja sea la temperatura. Es necesario destacar que aún a baja temperatura, hay microorganismos que son capaces de sobrevivir, por lo cual es importante no interrumpir la cadena de frío. La refrigeración es una técnica de conservación a corto plazo basada en las propiedades del frío para impedir la acción de ciertas enzimas y el desarrollo de microbios. Aquí el alimento se conservará en temperaturas próximas a los 0 grados centígrados, pero no por debajo. La congelación permite la conservación a largo plazo y



consiste en convertir el agua de los alimentos en hielo con gran rapidez y en almacenarlo a temperaturas muy bajas (18 grados bajo cero o inferiores) (Juliarena & Gratton, 2016).

Entre otros mecanismos tenemos el calor, la modificación de la cantidad de agua en el alimento, adición de sales o de azúcares, fermentación, conservantes químicos, etc.

## **6. Análisis sensorial**

Según el Instituto de Alimentos de EEUU (IFT), define la evaluación sensorial como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir, analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Hernandez Alarcon, 2005).

Con el análisis sensorial se puede conocer las opiniones de las personas que consumen el alimento, el cual es de suma importancia para la industria alimenticia. En los últimos años se ha observado que los consumidores prestan mayor atención a la calidad de los alimentos que consumen, no solo interesándose en el valor nutricional del alimento sino también es la satisfacción y placer que este brinda (Picallo, 2009).

La calidad sensorial no es propia de cada alimento, esta va a depender de la interacción alimento – hombre y se puede definir como la sensación de una persona al recibir estímulos procedentes del alimento que no depende solo de la intensidad del estímulo sino también de las condiciones del ser humano (Espinosa Manfugás, 2007).

### **6.1. Aplicaciones del análisis sensorial**

Como se mencionó anteriormente el análisis sensorial es cada vez más importante en la industria alimentaria, dado las exigencias del mercado competitivo actual. A continuación, se describen sus aplicaciones:

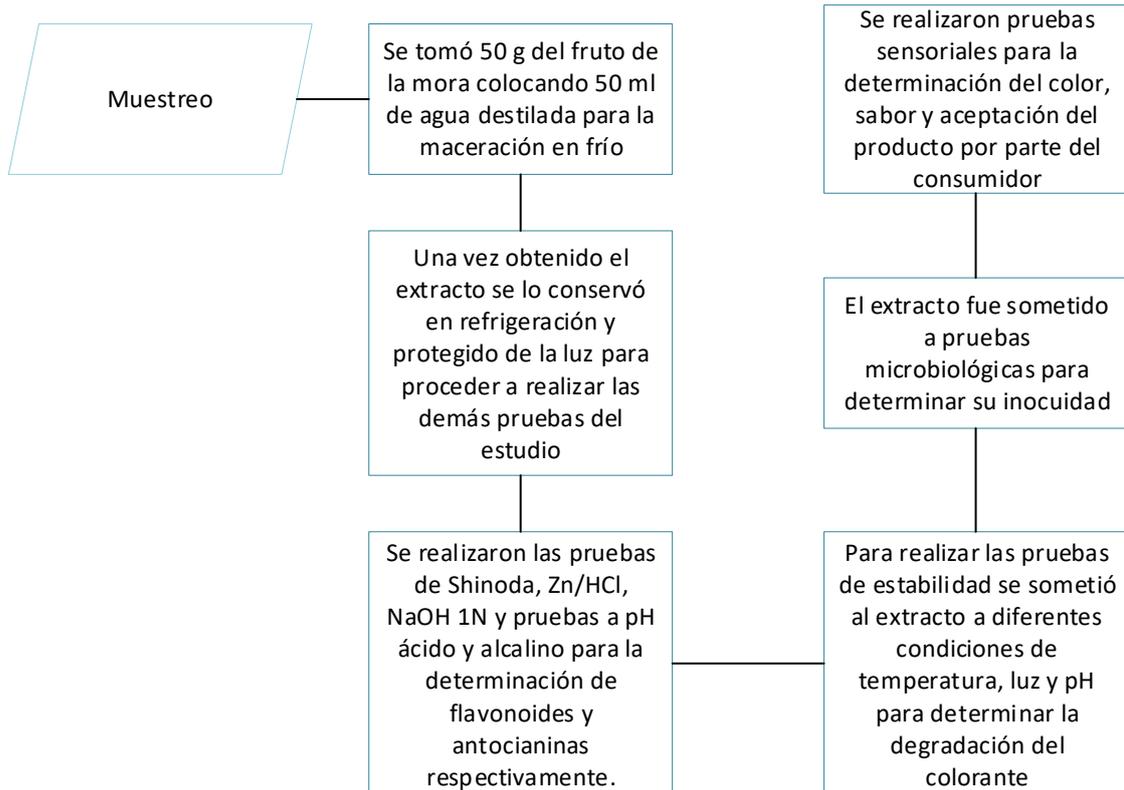
- Control de calidad de materias primas.
- Desarrollo y lanzamiento de nuevos productos.
- Comunicación a los consumidores de las características de un producto.
- Pruebas de mercado para nuevos productos, preferencia del consumidor.
- Investigación de factores que influyen en el color y el aroma de alimentos.
- Mejorar la formulación del producto.

- Medir el tiempo de vida media del producto (Hernandez Alrarcon, 2005; Vera Enríquez, 2008).

## Capítulo II

### 7. Metodología

#### Flujograma 1. Resumen del proceso a realizar.



Fuente: el autor.

#### 7.1. Muestra Vegetal

Se seleccionó un punto de venta del mercado 27 de febrero de manera aleatoria, obteniendo como muestra 1 Kg del fruto de mora del cual se separó 50 g (por duplicado) para la obtención del colorante y saborizante, se escogió solo las especies vegetales sanas, maduras, que no presentaran picaduras y no estuvieran golpeadas ni enmohecidas (NTON 17002-02, 2002).



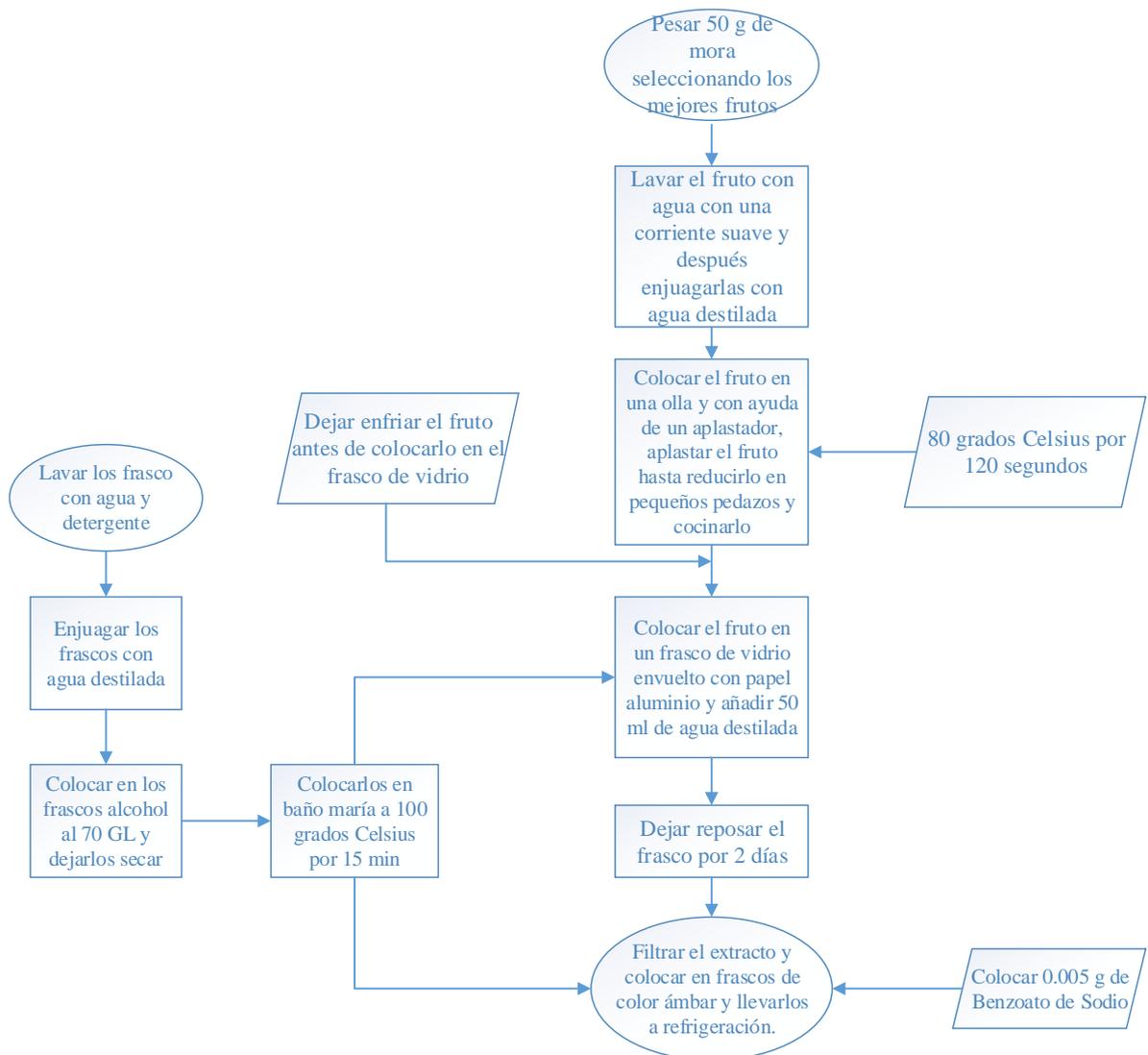
## **7.2. Maceración en frío**

El método consistió en sumergir el producto a macerar (mora), en un recipiente con la cantidad necesaria de solvente (agua destilada), cubriendo todo el producto. Para que este procedimiento surja efecto, se debió dejar en reposo varios días para que de esta forma se extraiga la mayoría de las propiedades presentes ( Fernaroli´s, 1975 ;Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

### **7.2.1. Procedimiento**

Se pesaron 50 g de la muestra (previamente seleccionada y lavada), luego se transfirió a un frasco de vidrio y se adicionaron 50 ml de agua destilada, se cubrió y dejó reposar por 2 días en un lugar fresco (18 – 25 °C) y protegido de la luz, posteriormente se filtró y envaso en un recipiente color ámbar. Este proceso se realizó por duplicado. Se detalla el proceso en el Flujograma 2.

## Flujograma 2. Proceso de Maceración en frío.



Fuente: el autor.

### 7.3. Determinación cualitativa de antocianinas y flavonoides (Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

Estas determinaciones fueron realizadas para confirmar la presencia de antocianinas y los diferentes tipos de flavonoides que están presente en el fruto de la mora. Las diferentes pruebas fueron realizadas ya que son fáciles de realizar, no necesitan mucha cantidad de reactivos y producen colores específicos para la interpretación de los resultados.

#### 7.3.1. Determinación de Flavonoides:

- **Prueba de Shinoda:** Se midió 2 ml del extracto obtenido en un tubo de ensayo, se colocó una porción de Mg metálico y 1 ml de HCl concentrado, se observó la



coloración formada y se comparó con la Tabla 13. *Identificación de Flavonoides* (Anexo 1).

- **Prueba con Zn/HCl:** Se midió 2 ml del extracto obtenido en un tubo de ensayo, se colocó una porción de Zn metálico y 1 ml de HCl concentrado, se observó la coloración formada y se comparó con la Tabla 13. *Identificación de Flavonoides* (Anexo 1).
- **Prueba con NaOH 1N:** Se tomó 10 ml del extracto obtenido en un tubo de ensayo, se calentó en baño maría y se concentró la muestra hasta 5 ml, en un tubo de ensayo se colocó 2.5 ml del extracto concentrado y se añadió 0.5 ml de NaOH 1N, se observó la coloración formada y se comparó con la Tabla 13. *Identificación de Flavonoides* (Anexo 1).

### 7.3.2. Determinación de Antocianinas:

- **Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido:** Se midió 1 ml del extracto en un tubo de ensayo, se adicionaron unas gotas de HCl concentrado hasta llevar a pH ácido verificando con papel Litmus para verificar el pH, se observó la coloración y se comparó con la Tabla 14. *Identificación de Antocianinas* (Anexo 1).
- **Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino:** Se midió 1 ml del extracto en un tubo de ensayo, se adicionaron unas gotas de NaOH 1N hasta llevar a pH alcalino verificando con papel Litmus para verificar el pH, se observó la coloración y se comparó con la Tabla 14. *Identificación de Antocianinas* (Anexo 1).

### 7.4. Determinación de estabilidad de pH, luz y temperatura

El colorante de la mora fue sometido a diferentes condiciones de temperatura, pH y luz. La pérdida de color fue monitoreada por la medida de los espectros de absorción en un rango de 400-600 nm por espectrofotometría en un espectrofotómetro marca Thermo scientific GENESYS 10vis, utilizando como blanco agua destilada (Ramírez et al., 2006).

- **Temperatura:** En 3 tubos de ensayo se colocaron 10 ml de la solución (5 ml del extracto en 100 ml de agua), Cada tubo fue sometido a 3 diferentes temperaturas: congelación (-10 °C), refrigeración (4 °C), ambiental (18 °C). Después de tres días



bajo estas condiciones se midió los espectros de absorción en el espectrofotómetro (400 - 600 nm).

- **pH:** En 3 tubos de ensayo se colocaron 10 ml de la solución (5 ml del extracto en 100 ml de agua). Cada uno de los tubos fue sometido a diferentes pH. A un tubo se colocó ácido cítrico para acidificar el extracto hasta llegar a un pH de 2, a otro tubo se colocó bicarbonato de sodio para alcalinizar el extracto hasta llegar a un pH de 8.5 y por último se midió el pH inicial del extracto, para luego observar el espectro de absorbancia en el espectrofotómetro (400 - 600 nm).
- **Luz:** 10 ml de la solución (5 ml del extracto en 100 ml de agua) se colocaron en 2 recipientes de vidrio (translúcido y ámbar), mantenidos a temperatura ambiente; el recipiente translúcido fue expuesto a luz fluorescente colocado a una distancia de 1.5 m; mientras que la solución en el recipiente ámbar fue almacenado en un estante sin la presencia de luz. Después de tres días se realizó la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (400 - 600 nm).

### 7.5. Análisis Microbiológico

Los análisis microbiológicos fueron basados en la norma INEN 2337 usando placas Petrifilm™ 3M con algunas modificaciones como se detalla: (3M Placas Petrifilm, 2017; NTE INEN 2337, 2008).

Pruebas para verificar la ausencia de *E. coli*, Coliformes Totales, Mohos y Levaduras mediante placas Petri Film™.

Se tomaron 10 ml del extracto y se lo colocó en 90 ml de agua de peptona, luego se tomó 1 ml y colocó en 9 ml de agua de peptona hasta llegar a una dilución de  $10^{-5}$ , seguidamente se tomó 1 ml de cada dilución y se colocó en cada placa Petri Film™.

Incube las Placas 3M Petrifilm para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras a 25-28 °C durante  $48 \pm 2$  horas en posición horizontal, con la película transparente hacia arriba. Algunos tipos de alimentos pueden exhibir un crecimiento y una formación de colonias más evidente a 28 °C. Recuento de levaduras las colonias son pequeñas, con bordes definidos, de color canela rosado a verde azulado. Las colonias parecen elevadas (tridimensionales) y tienen un color uniforme. Recuento de mohos las colonias son grandes, con bordes difusos, de color verde azulado después de una incubación prolongada. Las colonias parecen planas y tienen un centro oscuro con bordes difusos.



Incube las Placas 3M Petrifilm para el Recuento Coliformes totales / *E. coli* a 35 °C durante 24 horas en posición horizontal, con la película transparente hacia arriba. Recuento de Coliformes totales se observarían colonias de color rojizas, y colonias de color azules en caso de *E. coli*.

## 7.6. Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial se basó en lo recomendado por Hernández Alarcón, 2005 con algunas modificaciones que se detallan:

El extracto se colocó en 100 ml de yogurt natural (adicionando 10 g de azúcar a cada muestra) en concentraciones de 12,5 ml, 15 ml y 17.5 ml, se dio de probar dicho producto a 10 personas para su análisis de color y sabor llenando 3 tipos de encuestas (Anexo 3). Las muestras se entregaron en vasos de plástico en una cantidad de 15 ml a una temperatura entre 4 a 10 °C, el análisis sensorial se realizó entre las 10 – 12 a.m., el catador se enjuago con agua la boca después de probar cada muestra, las muestras se realizaron lo más alejado posible del lugar de prueba el cual fue un lugar tranquilo, con buena iluminación, a una temperatura ambiente (Hernández Alarcón, 2005).

## Capítulo III

### 8. Resultados y Discusiones

#### 8.1. Prueba de identificación de Flavonoides y Antocianinas

Los flavonoides y antocianinas se los puede identificar mediante diferentes reacciones químicas que van a dar lugar a cambio de colores (Tabla 6).

Flavonoides		
Prueba	Color	Resultado
NaOH	Azul	Antocianinas
Zn/HCl	Roja	Flavononoles
Shinoda	Roja	Flavononoles

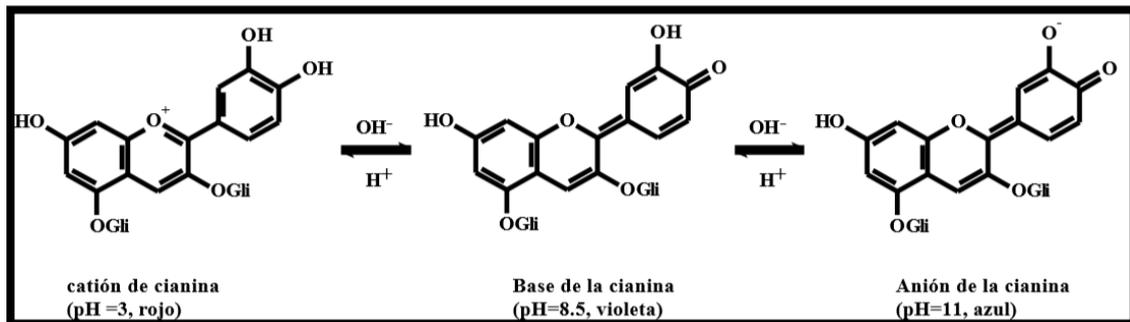
Antocianinas		
Prueba	Color	Resultado
pH alcalino	Verde	Antocianinas
pH ácido	Roja	Antocianinas

**Tabla 6.** Resultados de identificación de flavonoides y antocianinas (Anexo 4).

Gracias al cambio de coloración del extracto que se observa con la prueba de Shinoda da positivo para Flavononoles, ya que este tiene un núcleo benzopirona y produce una coloración rojiza cuando se le adiciona magnesio seguido de HCl concentrado (Martínez M, 2005).

En la prueba Zn/HCl se reemplaza el Mg por el Zn dando como resultado Flavononoles con una coloración rojiza ya que solo esta sustancia va a producir dicho color (Martínez M, 2005).

Para la identificación de antocianinas, la muestra fue sometida a diferentes pH dando una coloración rojiza a pH ácido y una coloración azul y verde a pH alcalino, ya que estas se comportan como indicador ácido – base debido al siguiente proceso (Gráfico 9) (Martínez M, 2005).



**Gráfico 9.** Variación de la estructura de cianina según el pH (Martínez M, 2005).

El Gráfico 9 permite comprender las estructuras químicas involucradas en la variación de color del pigmento contenido en la mora andina. En un medio ácido, con un pH inferior a 3, se obtiene el catión cianina. En un medio ligeramente alcalino, a pH 8,5, se verifica la base de cianina y a un pH superior a 11, es posible observar la estructura del anión cianina. Por lo tanto, el aumento o disminución del pH en el medio hará que el equilibrio se desplace hacia la izquierda o hacia la derecha y el color resultante dependerá de las concentraciones relativas de las especies indicadoras, responsables del color del medio. Por lo que a mayor es la acidez del medio, menor es el pH, mayor es la protonación del indicador y, en consecuencia, mayor es la concentración del catión cianina y a medida que aumenta el pH, cuanto mayor es la basicidad, esta forma del indicador se desprotona, lo que aumenta la concentración del anión cianina (dos Santos Tarnowski, 2017).

El extracto de mora contiene flavonoides y antocianinas, y se ha demostrado a lo largo de los años en diversos estudios que estas sustancias tienen efectos positivos para la salud. Según Tristan F et al. (2005) demostraron que diferentes tipos de arándanos contienen bioactividad contra diferentes etapas de carcinogénesis y que diferentes compuestos fenólicos son activos en estas etapas. Wang & Jiao (2000) describieron que, frutos como las moras, arándanos, frutillas, entre otras, que tengan altos niveles de antocianinas tienen

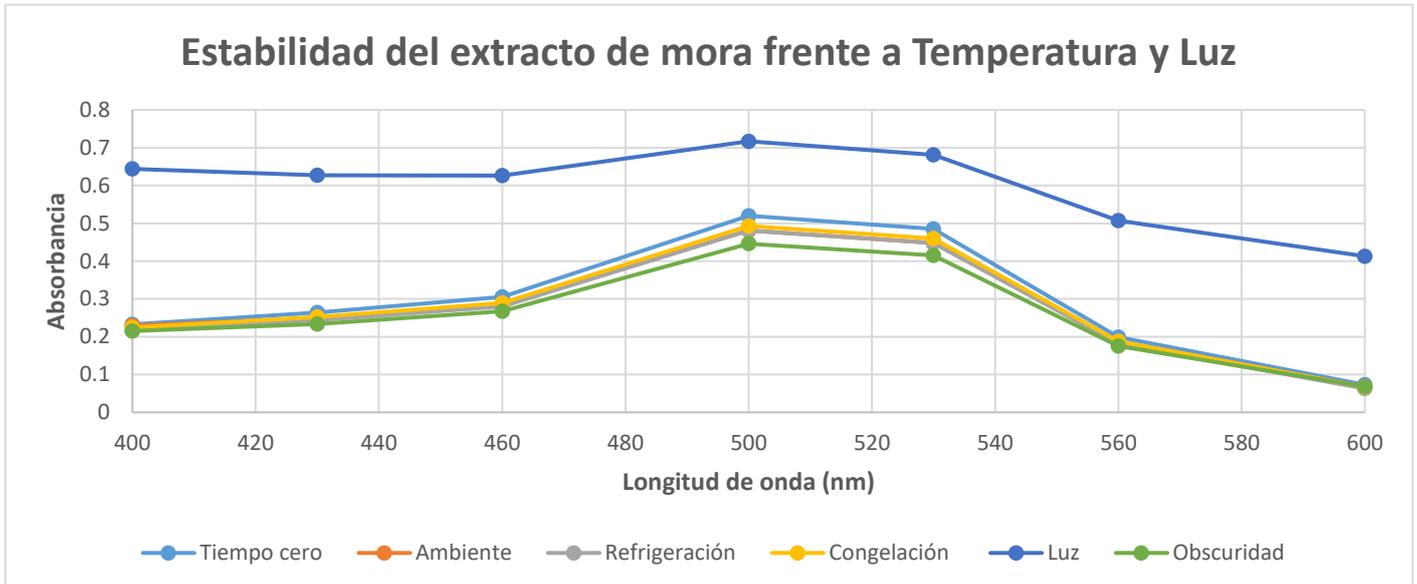
alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y contra radicales peróxido ( $ROO^\bullet$ ), hidroxilo ( $-OH$ ), superóxido ( $O_2^\bullet$ ) y oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), dicha actividad antioxidante resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradores de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas: lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y xantina oxidasa; evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno, también se ha visto que inhibe enzimas involucradas indirectamente con el proceso oxidativo como la fosfolipasa  $A_2$  y aparte estimulan otros procesos con propiedades antioxidantes como la catalasa y superóxido dismutasa (Escamilla Jiménez et al., 2009).

## **8.2. Pruebas de estabilidad**

### **8.2.1. Temperatura y Luz**

Como se puede observar en el Gráfico 10, la estabilidad del extracto de mora sólo se ve influenciada por la luz, ya que este parámetro mostró mayores cambios en la absorbancia a las diferentes longitudes de onda. Los demás parámetros también tuvieron cambios en las absorbancias, pero no fueron significativos y no hubo un cambio de color evidente como si lo tuvo la muestra expuesta a la luz. Zapata (2014) describe que la luz es un factor que va a degradar a las antocianinas por un cambio del hidroxilo en el carbono 5 haciéndolo susceptible a la fotodegradación, pudiendo corroborar lo descrito con el resultado obtenido. También otros estudios como (Ramírez et al., 2006) y (Torres Mayanquer & Pulgar Oleas, 2017) confirman que extractos naturales que contengan antocianinas se degradan a la exposición de la luz. Con los resultados de los otros parámetros se puede decir que el extracto de mora se conserva de mejor manera a una temperatura de refrigeración ( $4\text{ }^\circ\text{C}$ ) y protegido de la luz. Sin embargo, se observa también que es estable a temperatura ambiente y a congelación, pero no se lo podría dejar en este tipo de ambiente debido a que el extracto al ser acuoso y al estar a una temperatura entre  $18\text{ }^\circ\text{C}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  es más susceptible al crecimiento microbiológico, como lo son mohos y

levaduras. Y al dejarlo en congelación este se tendría que descongelar cada momento que se lo quiera utilizar y esto podría resultar en una molestia para el consumidor.

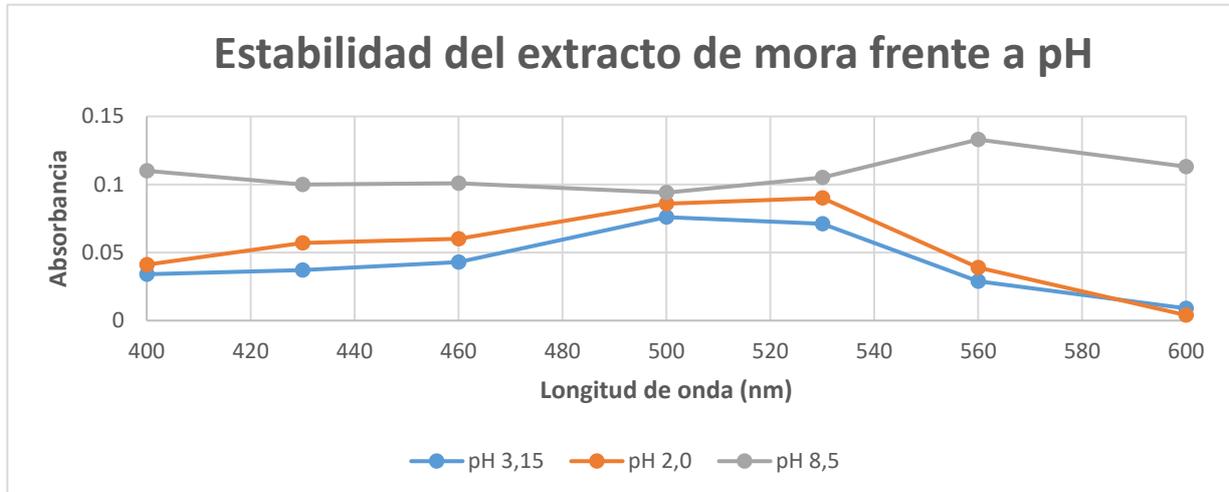


**Gráfico 10.** Estabilidad del extracto de mora frente a Temperatura y luz.

### 8.2.2. Análisis de pH

En el Gráfico 11 podemos observar como el pH influye en la degradación del extracto, a pH ácido se puede observar que el color no tuvo un cambio drástico con respecto al pH inicial de 3.15, esto se dio a que el extracto cambió a un color más rojo. A pH alcalino hubo una degradación completa del color ya que este cambió a un color azul púrpura. Los resultados concuerdan con lo que describe (Zapata, 2014) en donde menciona que a pH ácido predomina el catión flavilio ya que es muy sensible a los cambios de pH gracias a su déficit de electrones que da una coloración roja intensa y que a medida que aumenta el pH va produciendo la forma quinoidal que da una tonalidad azulada (Gráfico 7). Un notorio cambio en el pH en las frutas se puede observar cuando estas se maduran, lo que directamente genera un cambio de color como variación en el cambio de pH. Gracias a la deficiencia electrónica (carga positiva) perteneciente al núcleo flavilio que presentan dichos pigmentos, es que pueden funcionar como indicador de pH, lo que quiere decir

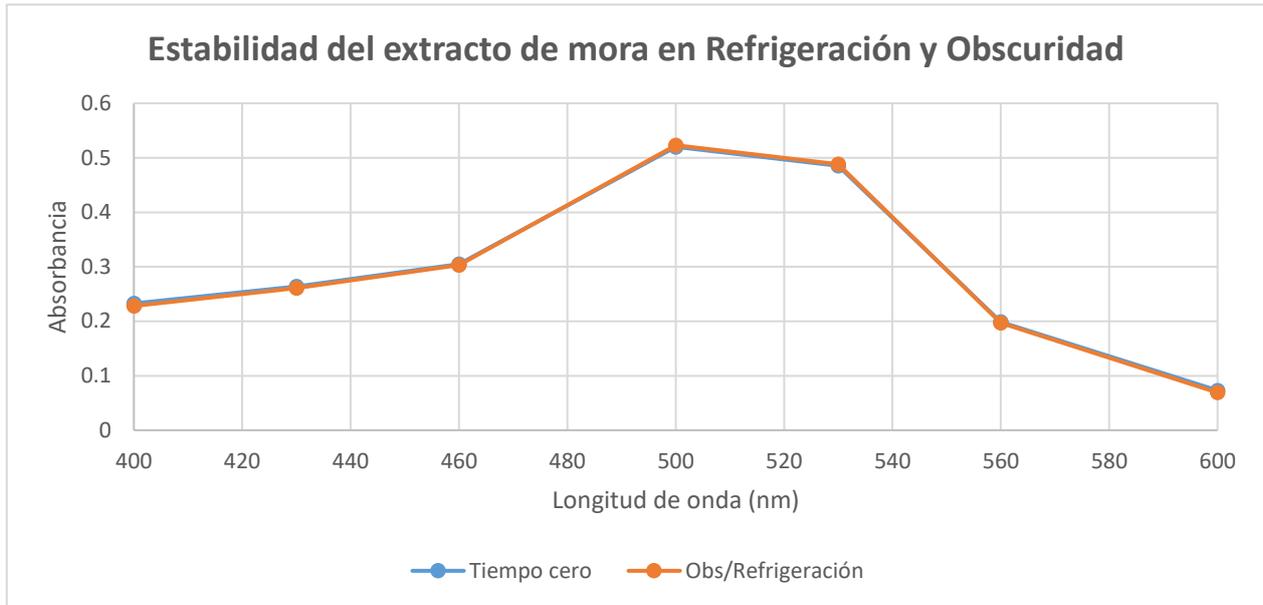
que su color es un dependiente de las condiciones de alcalinidad o acidez del medio en que se encuentra (Ballestreros Fortich & Diaz Barros, 2017).



**Gráfico 11.** Estabilidad del extracto de mora frente a pH.

### 8.2.3. Actividad del colorante después de un mes en condiciones de refrigeración y oscuridad

Se puede observar en el Gráfico 12 que el extracto al mantenerse en las condiciones de luz y refrigeración (4 °C) antes mencionadas, después de un mes esta sigue sin tener una degradación del color ya que la absorbancia no presenta mayor variación, por lo que el método de almacenado sería probablemente el adecuado para este tipo de producto. Se debe considerar su aplicación en alimentos procesados que mantienen condiciones óptimas de estabilidad, para que la degradación de estos pigmentos sea lo más baja posible; pH ácidos, temperaturas bajas de almacenamiento y protegidos de la luz. Autores como (Arrazola et al., 2014; Flores- Aguilar et al., 2018; Martínez Zambrano et al., 2011) observan que la concentración de antocianinas en extractos naturales de diversas frutas se degradan con el paso del tiempo a mayores temperaturas y que las muestras que se conservan a temperatura de refrigeración (4 °C) mantienen sus concentraciones iniciales.



**Gráfico 12.** Estabilidad del extracto de mora en Refrigeración y Oscuridad.

### 8.3. Análisis Microbiológico

Como se observa en la Tabla 7 el análisis microbiológico del extracto resultó negativo en todas las concentraciones de dilución tanto para *E. coli* / Coliformes totales como para Mohos y Levaduras (Anexo 5), por lo que se puede decir que los procesos de selección del fruto y de maceración se realizaron correctamente, en buenas condiciones asépticas sin que tenga algún tipo de contaminación.

El control microbiológico se realizó nuevamente un mes después (Anexo 5), estando en las condiciones de refrigeración (4 °C) y protegidos de la luz, esta vez sólo se realizó a la concentración de  $10^{-1}$  para verificar si el producto seguía siendo óptimo para el consumo humano, obteniendo un resultado negativo para los mismos microorganismos descritos en la Tabla 7.

Microorganismos UFC/ml	Concentración de las Diluciones					Límites de aceptación
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	
<i>E. coli</i> / Coliformes totales	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo en todas las concentraciones

<b>Mohos y levaduras</b>	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Una sola muestra podría ser positivo entre las concentraciones $10^{-2}$ o $10^{-3}$
--------------------------	----------	----------	----------	----------	----------	--

**Tabla 7. Control microbiológico del extracto de mora.**

#### 8.4. Análisis Sensorial, Interpretación de resultados.

##### 8.4.1. Intensidad del color

Para obtener los resultados de este análisis se debe asignar un número a cada punto de la escala de ordenación que se encuentra en la encuesta de intensidad de color (Anexo 3). Poniendo en la primera casilla 1 punto, en la segunda casilla 2 puntos y en la tercera casilla 3 puntos. Al final se coloca el puntaje obtenido en cada muestra y se suma para obtener un total. La muestra que obtenga el menor puntaje va a ser el de mayor intensidad de color.

<b>Intensidad de Color</b>			
<b>Panelistas</b>	<b>Muestras</b>		
	<b>A (12.5 ml)</b>	<b>B (15 ml)</b>	<b>C (17.5 ml)</b>
1	3	2	1
2	3	2	1
3	3	2	1
4	3	2	1
5	3	2	1
6	3	2	1
7	3	2	1
8	3	2	1
9	3	2	1
10	3	2	1
<b>Total</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>10</b>

**Tabla 8. Intensidad del Color.**

En la tabla 8 se puede observar que los panelistas pudieron diferenciar fácilmente la intensidad del color del extracto de mora teniendo como resultado que la muestra C con 17.5 ml del extracto tiene un tono más intenso que la muestra A con solo 12.5 ml. Aunque los panelistas pudieron observar que la muestra C era el más intenso 7 de los 10 participantes supieron expresar que desde la muestra B con 15 ml del extracto tenía un color aceptable para la característica del producto que era el yogurt de mora.

### 8.4.2. Perfil de sabor

Para obtener los resultados del perfil de sabor se va a sumar para cada sabor el puntaje de la escala (Anexo 3), es decir, entre 0 y 5 obteniéndose así un total. La muestra que obtenga un mayor puntaje es la que va a tener mayor sabor.

Perfil de sabor			
Sabor	Muestras		
	A (12.5 ml)	B (15 ml)	C (17.5 ml)
Dulce	30	30	37
Ácido	16	18	23
Amargo	2	6	4
Fermentado	15	14	22
Afrutado	24	32	40
Astringente	10	12	12
Picante	0	0	0
Metálico	0	0	0
Mora	33	37	43

**Tabla 9. Perfil de sabor.**



**Gráfico 13. Perfil de sabor**

Con respecto al perfil de sabor pudimos obtener que el sabor de mora fue más evidente a una concentración de 17.5 ml al ser la muestra con mayor puntaje, en cuanto a la cantidad de dulce, a pesar que las tres muestras contenían la misma cantidad de azúcar, los panelistas indicaron que la muestra C era más dulce, esto podría ser debido a que la

muestra C es la que más sabe a mora y los panelistas asociaron esta característica con la cantidad de azúcar en la muestra. En cuanto a la acidez, se puede observar que mientras más se incrementó la concentración del extracto también incrementó este parámetro ya que la mora es una fruta ácida. Por lo que corresponde a los otros parámetros, no fueron relevantes ya que al combinar el extracto con yogurt natural el sabor de este último también está presente, por lo que los sabores como fermentado y amargo pudieron ser descritos por el yogurt y no por la mora. Por último, los sabores metálicos y picantes no obtuvieron ninguna puntuación ya que el producto no debía tener estas características de sabor.

#### 8.4.3. Aceptación del producto por parte del consumidor

Para obtener los resultados del análisis de aceptación del producto se debe asignar un puntaje a cada una de las categorías Tabla 10. Asignación de puntaje.

Me gustaría muchísimo comprarlo	1
Me gustaría mucho comprarlo	2
Me gustaría comprarlo	3
Me es indiferente comprarlo	4
Me disgustaría comprarlo	5
Me disgustaría mucho comprarlo	6
Me disgustaría muchísimo comprarlo	7

**Tabla 10.** Asignación de puntaje.

Se coloca el puntaje a cada muestra y se suma para obtener un total. La muestra que obtenga menor puntaje es la de mayor agrado para el consumidor. Es necesario analizar todas las respuestas y comentarios que realizan los panelistas para tomar una decisión final.

	Muestras		
	A (12.5 ml)	B (15 ml)	C (17.5 ml)
Total	25	19	17

**Tabla 11.** Aceptación del producto por parte del consumidor.

Con respecto a la aceptación del producto se puede observar en la tabla 11 que la muestra C con 17.5 ml es la que más agrado al consumidor para su compra ya que es la que tiene mayor sabor a mora, sin embargo, se puede observar que la muestra B con 15 ml del extracto no tiene una diferencia significativa con respecto al puntaje de la muestra C por



lo que los consumidores también estarían dispuestos a comprar el producto con esta concentración del extracto.

## 9. Conclusiones

Se obtuvo un colorante y saborizante natural de mora para ser utilizado como aditivo en diferentes tipos de alimentos.

Mediante pruebas cualitativas y colorimétricas se confirmó la presencia de flavonoles y antocianinas presentes en la mora.

Se determinó que la mejor estabilidad del producto en anaquel es mantenerlo en refrigeración y a obscuridad, ya que al ser un extracto natural y contener antocianinas estas son degradadas por la luz.

El extracto no es estable a pH alcalino porque como se observa este cambia por completo la coloración.

El análisis microbiológico dio como resultado negativo para *E. coli* / Coliformes totales, Mohos y Levaduras indicando que las muestras preparadas no presentaban contaminación y podían ser usadas para el análisis sensorial. Las pruebas que se realizaron al mes tanto del análisis de estabilidad como microbiológico mostraron que el extracto no presentó una degradación significativa del color y las pruebas microbiológicas dieron resultados negativos.

Con respecto al color los panelistas describieron que aunque a 17.5 ml era la muestra que presentaba mayor intensidad del color, a 15 ml el color era aceptable para el yogurt de mora.

En el perfil de sabor se pudo observar que a mayor concentración del extracto sabe más a mora teniendo como concentración aceptable por el consumidor de 17.5 ml.

Para la aceptación del producto se pudo verificar que aunque la muestra C es la que contiene mayor cantidad de extracto, la muestra B obtuvo un puntaje no tan diferente al de la muestra C, por lo que a los panelistas también les agrado el producto a la concentración de 15 ml.



## **10. Recomendaciones**

Dentro del área de alimentos se hagan más estudios sobre colorantes y saborizantes naturales.

El análisis sensorial se podría hacer en un tiempo mayor a 30 días para observar la degradación progresiva del color del extracto.



## BIBLIOGRAFÍA

- 3M Placas Petrifilm. (2017). *Placas Petrifilm para el Recuento Rápido de Mohos y Levaduras*.  
multimedia.3m.com. <https://multimedia.3m.com/mws/media/14096800/guia-interpretacin-petrifilm-hongos-y-levaduras-rpida.pdf>
- Aguilar Morales, J. (2012). *Métodos de conservación de alimentos*. aliat.org.mx.  
[http://www.aliat.org.mx/BibliotecasDigitales/economico\\_administrativo/Metodos\\_de\\_conservacion\\_de\\_alimentos.pdf](http://www.aliat.org.mx/BibliotecasDigitales/economico_administrativo/Metodos_de_conservacion_de_alimentos.pdf)
- Aguilera Ortíz, M., Reza Vargas, M. del C., Chew Madinaveitia, R. G., & Meza Velázquez, J. A. (2011). PROPIEDADES FUNCIONALES DE LAS ANTOCIANINAS. *BIOtecnia*, 13(2), 16.  
<https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- alimentos.org.es. (2009). *Mora*. Alimentos. //alimentos.org.es/mora
- Arrazola, G., Herazo, I., & Alvis, A. (2014). Obtención y Evaluación de la Estabilidad de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) en Bebidas. *Información tecnológica*, 25(3), 43-52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642014000300007>
- Astray, G., García Río, L., Mejuto, J. C., & Pastrana, L. (2007). *Chemistry in food: Flavours*. ResearchGate.  
[https://www.researchgate.net/publication/236008821\\_Chemistry\\_in\\_food\\_Flavours](https://www.researchgate.net/publication/236008821_Chemistry_in_food_Flavours)
- Ávila Cubillos, E. P. (2015). *Manual Mora*.  
<https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14319/Mora.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ballestreros Fortich, L., & Díaz Barros, A. (2017). LA ANTOCIANINA COMO SUSTITUTO DE LOS INDICADORES DE pH SINTÉTICOS: UN PASO HACIA LOS PRODUCTOS VERDES.  
<https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/4893/LA%20ANTOCIANINA%20OCOMO%20SUSTITUTO%20DE%20LOS%20INDICADORES%20DE%20pH.pdf?sequence=1>



- Calvo Domper, M. (2017). *TRABAJO FIN DE GRADO COLORANTES ALIMENTARIOS*. 20.
- Carmona, I. (2013). *De colorantes sintéticos a naturales en la industria alimentaria*. 6.
- Carrillo Inungaray, M. L., & Reyes Munguía, A. (2014). Vida útil de los alimentos / Lifetime food. *CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 2(3), 32.  
<https://doi.org/10.23913/ciba.v2i3.20>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). *FLAVONOIDES: CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES*. 22, 11.
- Castañeda Sánchez, A., & Guerrero Beltrán, J. A. (2015). *Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: Antocianinas*. studylib.es. <https://studylib.es/doc/6614355/pigmentos-en-frutas-y-hortalizas-rojas--antocianinas>
- Castañeda Vázquez, B. I. (2010). *Inducción de antocianinas y capacidad antioxidante por oligogalacturónidos en uvas de mesa cv. 'Flame Seedless'*. 96.
- Castillo Membreño, S. A., & Ramírez González, I. E. (2006). *Ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles*. 174.
- Castillo, Y. Y. C. (2013). *EVALUACIÓN AGRONÓMICA Y FENOLOGÍA DE DOS CLONES DE MORA SIN ESPINAS (Rubus glaucus Benth) PARA DETERMINAR SU POTENCIAL COMERCIAL. TUMBACO, ECUADOR*. 120.
- Castro Retana, J. J., & Cerdas Araya, M. del M. (2005). *Mora (Rubus spp) Cultivo y Manejo Poscosecha*. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8862.pdf>
- CODEX STAN 192-1995, IDT. (s. f.). *NTE INEN CODEX 192*.  
[https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen-codex\\_192.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen-codex_192.pdf)
- Delgado Orellana, F. (2012). *MANEJO ORGÁNICO DEL CULTIVO DE MORA (Rubus sp.)*  
[Universidad de Cuenca].  
<https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3074/1/mag129.pdf>
- Delgado Vargas, F., Jiménez, A., & Paredes López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability.



*Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 173-289.

<https://doi.org/10.1080/10408690091189257>

Díaz Rincón, K. J. (2019). *Estandarización del proceso de obtención de antocianinas a partir de callos de mora*. 84.

dos Santos Tarnowski, K. (2017). *Indicador ácido-base de repolho roxo*.

<https://quimicaempratica.files.wordpress.com/2017/07/indicador-c3a1cido-base-de-repolho-roxo.pdf>

Escamilla Jiménez, C. I. E., Cuevas Martínez, E. Y., & Guevara Fonseca, J. (2009). *Flavonoides y sus acciones antioxidantes*. 3.

Espinosa Manfugás, J. (2007). *Evaluación Sensorial de los Alimentos*. Editorial Universitaria.

FDA. (2019). FDA. *FDA*. <http://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>

Flores- Aguilar, E., Flores-Rivera, E. del P., Flores- Aguilar, E., & Flores-Rivera, E. del P. (2018).

Estabilidad de Antocianinas, Fenoles totales y Capacidad Antioxidante de Bebidas de Maíz Morado (*Zea mays* L.) y Uña de Gato (*Uncaria tomentosa* sp). *Información tecnológica*, 29(2), 175-184. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642018000200175>

Garzón, G. A. (2008). *LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS: REVISIÓN*. 10.

Germán, F., Bernal E, J. A., Gallego D, J. L., Rodríguez O, J. E., Guevara M, N., & Londoño B, M.

(2002). *Agronomía del cultivo de la mora*. repository.agrosavia.

[https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/21106/39652\\_23648.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/21106/39652_23648.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Harper, H. A., Murray, R. K., Botham, K. M., Kennelly, P. J., Rodwell, V. W., & Weil, P. A. (2013).

*Harper. Bioquímica ilustrada* (29.ª ed.). McGraw Hill.

[https://bibliotecavirtualaserena.files.wordpress.com/2018/02/harper\\_bioquimica\\_ilustrada\\_29c2aa\\_ed\\_booksmedicos-org.pdf](https://bibliotecavirtualaserena.files.wordpress.com/2018/02/harper_bioquimica_ilustrada_29c2aa_ed_booksmedicos-org.pdf)



Hernández Alarcón, E. (2005). *Evaluación Sensorial*. Course Hero.

<https://www.coursehero.com/file/15522259/7679251454902Evaluacion-sensorial/>

Infoagro Systems, S.L. (s. f.). *El cultivo de la Mora*. Recuperado 20 de abril de 2020, de

[https://www.infoagro.com/documentos/el\\_cultivo\\_mora.asp](https://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_mora.asp)

Juliarena, P., & Gratton, R. (2016). *1 Capítulo 3. Conservación de los alimentos 1. Principales*

*causas*. pdfslide.net. [https://pdfslide.net/documents/1-capitulo-3-conservacion-de-](https://pdfslide.net/documents/1-capitulo-3-conservacion-de-los-alimentos-1-principales-causas-.html)

[los-alimentos-1-principales-causas-.html](https://pdfslide.net/documents/1-capitulo-3-conservacion-de-los-alimentos-1-principales-causas-.html)

Leguizamón, G. del V., González León, A., & Báez Sañudo, R. (2005). *ANTOCIANINAS EN UVA*

*(Vitis vinifera L.) Y SU RELACIÓN CON EL COLOR*. 28, 10.

López González, J., & Gómez Santos, R. (2008). *AGRONOMIA DEL CULTIVO DE LA MORA DE*

*CASTILLA*. 138.

Luis Roman, D. (2012). *LA MORA, UNA PEQUEÑA GRAN FRUTA*.

<http://www.ienva.org/web/index.php/es/nutrition-news/339-la-mora-una-pequena-gran-fruta>

Martínez Flórez, S., González Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). Los flavonoides: Propiedades

y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*, 8.

Martínez M, A. (2005). *FLAVONOIDES*.

Martínez Salinas, A., Beltrán M, O., Velastegui, G., Ayala, G., Jácome, R., & Yáñez, W. (2007).

*Manual del Cultivo de la Mora de Castilla*. INIAP Archivo Histórico.

<https://books.google.com.ec/books?id=E30zAQAAMAAJ&pg=PA6&dq=mora+fruta&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiO3MjYnszmAhVGqlkKHx4zBxsQ6AEIOzAD#v=onepage&q=mora%20fruta&f=false>

Martínez Zambrano, J. J., Rojas Sarmiento, H. A., Borda Guerra, G. del C., Hastamorir Caro, A.

N., & Medina Riaño, M. F. (2011). *Estabilidad de Antocianinas en Jugo y Concentrado*

*de Agraz (Vaccinium meridionale Sw.)*. 64(1), 9.



- Méndez Cid, F. J. (2019). *Estudio del enranciamiento autooxidativo de algunas grasas animales: Correlación y representatividad de los parámetros indicadores* [Universidad de Vigo].  
[http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/1268/MendezCid\\_FranciscoJos%E9\\_TD\\_2019.pdf?sequence=1](http://www.investigacion.biblioteca.uvigo.es/xmlui/bitstream/handle/11093/1268/MendezCid_FranciscoJos%E9_TD_2019.pdf?sequence=1)
- Mercosur/GMC/RES. N 10/06. (2006). *REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR SOBRE ADITIVOS AROMATIZANTES/SABORIZANTES*. [http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r\\_gmc\\_10-06.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_10-06.pdf)
- NTE INEN 2337. (2008). *INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN*. [normalizacion.gob.ec](http://normalizacion.gob.ec).  
[https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte\\_inen\\_2337.pdf](https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_2337.pdf)
- NTON 17002-02. (2002). *NORMA DE PROCEDIMIENTOS PARA MUESTREO DE PRODUCTOS VEGETALES*. [fao.org](http://www.fao.org). <http://www.fao.org/forestry/12947-09a8259bc751929ba7c7eb6c455126594.pdf>
- Ortega Parra, V. P. (2004). *Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*. 86.
- Pastoriza de la Cueva, S. (2013). *Efecto de la ingesta de compuestos avanzados de la reacción de Maillard sobre el metabolismo gastrointestinal* [Editorial de la Universidad de Granada]. <https://hera.ugr.es/tesisugr/21915076.pdf>
- Picallo, A. (2009). *Análisis sensorial de los alimentos: El imperio de los sentidos*. [repositorioubasib.uba.ar/gsd/collect/encruce/index/assoc/HWA\\_257.dir/257.PDF](http://repositorioubasib.uba.ar/gsd/collect/encruce/index/assoc/HWA_257.dir/257.PDF)
- QuimiNet. (2011). *Las principales características de los colorantes hidrosolubles*.  
<https://www.quiminet.com/articulos/las-principales-caracteristicas-de-los-colorantes-hidrosolubles-2642659.htm>
- RAE. (2019). *Sabor | Diccionario de la lengua española*. «Diccionario de la lengua española» - Edición del Tricentenario. <https://dle.rae.es/sabor>



- Ramírez, M., Rojas Aguilar, N. Y., & Correa Higuera, L. J. (2006). *Obtención de un colorante natural alimentario de mora de Castilla (Rubus glaucus benth)*. 2(2), 115-130.
- Rocío Sánchez, J. (2013a). *LA QUIMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS*. 12, 14.
- Rocío Sánchez, J. (2013b). *LA QUIMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS*. 13.
- Rojano, B., Cristina Zapata, I., & Cortes, F. B. (2012). Estabilidad de antocianinas y valores de capacidad de absorbanza de radicales oxígeno (ORAC) de extractos acuosos de corozo (*Bactris guineensis*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), 244-255.
- Takaki, K., Eijkman, C., Grijns, G., & Pekelharing, C. A. (2013). *Manual de Nutrición y Dietética*. 41.
- Torres Mayanquer, F. G., & Pulgar Oleas, N. L. (2017). Evaluación de la estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de mortiño (*Vaccinium myrtillus* L) como colorante para la industria de alimentos. *SATHIRI*, 12(1), 171.  
<https://doi.org/10.32645/13906925.81>
- Tristan F, B. K., Schmid, B. M., Yousef, G. G., Knight, C. T. G., Cuendet, M., Kang, Y. H., Pexxuto, J. M., Seigler, D. S., & Lila, M. A. (2005). *Chemopreventive Potential of Wild Lowbush Blueberry Fruits in Multiple Stages of Carcinogenesis—Dimensions*.  
<https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1045657680>
- Ulloa Alvarado María, M. F. (2017). *EL USO DE LOS COLORANTES COMESTIBLES NATURALES Y SINTÉTICOS DESDE EL ASPECTO FUNCIONAL EN LA PASTELERÍA*. 77.
- Vera Enríquez, H. C. (2008). *EVALUACIÓN SENSORIAL* [Instituto Politécnico Nacional].  
<https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14592/HAYDEE%20VERA%20INFORME%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Villarreal, C. G. R. (2014). *Investigación de la mora y propuesta gastronómica*. 154.
- Voss, & Cécile. (2006). *Veneno en su plato? Usos y riesgos de los aditivos alimentarios* (1ra ed.). OCU EDICIONES, S.A.



Wang, S., & Jiao, H. (2000). *Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen.* - PubMed—NCBI.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087538>

Zapata, L. M. (2014). *OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE ARÁNDANOS PARA SER UTILIZADO COMO ANTIOXIDANTE Y COLORANTE EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA* [Universitat Politècnica de València].

<https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/39105>



## ANEXOS



## ANEXO 1

**Identificación de Flavonoides** (Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Ensayo de Shinoda	Magnesio Metálico Ácido Clorhídrico Concentrado	Coloración Amarilla – Roja	Flavonas y Flavonoides
		Coloración Roja	Flavononoles
		Coloración de Rojo – Violeta – Azul	Flavononas
		Negativo	Isoflavonas, Chalconas y Auronas

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Ensayo Zn/HCl	Zinc metálico, Ácido Clorhídrico Concentrado	Coloración Rojo – Violeta	Flavononoles
		Incolora o Rosado débil	Flavononas y Flavonoles

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



**Identificación de Antocianinas** (Castillo Membreño & Ramírez González, 2006).

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



## **ANEXO 2**

## Certificado de esterilidad



Agua de Peptona  
Tubo Tapa Rosca  
Frasco Tapa Rosca

Datos del Cliente	
Cédula de Identidad	0104019632
Nombre:	Sr. Andrés Crespo
Institución:	Universidad de Cuenca

Lote: PL180120

Características Físicas			
	Agua de Peptona	Estado	Responsable
Color	Ambar	CONFORME	BQF. Paul León
Volumen	9ml 90ml	CONFORME	BQF. Paul León
Presentación	Tubo Tapa Rosca Frasco Tapa Rosca	CONFORME	BQF. Paul León
pH	6.5	CONFORME	BQF. Paul León
Control de Calidad			
	Agua de Peptona	Estado	Responsable
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	El medio se torna turbio y opalescente.	CONFORME	BQF. Paul León
Control de Esterilidad			
	Agua de Peptona	Estado	Responsable
Incubación a 37°C durante 24 Horas	No se observa crecimiento de microorganismos	CONFORME	BQF. Paul León
Lote Elaborado por: Lic Nadia Villavicencio, Esp			
Lote Liberado por: BQF. Paul León, MSc			



BQF. Paul León, MSc  
Analista Técnico.



Lic. Nadia Villavicencio, Esp  
Control de Calidad



### **ANEXO 3**



**Encuesta para el grado de color.**

**FECHA** \_\_\_\_\_

**NOMBRE DEL PRODUCTO:** Colorante y Saborizante de Mora

Frente a usted hay tres muestras de Colorante y Saborizante de Mora que usted debe ordenar en forma creciente de acuerdo al grado de color.

Cada muestra debe llevar un orden diferente, dos muestras no deben tener el mismo orden.

<b>ORDEN DE LAS MUESTRAS</b>	<b>GRADO DE COLOR</b>
La más intensa	1. _____ 2. _____
La menos intensa	3. _____

**COMENTARIOS**

---

---

---

**¡MUCHAS GRACIAS!**



### Encuesta de perfil de sabor

FECHA \_\_\_\_\_

**NOMBRE DEL PRODUCTO:** Colorante y Saborizante de Mora

Frente a usted hay tres muestras de Colorante y Saborizante de Mora que usted debe probar describiendo las características de sabor que estén presentes en la muestra.

Marque con una X sobre la casilla del término que más describa lo que usted siente por cada muestra.

#### Muestra A

SABOR	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Ácido						
Amargo						
Fermentado						
Afrutado						
Astringente						
Picante						
Metálico						
Mora						

#### Muestra B

SABOR	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Ácido						
Amargo						
Fermentado						
Afrutado						
Astringente						
Picante						
Metálico						
Mora						

#### Muestra C

SABOR	0	1	2	3	4	5
Dulce						
Ácido						
Amargo						
Fermentado						
Afrutado						
Astringente						
Picante						
Metálico						
Mora						



**COMENTARIOS**

---

---

---

**¡MUCHAS GRACIAS!**

**Encuesta para prueba de aceptación**

**FECHA** \_\_\_\_\_

**NOMBRE DEL PRODUCTO:** Colorante y Saborizante de Mora

Frente a usted hay tres muestras de Colorante y Saborizante de Mora, pruébelas una a una y seleccione la muestra que usted prefiera en cuanto al sabor y color.

ESCALA	MUESTRAS		
	A	B	C
Me gustaría muchísimo comprarlo			
Me gustaría mucho comprarlo			
Me gustaría comprarlo			
Me es indiferente comprarlo			
Me disgustaría comprarlo			
Me disgustaría mucho comprarlo			
Me disgustaría muchísimo comprarlo			

**COMENTARIOS**

---

---

---

**¡MUCHAS GRACIAS!**



## **ANEXO 4**

## Identificación de flavonoides

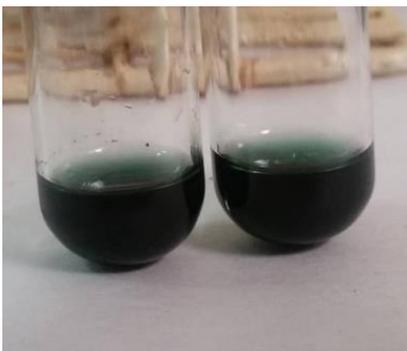
### Prueba de Shinoda



### Prueba Zn/HCl



### Prueba con NaOH

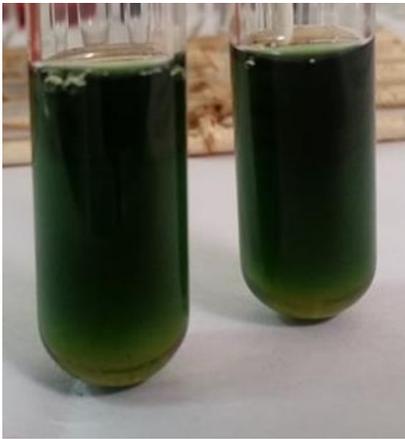


## Identificación de antocianinas

### Prueba a pH ácido



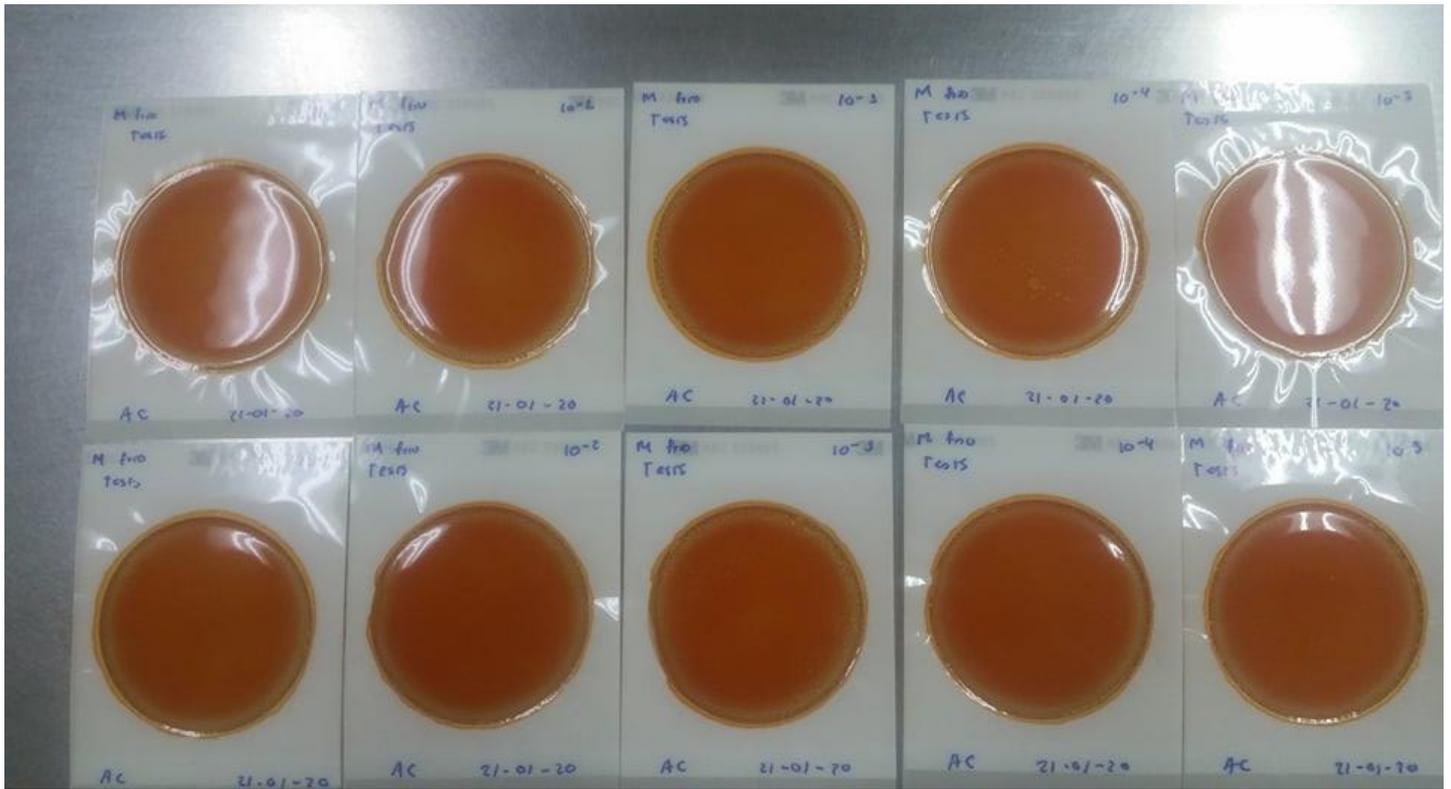
### Prueba a pH alcalino





## **ANEXO 5**

### Pruebas microbiológicas para *E.coli* / Coliformes totales.



### Pruebas microbiológicas para Mohos y Levaduras.



### Control microbiológico después de un mes de la obtención del extracto



*E. coli* / Coliformes totales



Mohos y Levaduras