



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA



“Maestría en Biotecnología de Alimentos”

Colorante natural con capacidad antimicrobiana a partir de *Morus nigra*

AUTOR: Lic. Natalia Elizabeth Rolón Boytovich.

TUTORA: Dra. María Daniela Rodríguez.

Encarnación - Paraguay

2018

DEDICATORIAS

A DIOS

Por darme la sabiduría, la fuerza y perseverancia para culminar una etapa más de mi vida, y por ser mi fortaleza espiritual. Gracias por no dejarme sola en los momentos difíciles.

A MI ESPOSO Y AMIGO... DIEGO VÁZQUEZ

Por estar a mi lado siempre. Por sostenerme la mano cuando ya no tengo fuerzas para seguir y por compartir cada etapa de mi crecimiento tanto personal como profesional.

A MIS PADRES Y HERMANA

Gustavo y Carmen, gracias por ser mis pilares fundamentales, mis ejemplos a seguir. Gracias por los valores inculcados y por esta maravillosa familia. Naila más que una hermana, una amiga, me haces la vida más fácil.

A MIS COMPAÑEROS

Por ser parte de esta meta que, a pesar de los obstáculos presentados en el camino, la pudimos alcanzar.

Natalia Elizabeth Rolón Boytovich

AGRADECIMIENTOS

AL CONACYT

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología del Paraguay por otorgarme la beca y el incentivo para la realización de esta maestría, una meta profesional más en mi vida.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ITAPÚA Y LA FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

Prestigiosa casa de estudios, la cual me abrió sus puertas, preparándome para un futuro competitivo y haciéndome una persona de bien.

A MI TUTORA... DRA. DANIELA RODRIGUEZ

Quien me ha orientado y asesorado en la realización de este trabajo. Por su tiempo invertido y los conocimientos impartidos en mí. Gracias.

AL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE MISIONES

Por haberme facilitado los equipos y laboratorios para realizar la presente investigación.

AL DR. LUIS ALBERTO BRUMOVSKY

Al por abrirme las puertas del Laboratorio de Análisis de Agua y Alimentos de la Fundación de Desarrollo e Investigación Científica y Tecnológica (DINCYT).

AL PLANTEL DOCENTE

A cada uno de los docentes de esta maestría que han sido parte de esta preparación académica, cada uno dejó un legado en mi persona.

Y a todas las personas que de una u otra manera colaboraron para la realización de este trabajo. Muchas Gracias.

Natalia Elizabeth Rolón Boytovich

INDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| Dedicatorias | 2 |
| Agradecimientos | 3 |
| Índice de contenidos | 4 |
| Índice de Tablas | 6 |
| Índice de Figuras | 7 |
| Lista de abreviaturas | 8 |
| Resumen | 9 |
| Abstract | 10 |
| Introducción | 11 |
| Objetivos | 13 |
| 1. Capítulo I – Revisión y Análisis de Literatura | 14 |
| 1.1. Colorantes | 14 |
| 1.1.1. Colorantes como aditivos alimentarios | 14 |
| 1.1.2. Clasificación de colorantes | 15 |
| 1.1.2.1. Colorantes sintéticos | 16 |
| 1.1.2.2. Colorantes naturales | 18 |
| 1.2. Compuestos fenólicos | 21 |
| 1.3. Antocianinas | 23 |
| 1.3.1. Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas | 24 |
| 1.3.2. Extracción de las antocianinas | 26 |
| 1.3.3. Fuentes de las antocianinas | 28 |
| 1.4. Generalidades de la Mora (<i>Morus nigra</i>) | 29 |
| 1.4.1. Características botánicas | 29 |
| 1.4.2. Usos | 29 |
| 1.4.3. Propiedades | 29 |
| 1.5. Antimicrobianos | 30 |
| 2. Capítulo II – Metodología | 31 |
| 2.1. Materia prima | 32 |
| 2.1.1. Obtención de la muestra | 32 |
| 2.1.2. Trituración | 32 |
| 2.1.3. Secado y determinación de humedad | 32 |
| 2.1.4. Molienda | 32 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 2.2. | Barrido espectral | 32 |
| 2.3. | Diseño experimental | 33 |
| 2.4. | Determinación de fenoles | 34 |
| 2.5. | Extracción | 34 |
| 2.6. | Concentración | 35 |
| 2.7. | Validación | 35 |
| 2.8. | Ensayos fisicoquímicos | 35 |
| 2.9. | Ensayos microbiológicos | 36 |
| 2.10. | Determinación de la actividad antimicrobiana del colorante | 36 |
| 3. | Capítulo III – Resultados y Discusión | 38 |
| 3.1. | Barrido espectral | 38 |
| 3.2. | Diseño experimental | 38 |
| 3.2.1. | Determinación de fenoles | 40 |
| 3.2.2. | Análisis de Varianza para las distintas variables de respuesta | 41 |
| 3.2.3. | Diagramas de Pareto | 43 |
| 3.2.4. | Modelo Ajustado | 44 |
| 3.2.5. | Superficie de respuesta estimada | 45 |
| 3.3. | Validación | 46 |
| 3.4. | Ensayos fisicoquímicos | 48 |
| 3.5. | Ensayos microbiológicos | 49 |
| 3.6. | Determinación antimicrobiana | 50 |
| 4. | Capítulo IV – Conclusiones | 51 |
| | Referencias bibliográficas | 52 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Colorantes artificiales autorizados por la FDA | 17 |
| Tabla 2. Clasificación de colorantes naturales | 21 |
| Tabla 3. Factores a evaluar en la extracción de antocianinas de <i>Morus nigra</i> y sus respectivos niveles | 33 |
| Tabla 4. Composición de patrones de ácido gálico para la determinación de fenoles | 34 |
| Tabla 5. Diseño compuesto central 3^2 + estrellas para evaluar la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo de extracción de antocianinas en <i>Morus nigra</i> | 39 |
| Tabla 6. Datos para la curva de calibrado para la determinación de fenoles totales. | 40 |
| Tabla 7. ANOVA para las antocianinas detectadas a 285 nm | 41 |
| Tabla 8. ANOVA para las antocianinas detectadas a 525 nm | 42 |
| Tabla 9. ANOVA para fenoles totales | 42 |
| Tabla 10. Valores óptimos para maximizar la obtención de antocianinas en extractos obtenidos a partir de <i>Morus nigra</i> | 46 |
| Tabla 11. Comparación de valores óptimos teóricos y experimentales de las antocianinas detectadas y los fenoles totales para extractos de <i>Morus nigra</i> | 47 |
| Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos del colorante obtenido a partir de <i>Morus nigra</i> | 49 |
| Tabla 13. Resultados microbiológicos para el colorante obtenido | 49 |
| Tabla 14. Crecimiento microbiano de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones de colorante obtenido de <i>Morus nigra</i> | 50 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Clasificación de colorantes | 15 |
| Figura 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos | 22 |
| Figura 3. Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas | 23 |
| Figura 4. Interacciones de copigmentación de las antocianinas | 25 |
| Figura 5. Concentración de antocianinas en alimentos | 28 |
| Figura 6. Diagrama de flujo para la obtención de un colorante natural con capacidad antimicrobiana a partir de <i>Morus nigra</i> | 31 |
| Figura 7. Barrido espectral de un extracto obtenido de <i>Morus nigra</i> | 38 |
| Figura 8. Recta de calibrado de ácido gálico para la determinación de fenoles totales | 40 |
| Figura 9. Diagrama de Pareto estandarizado para las respuestas | 43 |
| Figura 10. Superficie de respuesta estimada para las variables de respuestas | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| ANOVA | Análisis de la Varianza |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| FDA | Food & Drug Administration |
| GAE | Equivalente de Acido Gálico |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| ICMSF | International Commission on Microbiological Specifications for Foods |
| IR | Índice de Refracción |
| MIC | Concentración Inhibitoria Mínima |
| NCCLS | Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos |
| NMP | Número Más Probable |

RESUMEN

El color en los alimentos es muy importante debido a que es el primer contacto que el consumidor tiene con ellos. Desde la aparición de los colorantes sintéticos en la industria, los colorantes naturales fueron relegados, ya que los primeros presentan mayor estabilidad y menor costo. Sin embargo, desde hace unos años la calidad y variedad de los colores provenientes de fuentes naturales ha mejorado notablemente, lo que ha permitido que su uso aumente progresivamente, sobre todo en la industria de los alimentos, ya que, en este campo, se buscan opciones cada vez más saludables y libres de compuestos químicos con potenciales efectos perjudiciales sobre la salud. Dentro de los pigmentos de origen natural, se hallan las antocianinas. El fruto de la planta *Morus nigra* es bien conocido como una buena fuente de antocianinas con diversas actividades biológicas. La extracción de estos pigmentos a partir de la mora es una alternativa comercial válida debido a que los pigmentos antociánicos pueden ser un sustituto eficaz de los colorantes sintéticos, brindando a las personas mayor seguridad en los productos que consume. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue obtener un colorante natural a partir de *M. nigra* y evaluar su capacidad antimicrobiana. Se realizó un barrido espectral entre los 200 y 700 nm a fin de determinar las longitudes de onda de mayor absorbancia de las antocianinas. Las longitudes de onda seleccionadas fueron de 285 y 525 nm en las que se observaron picos de absorción. Para establecer la influencia de las variables utilizadas sobre el proceso de extracción del colorante (concentración de etanol, temperatura y tiempo de extracción) se realizaron una serie de ensayos siguiendo el diseño de experimentos compuesto central 3^2 + estrellas. La optimización a través del diseño experimental con una concentración de etanol de 6,5 %, 75 °C y 30 min arrojó valores óptimos de 1,581 g/L de fenoles y una absorbancia de 0,642 a 285 nm. Con estas condiciones óptimas, se procedió a la extracción de 700 mL de extracto, el cual luego fue concentrado, logrando con ello la evaporación del 80% de la solución. Se realizaron ensayos fisicoquímicos al colorante obtenido, dando como resultado un pH de $4,48 \pm 0,03$; acidez titulable de 1,42 g/mL; 6,9 g/100mL de glucosa; 10,5 g/100mL de fructosa y un total de fenoles de 5,43 g/L. En cuanto a la capacidad antimicrobiana, se pudo observar que a medida que aumentaba la concentración del colorante, disminuía el crecimiento de la bacteria a las 48 h. La concentración mínima inhibitoria fue cercana a 1 g GAE/L.

Palabras claves: Colorante; Antocianinas; *Morus nigra*; Antimicrobiano.

ABSTRACT

Color in food is very important because it is the first contact that the consumer has with them. Since the appearance of synthetic dyes in the industry, natural dyes were relegated, the first to reach the mayor, and lower cost. However, since a few years ago the quality and variety of colors from natural sources has improved markedly, which has allowed its use to increase progressively, especially in the food industry, since, in this field, it is sought increasingly healthy options and free of chemical compounds with harmful effects on health. Among the pigments of natural origin, anthocyanins are found. The fruit of the *Morus nigra* plant is well known as a good source of anthocyanins with diverse biological activities. The extraction of these pigments is a commercial alternative that synthetic pigments can be an effective substitute of synthetic dyes, which offers the most important people for safety in the products you consume. Therefore, the objective of this work was to obtain a natural dye from *M. nigra* and evaluate its antimicrobial capacity. A spectral sweep was performed between 200 and 700 nm in order to determine the wavelengths of the mayor absorbance of the anthocyanins. The selected wavelengths were 285 and 525 nm in which absorption peaks were observed. To establish the influence of the variables used in the extraction process of the dye (concentration of time, temperature and time of extraction) a series of tests was carried out following the design of the experiments. The optimization through the experimental design with an ethanol concentration of 6.5 %, 75 °C and 30 min yielded optimum values of 1.581 g/L of phenols and an absorbance of 0.642 at 285 nm. With these optimal conditions, 700 mL of extract was extracted, which was then concentrated, thus achieving the evaporation of 80% of the solution. Physicochemical tests were carried out on the dye obtained, resulting in a pH of 4.48 ± 0.03 ; Titrable acidity of 1.42 g/mL; 6.9 g/100 mL of glucose; 10.5 g/100 mL of fructose and a total of phenols of 5.43 g/L. Regarding the antimicrobial capacity, it was observed that as the concentration of the dye increased, the growth of the bacterium diminished at 48 h. The minimum inhibitory concentration is close to 1 g GAE/L.

Keywords: Coloring; Anthocyanins; *Morus nigra*; Antimicrobial.

INTRODUCCIÓN

El color en los alimentos es muy importante debido a que es el primer contacto que el consumidor tiene con ellos, por lo que es determinante para la aceptación o rechazo de los mismos (Badui Dergal, 2006; Espinosa, 2014), con frecuencia se lo utiliza como un índice de calidad, frescura y buen estado. Desafortunadamente, el color puede cambiar o perderse durante los procesos tecnológicos o el almacenamiento. Por esta razón, controlar, cambiar y estabilizar el color es uno de los principales objetivos de los científicos y los tecnólogos en la rama de los alimentos.

Los alimentos que no tienen color propio, como las golosinas, algunos postres, los *snacks* y las bebidas, entre otros, se colorean artificialmente para hacerlos más atractivos al consumidor.

Desde la aparición de los colorantes sintéticos en la industria, los colorantes naturales fueron relegados, ya que los primeros presentan mayor estabilidad y menor costo. Sin embargo, desde hace unos años la calidad y variedad de los colores provenientes de fuentes naturales ha mejorado notablemente, lo que ha permitido que su uso aumente progresivamente, sobre todo en la industria de los alimentos, ya que, en este campo, se buscan opciones cada vez más saludables y libres de compuestos químicos con potenciales efectos sobre la salud. Se han desarrollado investigaciones en el campo de los colorantes enfocándose principalmente en lo relacionado con toxicidad, efectos secundarios, obtención de colorantes naturales y sustitución (Restrepo Gallego, 2007).

Dentro de los pigmentos de origen natural, se hallan las antocianinas, que pueden obtenerse a partir de plantas y vegetales que constituyen una fuente importante de colorantes de la gama de los rojos y azules. El fruto de la planta *Morus nigra* es bien conocido como una buena fuente de antocianinas con diversas actividades biológicas (Aramwit, Bang y Srichana, 2010). Este fruto constituye una buena fuente de pigmentos rojos naturales, hidrosolubles, con varias aplicaciones en la industria de alimentos, donde existe una demanda considerable de colores naturales alternativos a los sintéticos, como el rojo N° 40 (Garzón, 2008).

El interés en estos pigmentos antociánicos se debe a sus posibles efectos beneficiosos para la salud, dentro de los cuales se encuentran la reducción de la enfermedad coronaria, los efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Las propiedades

bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Garzón, 2008).

Por lo tanto, la extracción de estos pigmentos a partir de la mora es una alternativa comercial válida debido a que los pigmentos antociánicos pueden ser un sustituto eficaz de los colorantes sintéticos, brindando a los consumidores mayor seguridad en los productos que consume, tales como caramelos, bebidas, productos de pastelería, etc.

En esta investigación se pretende conocer los parámetros que influyen en el proceso de extracción y la factibilidad de preparar un colorante a partir de los frutos de *Morus nigra* siendo éstos ricos en compuestos fenólicos, especialmente flavonoides y antocianinas, además de poseer potencial capacidad antimicrobiana (Butt *et al.*, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener un colorante natural a partir de *Morus nigra* y evaluar su capacidad antimicrobiana.

Objetivos Específicos

- Determinar el proceso óptimo de extracción del colorante a escala de laboratorio, mediante un diseño de experimentos.
- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente el colorante obtenido.
- Determinar la actividad antimicrobiana del colorante obtenido frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a escala de laboratorio.

CAPITULO I – Revisión y Análisis de Literatura

1.1. Colorantes

La utilización de tintes y colorantes es probablemente tan antigua como la humanidad. Todas las civilizaciones han empleado diversas sustancias de procedencia orgánica o mineral, y más recientemente sintéticas, para colorear o decorar gran variedad de productos de su entorno, que van desde el propio cuerpo humano, a la vivienda, los utensilios, la ropa, los alimentos, etc. En el estudio de los colorantes están involucradas, por lo tanto, ciencias como la física, la química, la biología, la antropología, etc., implicando también a la medicina por las reacciones adversas que su utilización o consumo pueden producir en el ser humano (Tabar *et al.*, 2003).

La calidad de un alimento, sin tomar en cuenta los aspectos sanitarios, toxicológicos y nutricionales, se basa en los siguientes parámetros: color, sabor, olor y textura. Sin embargo, el primer acercamiento del consumidor al alimento es por su color, ya que, siendo el primer contacto visual que tiene con él, es determinante para que un alimento sea aceptado o rechazado (Badui Dergal, 2006).

1.1.1. Colorantes como aditivos alimentarios

Una de las principales metas de la Industria de Alimentos es la producción de varios tipos de alimentos, con apariencia cada vez más atractiva. Para cumplir con dicha finalidad, es necesario el empleo de aditivos (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006). Éstos se añaden a los alimentos para mejorar su aspecto y hacerlos más apetecibles, o para reemplazar pérdidas de color que se producen durante el proceso de elaboración. Ésta es la principal justificación para el uso de colorantes en alimentos, en particular en alimentos dirigidos al público infantil, que es el colectivo que más se guía por la vista a la hora de comer.

El color es la primera sensación que se percibe y la que determina el primer juicio sobre su calidad. Es también un factor importante dentro del conjunto de sensaciones que aporta el alimento, y tiende a veces a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor. La experiencia permite confirmar que la falta de color en los alimentos dificulta la identificación de los sabores.

Dadas las condiciones actuales del mercado alimentario, en las cuales hay una marcada tendencia hacia el consumo de productos más naturales y libres de compuestos químicos, se han desarrollado investigaciones en el campo de los colorantes, enfocándose principalmente en lo

relacionado con toxicidad, efectos secundarios, obtención de colorantes naturales y sustitución (Restrepo Gallego, 2007).

Siendo los colorantes uno de los aditivos más utilizados, éstos deben estar citados en las etiquetas de los alimentos. Con el objeto de facilitar el cumplimiento de esa norma, la Comunidad Económica Europea ha asignado un número a cada uno de los aditivos autorizados, que es el que debe figurar para información al consumidor. Para aquellos aditivos que no exista una numeración comunitaria, se precisa utilizar una nacional, ya que cada país adopta una norma para los aditivos en general (CODEX STAN 192, 1995).

1.1.2. Clasificación de colorantes

Los colorantes se dividen de forma general en naturales y sintéticos, según su procedencia, estos se extraen de fuentes naturales o se sintetizan, respectivamente. Sin embargo, también se los puede clasificar por su grupo cromóforo, radical que le confiere un determinado color como se indica en la Figura 1 (Almeida Gudiño, 2012).

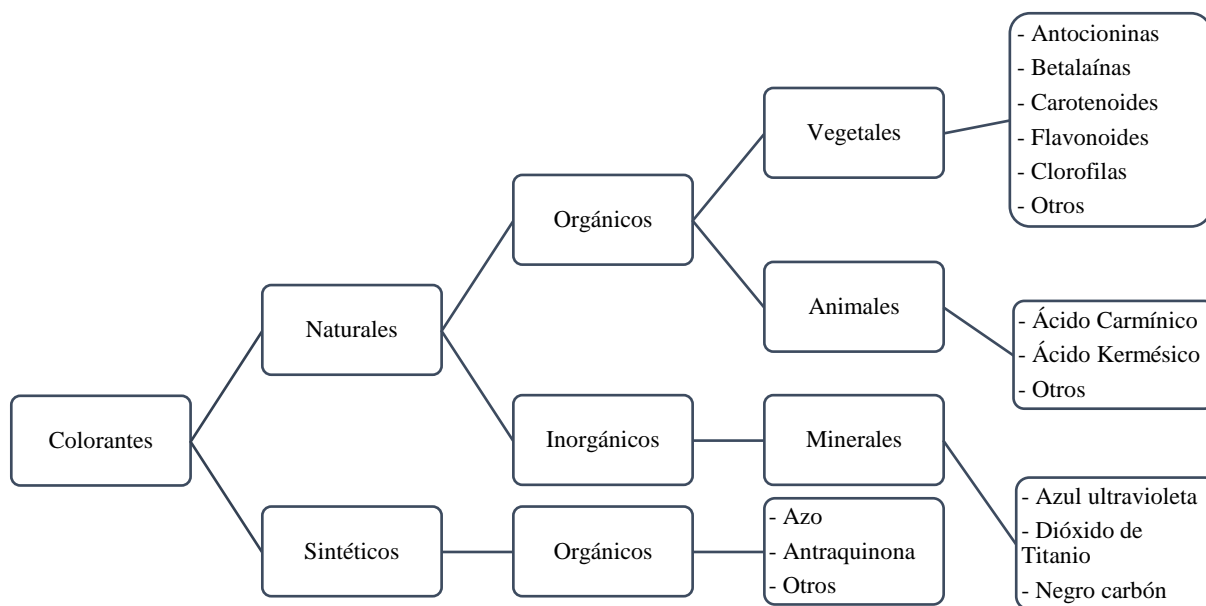


Figura 1. Clasificación de colorantes.

Fuente. (Almeida Gudiño, 2012).

1.1.2.1. Colorantes sintéticos

El origen de estos colorantes es de síntesis química, su composición es menos compleja que la de los colorantes naturales, son hidrosolubles, se presentan generalmente en forma de polvo y tienen normas específicas de pureza. Pueden ser de dos clases: síntesis de moléculas nuevas o síntesis de moléculas iguales a las que se encuentran de forma natural (Cubero, Monferrer y Villalta, 2002; Castillo Membreño y Ramírez González, 2006).

Las empresas normalmente utilizan agentes colorantes artificiales aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Drogas) porque son menos costosos que los de alimentos naturales y generalmente no imparten sabores a los alimentos. La FDA es responsable de regular todos los aditivos colorantes para certificar que los alimentos que los contienen, son seguros para consumirlos, contienen sólo ingredientes aprobados y están etiquetados con precisión (FDA, 2016). Cualquier producto que contiene un agente colorante de alimento artificial debe ser reflejado en la lista de ingredientes en la etiqueta.

Según Aceituno Melgar, los colorantes artificiales son más fáciles de usar que los naturales: son más resistentes a los tratamientos térmicos, son estables en amplios intervalos de pH y casi no se degradan con la luz (citado por (Orellana Barahona, 2015).


Sin embargo, presentan a su vez desventajas, principalmente en lo que se refiere al riesgo en la salud de los consumidores por los problemas de toxicidad, reacciones de intolerancia y alergias (Aceituno Melgar, 2010). La utilización de los colorantes sintéticos en la industria alimentaria es cada vez más estricta debido a la regulación para su uso.

También presentan riesgos ambientales causados por los efluentes que resultan de su síntesis, en la cual se suelen producir isómeros quirales que son incompatibles con la quiralidad de las funciones reactivas bioquímicas, aumentando los efectos indeseables. Los colorantes artificiales, al proceder de reacciones sintéticas no enzimáticas, son menos degradables que los naturales. La mayor resistencia química, dificulta su degradación por medios químicos o biológicos.

La presión ejercida por los consumidores ha provocado que muchas empresas revisen y reformulen sus productos para sustituir los colorantes artificiales por naturales. En 1906 el congreso de los Estados Unidos aprobó la primera legislación para los colorantes de alimentos. Sólo siete colorantes, al ser sometidos a pruebas, resultaron ser inofensivos para la salud. Ello ha llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables, aunque al contrario de lo que

sucedo en los otros grupos de aditivos, existen grandes variaciones de un país a otro. La FDA ha aprobado nueve colorantes artificiales (Tabla 1) (FDA, 2016).

Tabla 1. Colorantes artificiales autorizados por la FDA.

| <i>Nombre</i> | <i>Nombre común</i> | <i>Color</i> | <i>Usos</i> |
|------------------------------|---------------------|---|--|
| FD&C Azul N°1 | Azul brillante FCF |  | Productos de color, como Gatorade, bebidas gaseosas, dulces y enjuague bucal. |
| FD&C Azul N°2 | Indigotina |  | Refrescos, dulces como M&Ms, postres congelados, cereales y productos de panadería. |
| FD&C Verde N°3 | Fast Green FCF |  | Productos como guisantes enlatados, dulces, pescado y verduras. |
| FD&C Rojo N°3 | Eritrosina |  | Cerezas al marrasquino, pistachos, conservas de frutas, dulces, helados de agua, geles de decoración de tortas y pasta de dientes. |
| FD&C Rojo N°40 | Rojo Allura AC |  | Dulces, refrescos, condimentos, y cosméticos. |
| FD&C Amarillo N°5 | Tartrazina |  | Doritos, cereales, dulces, goma de mascar, mermeladas, pickles y yogur. |
| FD&C Amarillo N°6 | Amarillo ocaso |  | Refresco de naranja, mezcla de chocolate caliente, cereales para el desayuno, y dulces |
| Naranja B | Orange B |  | Forros de salchichas. |
| FD&C Rojo N°2 | Citrus Red |  | Se usa para enmascarar las variaciones de color de las naranjas y mandarinas a lo largo de las estaciones. |

Fuente. Adaptado de la FDA (FDA, 2016).

1.1.2.2. Colorantes naturales

El término colorante natural se aplica a aquellos productos alimenticios de origen animal, vegetal o incluso mineral. A la vez se consideran naturales a los colorantes obtenidos de materiales biológicos, algas, hongos, líquenes, insectos, así como algunos organismos marinos invertebrados (Guerrero Escobar, 2011), incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo (Aceituno Melgar, 2010).

Presentan alta compatibilidad con los sistemas vitales a diferencia de muchos colorantes sintéticos que se bioacumulan y alteran el metabolismo (Aceituno Melgar, 2010). Los colorantes naturales no afectan la salud y son biodegradables. Para comunidades pequeñas, el consumo de colorantes naturales permite mantener sus nexos culturales con el pasado, dar origen a prácticas productivas novedosas y a una mayor sostenibilidad económica y ecológica.

Una realidad que debe asumirse cuando se desea reemplazar compuestos artificiales o sintéticos por los naturales es la estabilidad de éstos últimos ante los cambios de pH, temperatura e iluminación y el hecho que deben dosificarse en cantidades mayores lo que implica una posible alteración de otras propiedades organolépticas del alimento como el aroma, la textura y el sabor (Restrepo Gallego, 2007).

Son muchas las plantas superiores que producen colorantes; sin embargo en muchos casos la concentración de estos es mínima, lo que no permite una rápida y económica extracción y en consecuencia son relativamente pocas las que tienen gran importancia comercial como fuente de colorantes (Cano Morales, 2008).

Se estima que el obtener colorantes naturales puros puede costar de 30 a 100 veces más que el producir colorantes sintéticos certificados, reduciendo con ello las posibilidades de explotación de estas fuentes naturales, sin embargo, las estrategias biotecnológicas en la producción de colorantes naturales que se han desarrollado en los últimos años son de gran importancia y podrían otorgar una serie de ventajas, entre ellas, las económicas (Cano Morales, 2008). Entre los colorantes naturales están los de origen animal y vegetal que figuran en la Tabla 2.

1.1.2.2.1. Animal

- **Mioglobina y hemoglobina**

El color rojo de la carne se debe principalmente a los hemopigmentos: la hemoglobina y la mioglobina. La hemoglobina se encarga de transportar oxígeno, mientras que la mioglobina, que forma alrededor del 20 % de los pigmentos totales del músculo, es responsable de almacenarlo hasta que se consume por el metabolismo aeróbico (Badui Dergal, 2006).

- **Carmín de cochinilla**

El carmín de cochinilla o simplemente carmín es un colorante rojo que se obtiene de las hembras desecadas del insecto *Dactylopius coccus* costa. El *Dactylopius coccus* costa vive como parásito sobre cactus de los géneros *Opuntia* y *Nopalea*, especialmente *Nopalea cochenillifera*, de hábitat fundamentalmente en Sudamérica y Centroamérica (Tabar *et al.*, 2003). El proceso de obtención del carmín a partir de estos insectos consiste básicamente en extracción acuosa, filtrado, precipitación, secado, molido y esterilización, siendo finalmente envasado. El extracto de cochinilla es la solución concentrada que queda después de que se elimine el alcohol de un extracto acuoso-alcohólico de insectos de cochinilla. El carmín es un polvo hidrosoluble compuesto por ácido carmínico en un sustrato de hidróxido de aluminio. Este polvo contiene aproximadamente un 50 % de ácido carmínico, sustancia que tiene un peso molecular de 492,4 Da y es el agente responsable del color; también contiene alrededor de un 20 % de material proteico proveniente de las cochinillas.

El carmín es uno de los colorantes rojos más apreciados, especialmente antes de la introducción de los colorantes artificiales, aunque todavía se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, cosmética (carmín rouge) y farmacéutica. El carmín y el extracto de cochinilla producen un color rojo rosado a magenta en los productos a los que se añade. Aunque estos colorantes se consideran generalmente inocuos para el ser humano, cada vez se describen con más frecuencia reacciones de hipersensibilidad frente a los mismos (Tabar *et al.*, 2003).

1.1.2.2.2. Vegetal

- **Carotenoides**

En la naturaleza se han identificado más de 420 carotenoides, se caracterizan por tener como estructura principal un esqueleto conformado por átomos de carbono que a su vez consiste en unidades de isopreno (Fennema, 2010).

Presentan funciones importantes en la fotosíntesis y la fotoprotección de los tejidos (Enríquez, 2014) y se encuentran de forma natural en vegetales y otros organismos fotosintéticos como algas, algunas clases de hongos y bacterias e insectos (Castañeda Sánchez y Guerrero Beltrán. J.A., 2015), variando su coloración del amarillo, naranjado y rojo (López Valdez, 2012).

- **Clorofilas**

Este es tal vez el pigmento vegetal más abundante en la naturaleza, se encuentra en la mayoría de las plantas siendo responsable de la fotosíntesis (Ortuño, Díaz Expósito y Del Río Conesa, 2015). Su estructura química compleja, al igual que los carotenos, es fácilmente alterable por oxidantes (oxígeno, peróxidos), altas temperaturas, pH, luz y algunas enzimas (Badui Dergal, 2006).

- **Betalaínas**

Son un grupo de aproximadamente 70 pigmentos glicosilados hidrosolubles y se dividen en dos clases: betacianinas (longitud de onda máxima de absorción: 540 nm), y betaxantinas (longitud de onda máxima de absorción: 480 nm). Las betalaínas se encuentran en pocas plantas y flores, entre las que destaca el betabel o remolacha roja (*Beta vulgaris*), la tuna roja y otras familias (Aceituno Melgar, 2010).

Son parecidas a las antocianinas y flavonoides en apariencia visual. Anteriormente se les llamaba antocianinas nitrogenadas. También se han encontrado algunas betalaínas de origen fúngico.

El color de las betalaínas es estable a pH entre 3.0 a 7.0. La estabilidad en el intervalo de pH indicado hace que sean aplicables en alimentos (Orellana Barahona, 2015).

- **Caramelo**

A la vez se consideran naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos, como algunos insectos e incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006).

Tabla 2. Clasificación de colorantes naturales (Guerrero Escobar, 2011).

| <i>Naturaleza química</i> | <i>Ejemplos</i> | <i>Colorante predominante</i> |
|---------------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Tetrapirroleo | Ficobilinas | Azul – Verde |
| | Clorofila | Verde |
| Carotenoides | Carotenoides | Amarillo – Anaranjado |
| Flavonoides | Flavonas | Blanco – Crema |
| | Flavonoles | Amarillo – Blanco |
| | Chalconas | Amarillo |
| | Auronas | Amarillo |
| | Antocianinas | Rojo – Azul |
| Xantonas | Xantonas | Amarillo |
| Quinonas | Naftoquinonas | Rojo – Azul – Verde |
| Derivados Indigoides e Indoles | Índigo | Azul – Rosado |
| | Betalaínas | Amarillo – Rojo |
| Pirimidinas Sustituidas | Pterinas | Blanco – Amarillo |
| | Flavinas | Amarillo |
| | Fenoxanizinas | Amarillo – Rojo |
| | Fenazinas | Amarillo – Púrpura |

1.2. Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos orgánicos, los cuales tienen en su estructura química al menos un grupo fenol, estos se encuentran abundantemente en la naturaleza en plantas y vegetales (Jeton Baculima, 2014). Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos, los flavonoides (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006).

El grupo natural que reviste mayor importancia dentro de los compuestos naturales coloreados son los flavonoides, no solo por presentar una gama amplia de diversas coloraciones, sino también porque últimamente se les atribuye un sin número de

características funcionales beneficiosas para la salud. Este grupo se divide en: antocianinas, isoflavonas, auronas, flavonas, flavanonas, flavonoles, chalconas, flavandioles y dihidroflavonoides (López Valdez, 2012). Se dividen en 13 subclases con un total de 5000 compuestos (Jeton Baculima, 2014).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (Figura 2) (Martínez Flores *et al.*, 2002).

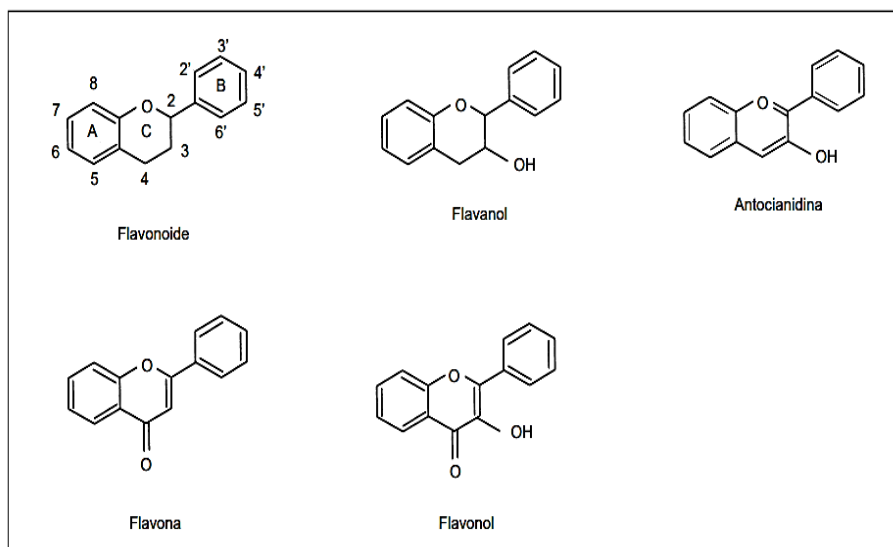


Figura 2. Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Fuente. (Martínez Flores *et al.*, 2002)

La estructura base de los flavonoides puede sufrir varias modificaciones como pueden ser: adicionar o reducir grupos hidroxilos, la metilación de grupos hidroxilos o del núcleo del flavonoide, metilación de grupos hidroxilos en posición orto, dimerización, formación de bisulfatos y la más importante, glicosilación de grupos hidroxilos para producir flavonoides O-glicósidos, ya que generalmente se encuentran en las plantas de esa manera, en los cuales uno o más grupos hidroxilos del núcleo del flavonoide están unidos a azúcares, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente (Cartaya y Reynaldo, 2001; Martínez Flores *et al.*, 2002).

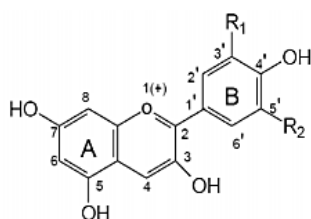
Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a que son productos naturales muy comunes, su presencia en una droga vegetal no necesariamente explica sus propiedades farmacológicas (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006). Las propiedades que se les atribuyen son: actividades inhibitoras de enzimas, antiinflamatoria, anticancerígeno, antiviral, antimicrobiana, etc.

1.3. Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula (Cofré Martínez, 2015).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Castañeda Sánchez y Guerrero Beltrán. J.A., 2015).

Existen seis antocianidinas comunes en las flores y frutas: la cianidina (rojo), delphinidina (azul), malvidina (púrpura), pelargonidina (anaranjado), peonidina (rojo-marrón) y la petunidina (rojo oscuro) (Figura 3); nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas (Aguilera Ortiz et al., 2011).



| Aglicona | Substitución | | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) |
|---------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| | R ₁ | R ₂ | Espectro visible |
| Pelargonidina | H | H | 494 (naranja) |
| Cianidina | OH | H | 506 (naranja-rojo) |
| Delfinidina | OH | OH | 508 (azul-rojo) |
| Peonidina | OCH ₃ | H | 506 (naranja-rojo) |
| Petunidina | OCH ₃ | OH | 508 (azul-rojo) |
| Malvinidina | OCH ₃ | OCH ₃ | 510 (azul-rojo) |

Figura 3. Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.

Fuente. (Zapata *et al.*, 2014)

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y la arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa (Garzón, 2008; Aguilera Ortíz *et al.*, 2011).

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Badui Dergal, 2006).

1.3.1. Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a los alimentos es limitada debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento, pues son inestables frente a la luz, se degradan durante el almacenamiento, cambiando de color cuando más elevada sea la temperatura (Parra Ortega, 2004).

El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos (Zapata *et al.*, 2014).

1.3.1.1. Temperatura

Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

1.3.1.2. Concentración

El aumento de la concentración de antocianinas promueve una más alta estabilidad del color (Garzón, 2008).

1.3.1.3. Luz

La luz afecta las antocianinas de dos formas diferentes: la luz es esencial para la biosíntesis de antocianinas, pero también acelera su degradación (Castañeda Sánchez y Guerrero Beltrán. J.A., 2015). Las antocianinas preservan mucho mejor su color cuando se mantienen en la oscuridad.

1.3.1.4. pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas (Garzón, 2008). Se ha demostrado que las antocianinas relativamente simples son más estables en un medio ácido que en un medio neutro o alcalino. En medio ácido la forma predominante es la del ion flavilio, el cual da el color rojo; a medida que el pH se eleva, las antocianinas se transforman en una base quinónica de color azulado (Santacruz Cifuentes, 2011).

1.3.1.5. Iones metálicos

Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables (Badui Dergal, 2006).

1.3.1.6. Enzimas

La inactivación de enzimas mejora la estabilidad de las antocianinas (García Nauto, 2014). Las enzimas que tienen carácter de β -glucosidasa hidrolizan el enlace glucosídico en el C-3 produciendo el correspondiente aglucón el cual es incoloro.

1.3.1.7. Copigmentación

El color de las antocianinas puede ser estabilizado y enriquecido por reacciones de copigmentación, la cual es un fenómeno que involucra la interacción de las antocianinas con flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos y consigo mismas, generando que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable (Rein, 2005; Zapata, 2014). En la Figura 4 se observan ejemplos de interacciones de copigmentación.

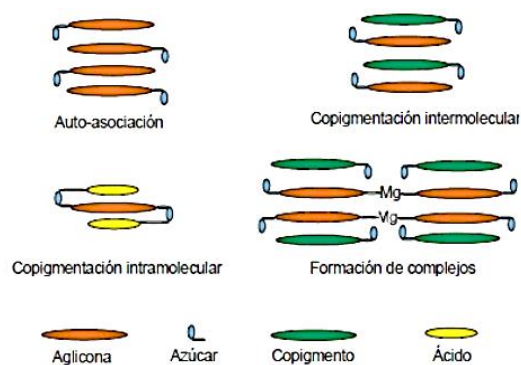


Figura 4. Interacciones de copigmentación de las antocianinas.

Fuente. (R L Jackman y Smith, 1996).

1.3.1.8. Azúcares

La sustitución del azúcar también mostró ser un papel importante en las características espectrales y de color del pigmento, con un cambio hipocrómico (disminución de λ_{max} visible) causado por la presencia de glicosilación (Giusti y Wrolstad, 2003).

1.3.1.9. Oxígeno y ácido ascórbico

El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico están relacionados sobre la estabilidad de las antocianinas (Garzón, 2008). El ácido ascórbico provoca la decoloración de la antocianina y el oxígeno oxida al ácido ascórbico y lo convierte en peróxido de hidrógeno que a su vez oxida la antocianina.

1.3.1.10. Otros factores

La actividad de agua de la matriz afecta la estabilidad del color (Garzón, 2008). Incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable.

1.3.2. Extracción de antocianinas

La elección de un método de extracción es de gran importancia y depende en gran parte del propósito de la extracción, la naturaleza de las antocianinas y las fuentes del material. El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en distintos disolventes como alcoholes, acetona, dimetilsulfóxido y agua.

En la mayoría de las frutas y verduras, los pigmentos antociánicos están localizados cerca de la superficie. Los procedimientos de extracción involucran el uso de disolventes ácidos, los cuales desnaturalizan las membranas del tejido celular y disuelven los pigmentos.

En relación a la extracción, algunos autores señalan que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes (Giusti y Wrolstad, 2003), es por ello que se ha propuesto el uso de ácidos orgánicos más débiles, como fórmico, acético, cítrico o tartárico; que puedan ser removidos durante la concentración del pigmento, así mismo se han sugerido procedimientos en ausencia de ácidos.

Al escoger el solvente que se va a utilizar, es necesario tener en cuenta aspectos como la facilidad de manipulación, el precio, la seguridad, el riesgo ambiental y la toxicidad. Por ello se recomienda para estos procesos las mezclas hidro – alcohólicas.

Durante la extracción ocurren dos procesos paralelos: la lixiviación de las sustancias solubles de células rotas y la difusión de las sustancias solubles de las células que no se rompieron. La lixiviación es rápida mientras que la difusión es lenta (Garzón, 2008).

Para la extracción de pigmentos a partir de los vegetales, se debe tomar en cuenta las siguientes condiciones (Almeida Gudiño, 2012):

- El rendimiento o recuperación máxima de los colorantes para un óptimo aprovechamiento de la materia prima.
- Concentración de los extractos, lo que incide en el menor gasto de solvente por unidad de peso de la materia prima. También hay que considerar el ahorro en las operaciones de filtración y concentración.
- Baja o nula toxicidad del solvente empleado, para facilitar la seguridad del personal que participa en el proceso y porque el producto final está destinado para el consumo humano.

En el proceso de extracción, las variables que influyen según (Ullauri, 2010) son:

- Tamaño de partícula

En la práctica el proceso de extracción es mejor cuando menor es el tamaño de la partícula ya que existe mayor área de contacto con el solvente.

- Agitación

La agitación hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en los compuestos de interés, entren en contacto con el sólido y se alcance un nuevo equilibrio de saturación, aumentando la eficiencia del proceso.

- Temperatura

La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura. Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas sustancias de interés pueden ser termolábiles y ser destruidas por causa de altas temperaturas.

- Naturaleza del solvente

La solución de alcohol etílico/agua es el solvente por excelencia para la obtención de extractos. Cuando no existen estudios específicos se recomienda utilizar una mezcla de alcohol 1:1 para las partes aéreas de la planta.

- Tiempo de extracción

Se debe determinar experimentalmente en función del solvente, la planta y del equipo seleccionado. Esta variable es importante en el sentido que debe ser suficiente para obtener los compuestos de interés, pero tampoco debe ser excesivo ya que aumenta los costos de extracción.

1.3.3. Fuentes de las antocianinas

Las antocianinas o antocianos son los pigmentos comunes en la mayoría de las frutas rojas: fresa, frambuesa, ciruela, cereza, mora, mirtilo, arándano, grosella, uva, naranja sanguina, pomelo rosa, granada, baya de sauco, etc. (Vicente Castillo, 2013). En la Figura 5 se observan algunas de ellas y sus concentraciones en mg/100g peso húmedo. (Unidades expresadas según los datos en la referencia citada)

| ALIMENTOS | PIGMENTO (mg/100 g) | REFERENCIAS |
|----------------|---------------------|--|
| Manzana | 1,7 | Koponen <i>et al.</i> 2007 |
| Arándano | 300-698 | Mazza y Miniati, 1993 |
| Grosella negra | 130-476 | Timberlake, 1998; Wu, <i>et al.</i> 2006 |
| Cereza | 2-450 | Harbone y Hall, 1964; Mazza y Miniati, 1993; Gao y Mazza, 1995 |
| Berenjena | 8-85 | Wu <i>et al.</i> , 2006; Koponen <i>et al.</i> , 2007 |
| Lechuga | 2,2-5,2 | Wu <i>et al.</i> , 2006; Koponen <i>et al.</i> 2007 |
| Ciruela | 2-25 | Wu <i>et al.</i> , 2006 |
| Frambuesa | 20-687 | Wang y Lin, 2000; Wu <i>et al.</i> , 2006. |
| Lombarda | 322 | Wu <i>et al.</i> , 2006 |
| Grosella | 22 | Koponen <i>et al.</i> , 2007 |
| Cebolla roja | 23,3-48,5 | Ferreres <i>et al.</i> , 1996; Wu <i>et al.</i> , 2006. |
| Vino tinto | 16,4-35 | Bakker y Timberlake, 1985; Teissedre y Landrault, 2000; Frankel <i>et al.</i> , 1995 |
| Fresa | 19-55 | Lópes da Silva <i>et al.</i> , 2007 |
| Mora | 82.5-325.9 | De Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2010 |
| Uva tinta | 30-750 | De Pascual-Teresa <i>et al.</i> , 2010 |

Figura 5. Concentración de antocianinas en alimentos.

Fuente. (Pascual-Teresa, Moreno y García-Viguera, 2010).

1.4. Generalidades de la Mora (*Morus nigra*)

1.4.1. Características botánicas

Pertenece a la Familia de Moraceae, posee el nombre científico de *Morus nigra*, llamado comúnmente Mora Negra, Moral. Existen tres especies principales de morera para la producción de frutas: negra (*Morus nigra*), roja (*Morus rubra*) y blanca (*Morus alba*), siendo la negra la que mayor contenido total de fenoles y flavonoides tiene en comparación con las otras (Ercisli y Orhan, 2007).

Es un árbol de porte medio que puede medir de 4 a 5 metros de altura, posee corteza ligeramente rugosa, oscura y copa amplia. Hojas de coloración verde clara. Flores pequeñas de coloración blanco-amarillo. La fruta es de color rojo oscuro, casi negro ya maduro, con pulpa roja oscura comestible. Presenta crecimiento rápido, se adapta a cualquier tipo de suelo, prefiriendo los húmedos y profundos. Fructifican de septiembre a noviembre (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006).

La morera se encuentra en las regiones templadas y subtropicales del hemisferio norte, así como en los trópicos del hemisferio sur, ya que puede crecer en una amplia variedad de condiciones climáticas, topográficas y de suelo (Imran *et al.*, 2010).

1.4.2. Usos

Los frutos de mora son ricos en antocianinas y deberían ser explotados para la producción industrial de colorante natural que se utilizará en la industria alimentaria (Ramírez Gonzalez, Neira Gonzalez y Correa, 2007; Kostić *et al.*, 2013).

Se utiliza principalmente para la fabricación de alimentos procesados como *pekmez*, mermeladas, jugos, licores, tintes naturales y frutas congeladas de helado (Fazaeli, Hojjatpanah y Emam-Djomeh, 2013; Kostić *et al.*, 2013). Debido a su naturaleza comestible, facilidad de acceso y factor económico, *M. nigra* puede ser una buena fuente de compuestos activos (Mallhi *et al.*, 2014).

1.4.3. Propiedades

Esta fruta contiene una alta concentración de valiosos agentes bioactivos, tales como compuestos fenólicos, que tienen beneficios potenciales para la salud. Las moras al poseer en su composición compuestos fenólicos, antocianinas en particular se le atribuyen distintas propiedades tales como antiinflamatorias, antivirales, antimicrobianas y actividad antioxidante (Mahmood *et al.*, 2012).

Además se ha informado de que sus extractos tienen actividad antibacteriana y fungicida de amplio espectro contra microorganismos dañinos (Park *et al.*, 2003; Mazimba, Majinda y Motlhanka, 2011; Karabiyikli, Degirmenci y Karapinar, 2016).

El jugo fresco de morera negra fue estudiado y se detectó actividad antimicrobiana tanto para las bacterias Gram-positivas como para las Gram-negativas (Khalid, Fawad y Ahmed, 2011).

1.5. Antimicrobianos

Existe una urgente y continua necesidad de descubrir nuevos compuestos antimicrobianos con diversas estructuras químicas, ya que uno de los grandes problemas que enfrentamos actualmente, es el desarrollo de resistencia bacteriana a los antibióticos. Ante lo cual los extractos vegetales con esa acción podrían ser capaces de burlar dichos mecanismos de resistencia, ya que el uso de éstos es limitado, y las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Concepción García, 2006; Pérez *et al.*, 2011; Soto Huamaní, 2014).

El modo de acción de los agentes antimicrobianos depende del tipo de microorganismo afectado y se relaciona principalmente con la estructura de su pared celular y el arreglo de la membrana externa (Cubillo Arrieta, 2007).

El incremento en el número de brotes asociados a alimentos contaminados con microorganismos patógenos, consumidores más exigentes y regulaciones alimentarias cada vez más estrictas; han despertado el interés por encontrar alternativas para los preservantes químicos sintéticos, tales como los compuestos antimicrobianos naturales (Ponce *et al.*, 2003; Cubillo Arrieta, 2007).

Es por todo lo antes expuesto que una de las alternativas en la lucha contra la resistencia, es el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos a través de la obtención de principios activos o de compuestos de plantas que puedan servir como antimicrobianos, brindando además de especificidad contra el patógeno, la seguridad para el consumidor (Aldana Mejía, 2010).

CAPITULO II – Metodología

En la Figura 6 se muestra un diagrama general del proceso que se siguió para cumplir con cada uno de los objetivos del trabajo.

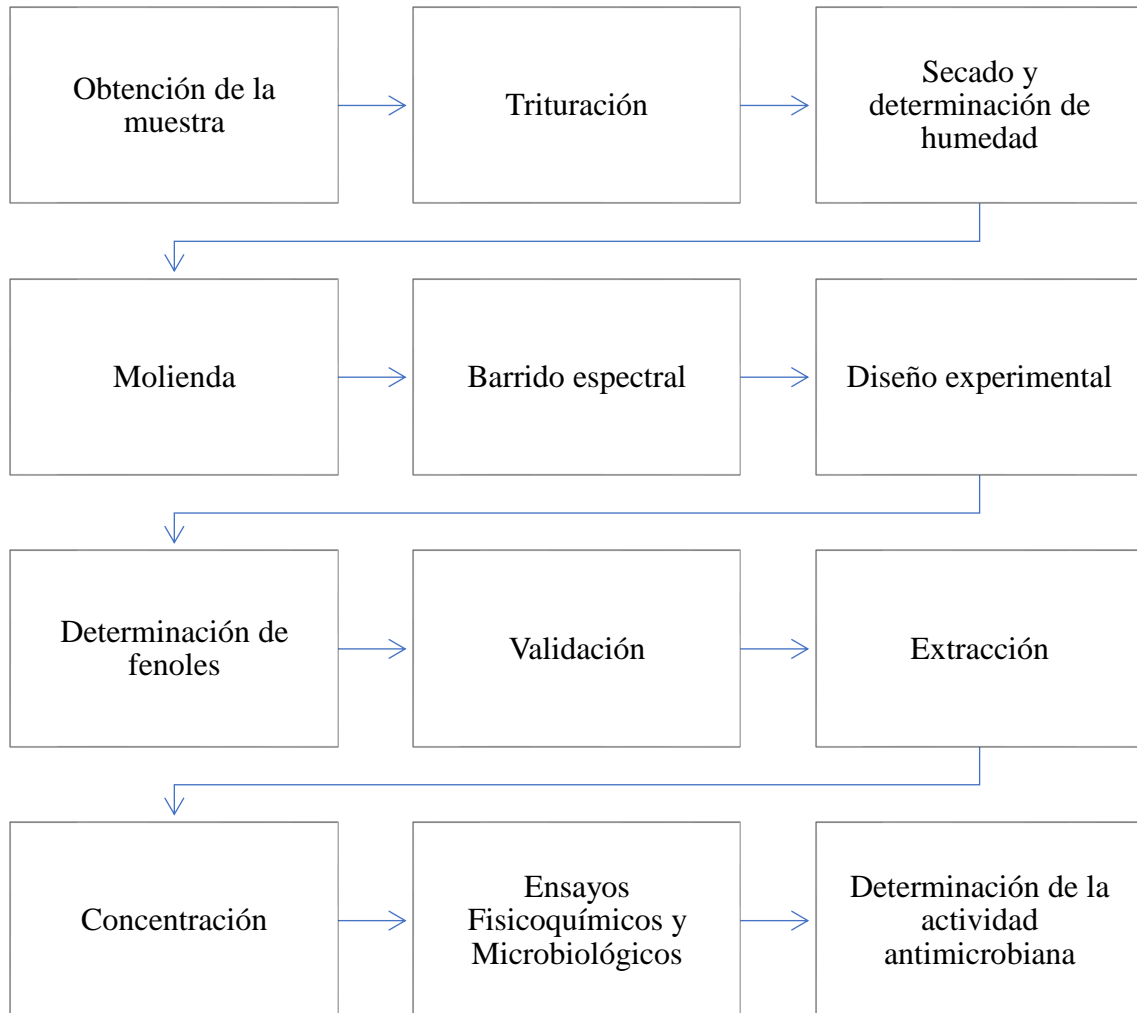


Figura 6. Diagrama de flujo para la obtención de un colorante natural con capacidad antimicrobiana a partir de *Morus nigra*

Fuente. Elaboración propia.

2.1. Materia prima

2.1.1. Obtención de la muestra

Para la obtención de la muestra se siguió el plan de muestreo sugerido por la Norma Venezolana (COVENIN N°1769, 1981), correspondiente a la toma de muestra de frutas y hortalizas. Estuvieron conformadas por los frutos de la planta de Mora (*Morus nigra*), perteneciente a la familia de las moráceas. Fueron recolectadas manualmente de distintos arboles de la zona centro de Encarnación, Paraguay.

Se seleccionaron los frutos que se encontraban en buen estado, con la finalidad de obtener una muestra homogénea, descartando para ello los frutos en inmadurez fisiológica, no enteros, malformados, con presencia de daños por insectos – plagas, con deformaciones, roturas, rajaduras, raspaduras, manchados, podridos o con presencia de hongos (García Méndez, 2008).

2.1.2. Trituración

Los frutos se pesaron y trituraron con una procesadora de alimentos (Philips) hasta obtener una pasta, con el fin de generar mayor área superficial y así facilitar el secado.

2.1.3. Secado y determinación de humedad

La pasta obtenida se secó en estufa a 60 °C por 10 h. El secado tuvo el objetivo de disminuir el contenido de humedad, y así poder almacenarlas sin que se deterioren. Se pesaron 5 g de muestra seca y se llevaron a un humidímetro con la finalidad de determinar el porcentaje de humedad presente en la muestra. Esta determinación se realizó por duplicado.

2.1.4. Molienda

Una vez seca la materia prima se procedió con la molienda del material, utilizando un mortero de porcelana. Esto se realizó para aumentar el área de contacto entre el solvente y el material vegetal.

2.2. Barrido espectral

Se ensayaron la concentración de solvente, temperatura y tiempo de extracción según los puntos centrales del diseño de experimentos; éstos fueron, etanol 40 % a 53 °C durante 45 min. Se pesaron 0,5 g de frutos secos y molidos tal como se describe en la sección 2.1. y se colocaron en distintos tubos tipo Falcon de 15 mL, se añadieron 10 mL de la concentración etanólica en cada tubo y se incubaron a las condiciones predichas. Una vez transcurrido el tiempo se procedió al centrifugado.

Con el extracto obtenido se realizó un barrido espectral entre 200 – 700 nm a fin de determinar la longitud de onda de mayor absorbancia de las antocianinas; teniendo en cuenta dos bandas de absorción en la región UV (260-285 nm) y la región visible (490-550 nm) para este tipo de compuestos (López Valdez, 2012). La extracción y las mediciones se realizaron por triplicado.

2.3. Diseño experimental

Para la extracción del colorante, a partir de un peso fijo de frutos de mora secos y molidos (0,5395 g), se ensayó cada factor a 5 niveles (Tabla 3). Las variables de respuesta fueron las absorbancias a las longitudes de onda de 285 y 525 nm que se determinaron mediante un barrido espectral (sección 3.1.) y el contenido de fenoles totales.

Los ensayos se realizaron siguiendo un diseño de **compuesto central 3² + estrellas**, definido mediante software estadístico *Statgraphics Centurión XVI*, con 17 corridas en total y 7 grados de libertad para el error. El diseño completo se observa en la Tabla 5.

Tabla 3. Factores a evaluar en la extracción de antocianinas de *Morus nigra* y sus respectivos niveles.

| <i>Factores</i> | <i>Niveles</i> | | | <i>Unidades</i> |
|-----------------|----------------|----------|-------------|-----------------|
| | <i>- 1,68</i> | <i>0</i> | <i>1,68</i> | |
| Etanol | 0 | 40 | 80 | % |
| Temperatura | 25 | 53 | 80 | °C |
| Tiempo | 30 | 45 | 60 | Min |

Se procedió de igual manera que para el barrido espectral, los frutos molidos se colocaron en distintos tubos tipo Falcon de 15 mL, se añadieron 10 mL de las distintas concentraciones de etanol – agua en cada uno de los tubos, y cada tubo se sometió a las condiciones de tiempo y temperatura según cada corrida del diseño experimental. Una vez transcurrido el tiempo de extracción se procedió a centrifugar las muestras a 2500 rpm por 10 min.

2.4. Determinación de fenoles

El contenido fenólico total en cada extracto se determinó utilizando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (García Martínez, Fernández Segovia y Fuentes López, 2015) con modificaciones. Se realizó una curva de calibrado con patrones de concentración conocida a partir de una disolución madre de 900 ppm (0,045 g de ácido gálico disuelto en 50 mL de agua destilada) y a partir de ella se prepararon las diluciones que se presentan en la Tabla 4. Esta curva de calibrado se realizó por duplicado.

Tabla 4. Composición de patrones de ácido gálico para la determinación de fenoles.

| <i>Patrones</i> | <i>Concentración (ppm)</i> | <i>Composición</i> |
|-----------------|----------------------------|--|
| P1 | 900 | 1000 μ L disol. Madre |
| P2 | 675 | 750 μ L disol. Madre + 250 μ L agua destilada |
| P3 | 450 | 500 μ L disol. madre + 500 μ L agua destilada |
| P4 | 225 | 250 μ L disol. madre + 750 μ L agua destilada |
| P5 | 112.5 | 125 μ L disol. madre + 875 μ L agua destilada |
| P6 | 56,25 | 62.5 μ L disol. madre + 937,5 μ L agua destilada |

Una vez preparadas las diluciones de la curva de calibrado, se añadieron a todos los tubos 3 mL de agua destilada, 40 μ L de agua, patrón o muestra y 200 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu a todos los tubos, se homogenizó el contenido, se dejó reposar por 5 min y se añadieron 600 μ L de Na₂CO₃ (20 %), cerrando y agitando nuevamente. Se llevaron los tubos a 40 °C durante 30 min y, una vez fríos, se midió la absorbancia a 765 nm. El contenido total de fenoles se expresó como equivalente de ácido gálico (GAE). El ácido gálico se seleccionó como referencia de la medida de polifenoles totales porque se encuentra a alta concentración en frutas y verduras y por ser el habitualmente utilizado en la determinación de polifenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Vicente Castillo, 2013).

2.5. Extracción

Se pesaron 35 g de mora seca ya molida y se agregaron 700 mL de una solución de etanol al 6,43 %, llevando ésta a 75 °C en baño termostático durante 30 min. Seguidamente se la filtró y la fracción líquida se guardó en un frasco color caramelo para evitar así su exposición a la luz y al oxígeno.

2.6. Concentración

Se realizó en un evaporador rotatorio al vacío marca SENCO, el cual permite disminuir el punto de ebullición de la mezcla y con ello aumentar la facilidad de evaporación sin someter el extracto a elevadas temperaturas, se trabajó a 60 °C con una presión de 0,8 atm durante 2 h aproximadamente, obteniéndose 50 mL de concentrado.

2.7. Validación

Se hicieron extracciones, por triplicado, bajo las condiciones predichas como óptimas (Tabla 9), según las gráficas de superficie de respuesta, siendo éstas para 285 nm; 6,46 % de concentración de etanol a 75,09 °C y un tiempo de 30 min; para 525 nm, la misma cantidad de tiempo pero a 55,6 °C y 0 % de etanol; y para los fenoles totales una concentración de etanol de 44,5 %, a la temperatura de 80 °C y un tiempo de extracción 30 min, y se procedió a determinar la absorbancia y el contenido de fenoles totales.

2.8. Ensayos fisicoquímicos.

2.8.1. Medición del pH:

Se midió utilizando el método potenciométrico.

2.8.2. Acidez titulable:

Se siguió el método de la Norma Venezolana (COVENIN N°1151, 1977), preparando las muestras según las indicaciones para soluciones fuertemente coloreadas con modificaciones; ya que en lugar de utilizar fenolftaleína como indicador para determinar el punto final, se utilizó un potenciómetro y el punto final quedó determinado al alcanzar un pH de 8,3. Los resultados se expresaron en g/mL de ácido málico ya que es el ácido principal encontrado en la mora. (Redd, Hendrix y Hendrix, 1992; Ayala, Valenzuela y Bohórquez, 2013; Karaaslan et al., 2016).

2.8.3. Azúcares reductores:

Para medir el contenido de azúcares, se filtró el extracto a través de 0,45 µm y se inyectó 20 µL en HPLC conectado a una columna amino de 250 x 4,6 mm. Para el análisis por HPLC, la fase móvil fue 70:30 acetonitrilo – agua. La separación cromatográfica se realizó en condiciones isocráticas utilizando la fase móvil anterior con una velocidad de flujo de 1,2 mL/min. Un detector de índice de refracción (IR), Modelo 410, se utilizó para el análisis. Los cromatogramas se contrastaron con los de los patrones de glucosa y fructosa de concentraciones diferentes.

2.8.4. Contenido total de fenoles:

El contenido fenólico total en cada extracto se determinó usando el método espectrofotométrico descrito anteriormente en la sección 2.4.

2.9. Ensayos microbiológicos

Para todos los ensayos microbiológicos se siguieron las técnicas descritas por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos sus siglas en inglés ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2000).

2.9.1. Recuento de Mesófilos Aerobios Totales:

Enumeración de microorganismos aerobios mesófilos. Se realizó por duplicado según el Método de Recuento en placa. Método 1.

2.9.2. Determinación de Coliformes Termotolerantes:

Recuento de Coliformes. Se realizó por duplicado según la Técnica del Número más Probable (NMP). Método 2.

2.9.3. Recuento de Mohos y Levaduras:

Recuento de Mohos y Levaduras se realizó por duplicado según el Método de Mohos y Levaduras por siembra en placa en todo el medio.

2.10. Determinación de la actividad antimicrobiana del colorante

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (MIC) usando el método de microdilución adaptando la metodología descrita por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS) para sustancias antimicrobianas (CLSI, 2012), con algunas modificaciones.

Para el ensayo, se partió de la cepa pura de *Escherichia coli* ATCC 25922 la que se sembró en caldo nutritivo (peptona 10g/L - extracto de carne 3 g/L y cloruro de sodio 5 g/L) ajustando previamente el pH con NaOH hasta 7,2 e incubando a 37 °C durante 18 h, para obtener un cultivo en fase estacionaria temprana.

Una vez obtenida la solución bacteriana se estandarizó comparando con la escala de Mc Farland hasta alcanzar la turbidez de 0,5, medida a una longitud de onda de 600 nm, equivalente a una concentración de bacterias del orden de 10^7 - 10^8 células/mL.

Se prepararon soluciones a distintas concentraciones de GAE para los extractos de mora siendo éstas 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 y 1 g/L, respectivamente, colocados en tubos de

ensayo. A éstos se les adicionó 40 µL de la suspensión microbiana (10^5 células/mL) y se incubó a 37 °C, por 24 h. La operación se realizó por triplicado.

Los resultados se determinaron midiendo la densidad óptica de los cultivos a 600 nm con un espectrofotómetro utilizando una recta de calibrado de absorbancia vs. concentración del microorganismo previamente obtenida en el grupo de trabajo, **Y (g/mL) = 0,016*Abs a 600nm.**

Se determinó la MIC como la concentración más baja de colorante de mora que impida el crecimiento de *E. Coli* ATCC 25922 por medio de turbidez visible a simple vista en comparación con el testigo (Andrews, 2001; Fangio, Iurlina y Fritz, 2007; Salaheen *et al.*, 2014).

CAPITULO III – Resultados y Discusión

3.1. Barrido espectral

Las muestras presentaron una humedad de 7,92 %. Se procedió a la elaboración de un barrido espectral entre los 200 y 700 nm a fin de determinar las longitudes de onda de mayor absorbancia de las antocianinas. Las longitudes de onda seleccionadas fueron de 285 y 525 nm, lo cual concuerda satisfactoriamente con datos teóricos confirmados en otros estudios (Hassimotto, Genovese y Lajolo, 2007), en donde se describe un pico máximo de absorción de 285 nm para piranoantocianinas (Castañeda Ovando *et al.*, 2008) y 525 nm para antocianinas (Aguilera Ortíz *et al.*, 2011), tal como se muestra en la Figura 7. Estas longitudes de onda fueron las que se utilizaron para las mediciones posteriores.

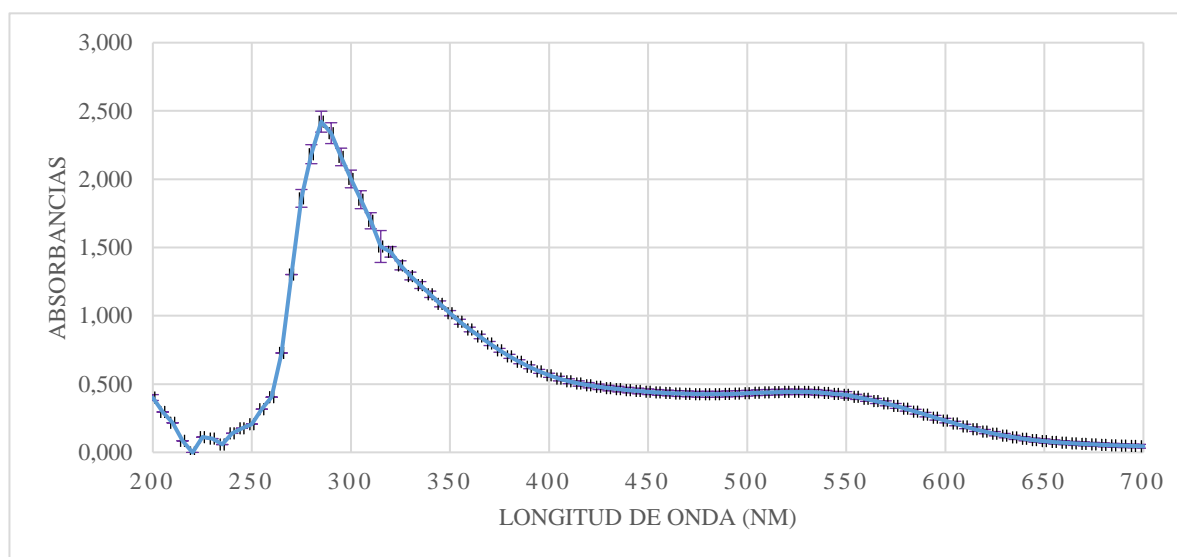


Figura 7. Barrido espectral de un extracto obtenido de *Morus nigra*.

3.2. Diseño experimental

Para establecer la influencia de las variables utilizadas sobre el proceso de extracción del colorante se realizaron una serie de ensayos siguiendo el diseño de experimentos compuesto central 3^2 + estrellas, definido mediante el software estadístico *Statgraphics Centurión XVI*.

Los resultados experimentales obtenidos al realizar las mediciones de las absorbancias de los extractos utilizando dicho diseño se presentan en la Tabla 5; la cual contiene los promedios de las absorbancias y el contenido fenólico.

Tabla 5. Diseño compuesto central 3^2 + estrellas para evaluar la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo de extracción de antocianinas en *Morus nigra*.

| Diseño experimental y las combinaciones de cada factor | | | | | | |
|---|-----------------|--------------|---------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| <i>Corrida</i> | <i>% Etanol</i> | <i>Temp.</i> | <i>Tiempo</i> | <i>Abs</i> <i>285nm</i> | <i>Abs</i> <i>525nm</i> | <i>Fenoles</i> <i>(g/L)</i> |
| 1 | -1 | 1 | 1 | 0,653 | 0,433 | 1,170 |
| 2 | -1,68 | 0 | 0 | 0,599 | 0,453 | 1,106 |
| 3 | 0 | 0 | -1,68 | 0,579 | 0,41 | 1,406 |
| 4 | -1 | 1 | -1 | 0,739 | 0,556 | 1,518 |
| 5 | 1 | -1 | -1 | 0,517 | 0,351 | 1,160 |
| 6 | 1 | 1 | -1 | 0,585 | 0,336 | 1,379 |
| 7 | 1 | -1 | 1 | 0,485 | 0,316 | 1,068 |
| 8 | -1 | -1 | -1 | 0,603 | 0,48 | 1,213 |
| 9 | 1 | 1 | 1 | 0,662 | 0,459 | 1,483 |
| 10 | 0 | -1,68 | 0 | 0,371 | 0,294 | 1,267 |
| 11 | 0 | 1,68 | 0 | 0,619 | 0,429 | 1,313 |
| 12 | -1 | -1 | 1 | 0,562 | 0,451 | 1,384 |
| 13 | 0 | 0 | 1,68 | 0,622 | 0,461 | 1,541 |
| 14 | 1,68 | 0 | 0 | 0,300 | 0,259 | 0,985 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0,625 | 0,395 | 1,259 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0,585 | 0,483 | 1,342 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 0,584 | 0,433 | 1,554 |

Los datos de la Tabla 5 se analizaron para estudiar el efecto de la concentración de etanol, el tiempo y la temperatura de extracción sobre la absorbancia y el contenido fenólico, y esto permitió identificar cual fue el factor significativo sobre las respuestas.

3.2.1. Determinación de fenoles

El contenido fenólico de los extractos se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu, los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, éstos al reducirse dan origen a una mezcla de óxidos azules de tungsteno y molibdeno, los cuales exhiben una amplia absorción de luz, con un máximo de 765 nm. La Tabla 6 indica los valores de absorbancia que se obtuvieron en los seis patrones de ácido gálico empleados para realizar la recta de calibrado.

Tabla 6. Datos para la curva de calibrado para la determinación de fenoles totales.

| <i>Concentración de ácido gálico</i> | <i>Absorbancia (nm)</i> |
|--------------------------------------|-------------------------|
| 900 ppm | 0,951 ± 0,042 |
| 675 ppm | 0,760 ± 0,065 |
| 450 ppm | 0,468 ± 0,026 |
| 225 ppm | 0,275 ± 0,031 |
| 112,5 ppm | 0,163 ± 0,014 |
| 56,25 ppm | 0,092 ± 0,041 |

El contenido total de fenoles se obtuvo mediante la siguiente ecuación de la recta: **Concentración = - 0,0328 + 0,9654*Abs**, la cual se ve representada en la Figura 8.

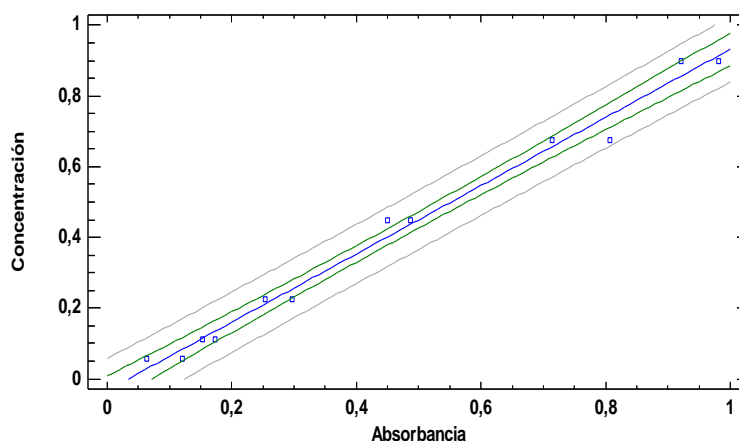


Figura 8. Recta de calibrado de ácido gálico para la determinación de fenoles totales.

El coeficiente de correlación obtenido fue de 0,994, y como es cercano a uno, indica una buena linealidad de la gráfica.

3.2.2. Análisis de Varianza para las distintas variables de respuesta

La Tabla 7 indica los resultados del análisis de varianza (ANOVA) para la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo de extracción sobre las antocianinas observadas a 285 nm. Como se observa en la Tabla 7, dos efectos tienen un valor-p menor que 0,05; siendo éstos la concentración de etanol y la temperatura, indicando que las diferencias son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0 %.

Tabla 7. ANOVA para las antocianinas detectadas a 285 nm.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-p</i> |
|----------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A: % Etanol | 0,048 | 1 | 0,048 | 8,18 | 0,024 |
| B: Temperatura | 0,058 | 1 | 0,058 | 9,83 | 0,016 |
| C: Tiempo | 0,000 | 1 | 0,000 | 0,00 | 0,974 |
| AA | 0,012 | 1 | 0,012 | 2,00 | 0,199 |
| AB | 0,000 | 1 | 0,000 | 0,01 | 0,936 |
| AC | 0,004 | 1 | 0,004 | 0,63 | 0,454 |
| BB | 0,003 | 1 | 0,003 | 0,51 | 0,499 |
| BC | 0,001 | 1 | 0,001 | 0,09 | 0,776 |
| CC | 0,005 | 1 | 0,005 | 0,85 | 0,388 |
| Error total | 0,041 | 7 | 0,006 | | |
| Total | 0,177 | 16 | | | |

El estadístico R-cuadrado indicó que el modelo, así ajustado, explica 76,7 % de la variabilidad en absorbancia. Pero en este caso se utilizó el R^2 ajustado cuyo valor es 46,86 %, ya que es más adecuado para comparar modelos con distintos números de variables independientes.

La Tabla 8 muestra los resultados del ANOVA para las antocianinas detectadas a 525 nm. En este caso, la concentración de etanol tiene un valor-p menor que 0,05; indicando que la diferencia que provoca los distintos niveles es estadísticamente significativa sobre la variable respuesta, con un nivel de confianza del 95 %, resultando no significativas la temperatura y el tiempo.

Tabla 8. ANOVA para las antocianinas detectadas a 525 nm.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-p</i> |
|----------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A: % Etanol | 0,045 | 1 | 0,045 | 15,70 | 0,005 |
| B: Temperatura | 0,012 | 1 | 0,012 | 4,36 | 0,075 |
| C: Tiempo | 0,000 | 1 | 0,000 | 0,01 | 0,915 |
| AA | 0,004 | 1 | 0,004 | 1,48 | 0,263 |
| AB | 0,001 | 1 | 0,001 | 0,21 | 0,658 |
| AC | 0,007 | 1 | 0,007 | 2,51 | 0,157 |
| BB | 0,003 | 1 | 0,003 | 1,20 | 0,310 |
| BC | 0,001 | 1 | 0,001 | 0,18 | 0,685 |
| CC | 0,001 | 1 | 0,001 | 0,30 | 0,602 |
| Error total | 0,020 | 7 | 0,003 | | |
| Total | 0,096 | 16 | | | |

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 79 % de la variabilidad en la absorbancia a 525 nm, mientras que el R² ajustada es de 52,06 %.

La Tabla 9 muestra el ANOVA y en este caso, la concentración de etanol en su expresión cuadrática tiene un valor-p menor que 0,05; indicando que es estadísticamente significativa, con un nivel de confianza del 95 %, resultando no significativas la temperatura y el tiempo.

Tabla 9. ANOVA para fenoles totales.

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-p</i> |
|----------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| A: % Etanol | 0,012 | 1 | 0,012 | 0,56 | 0,480 |
| B: Temperatura | 0,047 | 1 | 0,047 | 2,26 | 0,177 |
| C: Tiempo | 0,0002 | 1 | 0,0002 | 0,01 | 0,911 |
| AA | 0,143 | 1 | 0,143 | 6,82 | 0,035 |
| AB | 0,037 | 1 | 0,037 | 1,76 | 0,226 |
| AC | 0,004 | 1 | 0,004 | 0,21 | 0,658 |
| BB | 0,008 | 1 | 0,008 | 0,36 | 0,565 |
| BC | 0,013 | 1 | 0,013 | 0,62 | 0,455 |
| CC | 0,017 | 1 | 0,017 | 0,82 | 0,396 |
| Error total | 0,146 | 7 | 0,020 | | |
| Total | 0,467 | 16 | | | |

El estadístico R-cuadrado indica que el modelo, así ajustado, explica 68,7 % de la variabilidad en absorbancia y el R^2 ajustado el 28,5 %.

3.2.3. Diagramas de Pareto

El diagrama de Pareto se utiliza para visualizar cuales variables independientes presentan mayor impacto sobre la variable de respuesta, y si ese impacto es positivo o negativo. En la Figura 3 se muestran los gráficos de Pareto para el diseño estadístico.

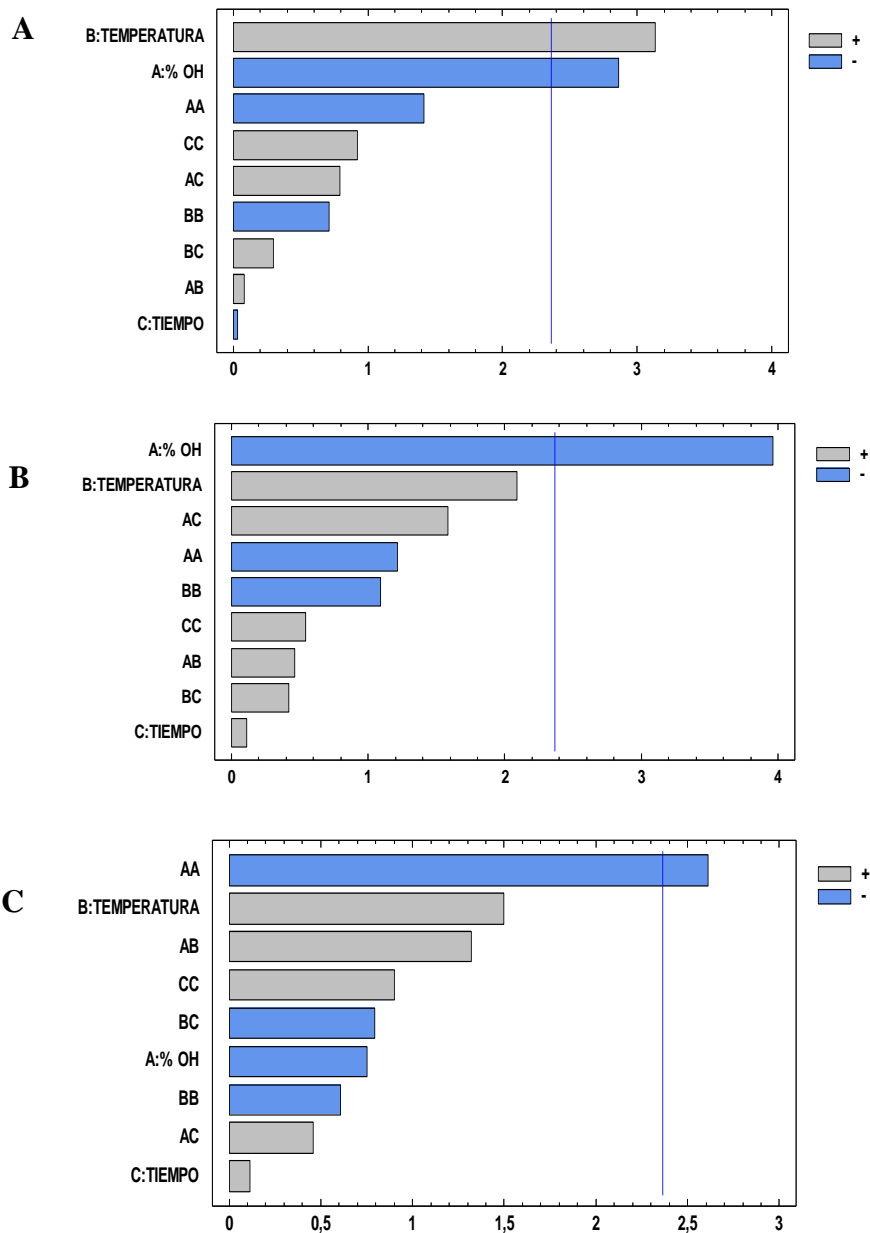


Figura 9. Diagrama de pareto estandarizado para las respuestas.

Como se puede corroborar en el Figura 9, la temperatura y la concentración de etanol influyen tanto positiva como negativamente en la absorbancia a 285 nm del colorante, respectivamente (Figura 9A). En cambio, en la absorbancia a 525 nm sólo la concentración de etanol tuvo un efecto negativo estadísticamente significativo (Figura 9B). Respecto a los fenoles totales (Figura 9C), la concentración de etanol en su expresión cuadrática tuvo efecto negativo estadísticamente significativo. Un factor cuadrático negativo y estadísticamente significativo, indica que la variable respuesta disminuyó cuadráticamente, a medida que el nivel del factor se incrementaba (Rodríguez *et al.*, 2017).

3.2.4. Modelo Ajustado

En base a las corridas del diseño experimental y los datos obtenidos de las variables respuesta, se ajustó un modelo para cada una de las variables como pueden verse en las ecuaciones 1, 2 y 3. Estas ecuaciones permiten calcular cada variable de respuesta en función de las variables independientes (concentración de etanol, la temperatura y el tiempo), e indican de qué manera se comportaría cada una de las respuestas manipulando dichas variables.

$$(1) \quad \text{Abs285} = 0,592 - 0,059 * OH + 0,065 * T - 0,0007 * t - 0,032 * OH^2 + 0,002 * OH * T + 0,021 * OH * t - 0,016 * T^2 + 0,008 * T * t + 0,02 * t^2$$

$$(2) \quad \text{Abs525} = 0,434 - 0,057 * OH + 0,030 * T + 0,001 * t - 0,019 * OH^2 + 0,009 * OH * T + 0,03 * OH * t - 0,017 * T^2 + 0,008 * T * t + 0,009 * t^2$$

$$(3) \quad \text{Fenoles (g/L)} = 1,382 - 0,029 * OH + 0,059 * T + 0,005 * t - 0,112 * OH^2 + 0,068 * OH * T + 0,024 * OH * t - 0,026 * T^2 - 0,040 * T * t + 0,039 * t^2$$

Donde:

T: Temperatura

t: Tiempo

OH: Concentración de etanol

Estas ecuaciones permiten calcular la variable de respuesta en función de las variables dependientes tales son la concentración de etanol, la temperatura y el tiempo, e indica de qué manera variaría la absorbancia manipulando dichas variables.

3.2.5. Superficie de respuesta estimada

A partir de las ecuaciones (1), (2), y (3) se analizó la influencia de las variables de proceso estudiadas. Para ello, se elaboraron diferentes gráficos de superficie de respuesta (Figura 10). Dado que se trabajó con tres factores (concentración de etanol, temperatura, y tiempo de extracción) y tres variables de respuestas (absorbancia a 285 nm, absorbancia a 525 nm y fenoles totales), los gráficos se obtuvieron manteniendo uno de los factores constantes en el punto central y variando los otros dos.

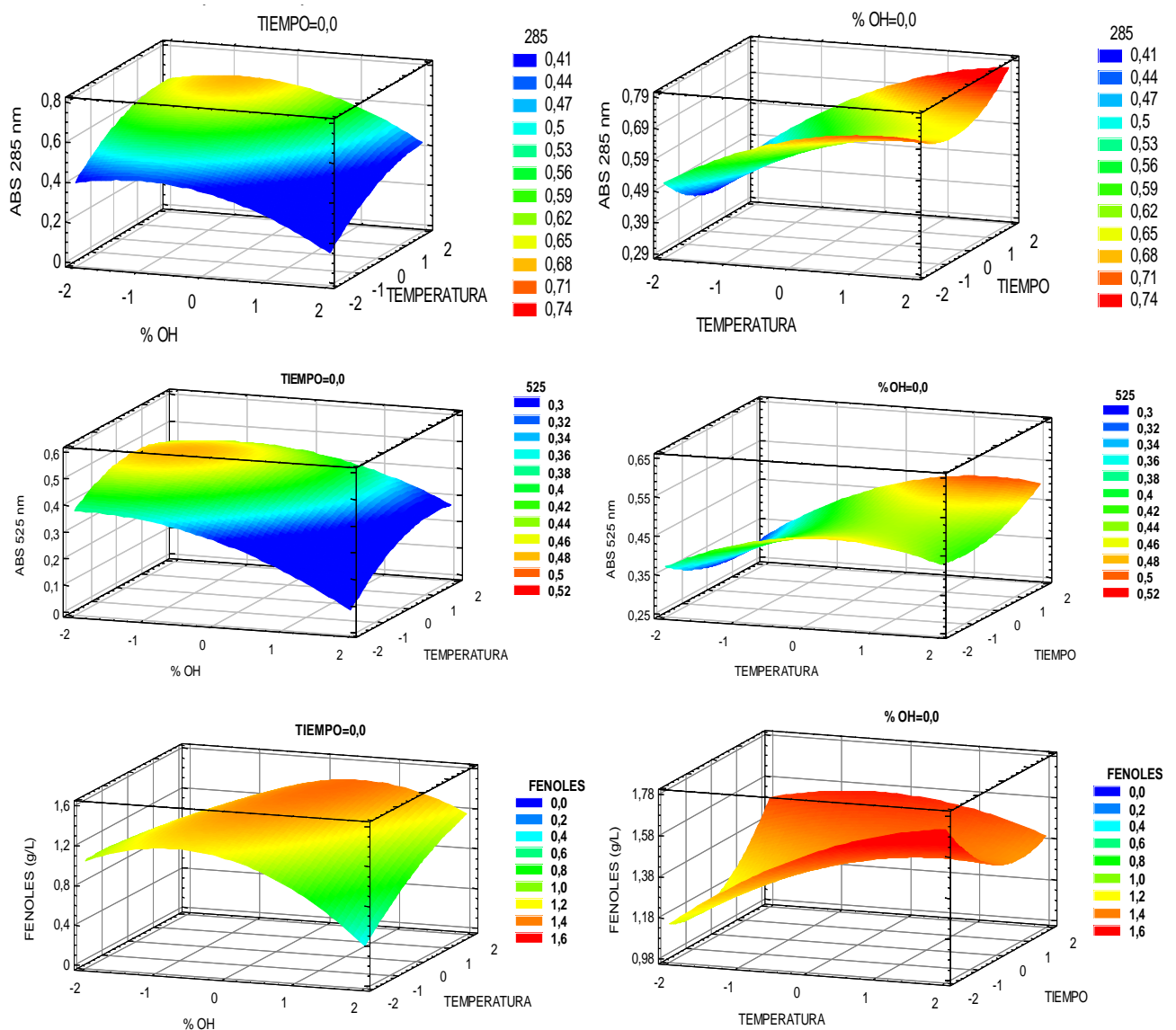


Figura 10. Superficie de respuesta estimada para las variables de respuestas.

Se puede observar que, para la interacción entre la concentración de etanol y la temperatura de extracción, el máximo en la variable respuesta se obtuvo en un rango cercano para ambas absorbancias, sin embargo, se observa también un desplazamiento a niveles mayores en la superficie correspondiente a fenoles totales. Resultados similares se observaron en la interacción entre el tiempo y la temperatura de extracción, donde las gráficas para ambas absorbancias son similares y la zona con mayor valor de la variable respuesta corresponde a los niveles altos de ambas variables. Para fenoles totales, sin embargo, los valores máximos corresponden a niveles altos de temperatura y bajos de tiempo de extracción.

En la Tabla 10 se observan los valores óptimos de cada variable estudiada según las gráficas de superficie de respuesta.

Tabla 10. Valores óptimos para maximizar la obtención de antocianinas en extractos obtenidos a partir de *Morus nigra*.

| <i>Factores</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Valores óptimos</i> | | |
|------------------|-------------|-------------|------------------------|--------------|------------------------|
| | | | <i>285nm</i> | <i>525nm</i> | <i>Fenoles totales</i> |
| Etanol (%) | 0 | 80 | 6,5 | 0 | 44,8 |
| Temperatura (°C) | 25 | 80 | 75,1 | 55,6 | 80 |
| Tiempo (min) | 30 | 60 | 30 | 30 | 30 |

3.3. Validación

Para validar el modelo y el resultado máximo obtenido, se realizó una nueva prueba con 3 repeticiones usando los valores obtenidos en la Tabla 9, siendo éstas para 285 nm; 6,5 % de concentración de etanol a 75,1 °C y un tiempo de 30 min; para 525 nm, la misma cantidad de tiempo pero a 55,6 °C y 0 % de etanol; y para los fenoles totales una concentración de etanol de 44,8 %, a la temperatura de 80 °C y un tiempo de extracción 30 min.

La validación dió como resultado los valores que se muestran en la Tabla 11 y que se comparan con los óptimos teóricos proyectados según las gráficas de superficie de respuesta para todas las condiciones.

Tabla 11. Comparación de valores óptimos teóricos y experimentales de las antocianinas detectadas y los fenoles totales para extractos de *Morus nigra*.

| <i>Condiciones</i> | <i>Valor teórico</i> | <i>Valor experimental</i> |
|--------------------|----------------------|---------------------------|
| 285 nm | 0,759 | 0,642 ± 0,083 |
| 525 nm | 0,582 | 0,157 ± 0,301 |
| Fenoles | 1,629 | 1,581 ± 0,034 |

Con respecto a la concentración de etanol, las condiciones óptimas fueron de 6,5 y 0 %, coinciden con el trabajo realizado por Vicente Castillo, (2013) en donde realizó extracciones de antocianinas de diversos frutos coincidiendo con las longitudes de onda seleccionadas en este estudio con tres solventes distintos: agua, etanol y metanol, en ausencia y presencia de HCl, para determinar cuál resultaría más eficaz en la extracción; resultando el etanol el extractante menos apropiado para la extracción de dichos componentes y el agua el mejor, esto podría deberse a que a partir de 520 nm se detectan principalmente los antocianos que son solubles en agua.

Por su parte, con respecto a la temperatura, en la optimización de las condiciones de extracción de antocianinas de batata morada, (Fan *et al.*, 2008) lograron la mejor extracción a 80 °C; mientras que otros autores (Gorriti *et al.*, 2009), al estudiar la extracción de anocianinas a partir de maíz morado, obtuvieron que la mejor temperatura de extracción fue 75 °C; coincidiendo dichas temperaturas con este trabajo para las antocianinas medidas a 285 nm y los fenoles totales.

El tiempo de 30 min, coincide con lo predicho por otro autor que recomienda utilizar altas temperaturas por cortos tiempos de procesamiento para una mejor retención del pigmento (Markakis, 1982). En la investigación realizada por Fan *et al.*, (2008), se encontró que el rendimiento de antocianinas de la batata morada aumentó rápidamente en el nivel más bajo de tiempo.

De forma genérica, se puede decir que un proceso de extracción dependerá de la naturaleza química y del grado de polimerización de los propios compuestos, del sistema de extracción (polaridad de los disolventes y presencia de ácido), de la textura y del tamaño de partícula de la muestra que también puede influir; además hay sustancias en la matriz que pueden ejercer un efecto de interferencia (otros compuestos que absorben en UV-VIS y que actúan como interferencias (Arranz Martínez, 2010; Vicente Castillo, 2013).

Mediante este diseño se pudo determinar que para la extracción del colorante los factores de relevancia resultaron ser la concentración de etanol y la temperatura, no así el tiempo de extracción. Una vez establecidas las mejores condiciones, se procedió a la extracción, el cual luego fue concentrado, logrando con ello la evaporación del 80 % de la solución. A dicho colorante se le practicaron ensayos fisicoquímicos y microbiológicos (Secciones 3.4 y 3.5).

3.4. Ensayos fisicoquímicos

Se realizaron ensayos fisicoquímicos al colorante obtenido, dando como resultado un pH de $4,48 \pm 0,03$ en concordancia con lo establecido por Imran *et al.* (2010), trabajo en el cual se determinó que el pH del jugo de fruta de la especie *Morus* fue ácido, variando de 3,2 a 4,78. Otros autores Karabiyikli, Degirmenci y Karapinar (2016), obtuvieron valores de pH entre 3,70 y 4,89, dependiendo de la concentración de las muestras del jugo de *Morus nigra*.

Se determinó una acidez titulable de 1,42 g/mL coincidiendo la misma con los trabajos realizados por Rodríguez, Lopez y García (2010) donde se midió la acidez en distintos estados de madurez del fruto y con Ercisli y Orhan (2007) donde se realizó un estudio de la composición química de las distintas especies de *Morus*.

Los valores de los azúcares reductores detectados fueron de 6,9 g/100 mL para la glucosa y de 10,5 g/100mL para la fructosa; los valores obtenidos por Özgen, Serçe y Kaya (2009) en el trabajo denominado “Propiedades fitoquímicas y antioxidantes de las especies de moras ricas en antocianinas de *Morus nigra L.* y *Morus rubra L.*” para los mismos azúcares son de 5,81 g/100 mL y 5,27 g/100 mL respectivamente; las diferencias podrían deberse a que el trabajo se realizó en una zona geográfica distinta.

El contenido total de fenoles fue de 5,43 g GAE/L, que equivale a 7762 μg GAE/g, valor superior a lo reportado por Ercisli *et al.*, (2010); el mismo autor con otro colaborador en el 2007 hicieron un estudio de la composición química de *Morus alba L.* (blanca) *Morus rubra L.* (roja) y *Morus nigra L.* (negra) en donde se evidencia un alto contenido de fenoles totales para estas tres especies encabezado por *Morus nigra* (Ercisli y Orhan, 2007). También los resultados obtenidos por Čestić *et al.*, (2016) mostraron que las muestras preparadas de té de hojas de morera negra poseen un alto contenido de compuestos polifenólicos.

Los cambios en la composición fisicoquímica de la fruta pueden deberse a múltiples factores como la diferente variedad, la distinta madurez, la diferente zona geográfica de procedencia o el clima (Ercisli y Orhan, 2007).

En la Tabla 12 se resumen los resultados fisicoquímicos del colorante obtenido.

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos del colorante obtenido a partir de *Morus nigra*.

| <i>Análisis</i> | <i>Resultados obtenidos</i> |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Ph | 4,48 |
| Acidez titulable (g/mL) | 1,42 |
| Azúcares reductores | |
| Glucosa (g/100mL) | 6,9 |
| Fructosa (g/100mL) | 10,5 |
| Contenido de fenoles (g/L) | 5,43 |

3.5. Ensayos microbiológicos

Tanto los colorantes naturales como los artificiales deben de cumplir con pruebas microbiológicas establecidas para su aplicación en la Industria Alimenticia (Castillo Membreño y Ramírez González, 2006). En la Tabla 13 se resumen los resultados microbiológicos que se obtuvieron a partir del colorante obtenido.

Tabla 13. Resultados microbiológicos para el colorante obtenido.

| <i>Análisis</i> | <i>Unidad</i> | <i>Valores obtenidos</i> | | | | | |
|----------------------------|---------------|-----------------------------|-----|-----------------------------|------|-----------------------------|------|
| | | <i>Dil. 10⁻¹</i> | | <i>Dil. 10⁻²</i> | | <i>Dil. 10⁻³</i> | |
| Mesófilos Aerobios Totales | UFC/mL | 50 | 30 | < 50 | < 50 | < 50 | < 50 |
| Coliformes Totales | NPM/mL | < 3 | < 3 | < 3 | < 3 | < 3 | < 3 |

El colorante fue valorado microbiológicamente y presenta una aceptación en cuanto a los Coliformes totales ya que están dentro de los parámetros dados por el (Reglamento Técnico Centroamericano, 2005) y por las Especificaciones NTP 214,001:1985 citado por (García Nauto, 2014) en la “Evaluación de la estabilidad del colorante antocianico extraído a partir del fruto silvestre capachu *Hesperomeles escalloniifolia* (Schltdl) durante el almacenamiento de una bebida gasificada”.

3.6. Determinación antimicrobiana

Los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana se presentan en la Tabla 14. Los valores presentados muestran que el colorante obtenido inhibe el crecimiento del microorganismo ensayado (*Escherichia coli* ATCC 25922) a medida que aumenta su concentración a partir de 0,5 g GAE/L, lo que permite señalar que los componentes inhibitorios de los extractos vegetales no se modificaron con el tratamiento de extracción utilizado.

Tabla 14. Crecimiento microbiano de *Escherichia coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones de colorante obtenido de *Morus nigra*.

| <i>Concentración de GAE (g/L)</i> | <i>Concentración de biomasa (g/mL)</i> |
|-----------------------------------|--|
| 0 | 0,0120 ± 0,0013 |
| 0,25 | 0,0178 ± 0,0005 |
| 0,50 | 0,0052 ± 0,0016 |
| 0,75 | 0,0071 ± 0,0001 |
| 1 | 0,0010 ± 0,0002 |

(Yigit y Yigit, 2009) determinaron las actividades antibacterianas de los extractos de metanol y agua obtenidos de frutos y hojas de *Morus nigra* contra 77 cepas clínicas de 5 especies de bacterias (*Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) por dos métodos; difusión de disco y concentración inhibitoria mínima (CIM), dando como resultados para *E. Coli* un diámetro de la zona de inhibición de 10 mm y valores de MIC de 0,625 mg/mL. Este valor de MIC es menor que el reportado en el presente trabajo que fue de 1 g GAE/L.

La morera negra contiene ácidos orgánicos, taninos, altas cantidades de pigmentos y antocianinas (Huang, Ou y Wang, 2013). Todos estos compuestos exhiben propiedades antimicrobianas (Mahmood *et al.*, 2012). Podría explicar la disminución dramática en el número de bacterias inoculadas al final de la incubación. Sin embargo, esta conclusión obviamente necesita más investigación sobre los constituyentes antimicrobianos del producto (Karabiyikli, Degirmenci y Karapinar, 2012).

También otros estudios previos demostraron que la mora negra tiene actividad antibacteriana contra bacterias como *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnes*. (Aulifa *et al.*, 2018).

CAPITULO IV – Conclusiones

Mediante el diseño experimental utilizado se determinó que las condiciones óptimas para la obtención del colorante natural a partir del *Morus nigra* son, una temperatura de 75 °C y una mínima concentración de etanol de 6,5 %, ya que son los dos factores de relevancia en el proceso de extracción, el factor tiempo no influye significativamente por lo tanto un tiempo de 30 minutos ya sería suficiente.

El concentrado de *Morus nigra* es una opción válida para su uso en alimentos como colorante natural con un rango bajo de acidez. Debido a las características fisicoquímicas del compuesto se debe tener minucioso cuidado con en el tratamiento de la materia prima.

También, los resultados muestran claramente el potencial de bioactividad que tiene el extracto vegetal evaluado con una concentración inhibitoria cercana a 1 g GAE/L contra *Escherichia coli* ATCC 25922, se pudo observar que a medida que aumentaba la concentración del colorante, disminuía el crecimiento de la bacteria a las 48 h y por lo tanto la gran importancia de las plantas como fuente de nuevos agentes antimicrobianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aceituno Melgar, V. M. (2010)** Propiedades de colorantes naturales secados con técnicas alternativas a nivel laboratorio como alternativa al FD&C Rojo N°40 en alimentos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1153_Q.pdf
- Aguilera Ortíz, M. et al. (2011)** «Propiedades funcionales de las antocianinas», 13(2), pp. 16-22. Disponible en: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/16-BIO-11-DPA-06.pdf>
- Aldana Mejía, J. A. (2010)** Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y subfracciones obtenidas a partir de hojas de *elaegia utilis* sobre *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*. Pontificia Universidad Javeriana. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis475.pdf>.
- Almeida Gudiño, J. F. (2012)** Extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (*Zea mays l.*) y determinación de su actividad antioxidante proyecto.
- Andrews, J. M. (2001)** «Determination of minimum inhibitory concentrations», The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, pp. 5-16. doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- Aramwit, P., Bang, N. y Srichana, T. (2010)** «The properties and stability of anthocyanins in mulberry fruits», Food Research International. Elsevier Ltd, 43(4), pp. 1093-1097. doi: 10.1016/j.foodres.2010.01.022.
- Arranz Martínez, S. (2010)** Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación. Universidad Complutense de Madrid. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/11255/1/T32158.pdf>.
- Aulifa, D. L. et al. (2018)** «Phytochemical Screening, Antibacterial Activity, and Mode of Action on *Morus nigra*», 10(1), pp. 167-171.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P. y Bohórquez, Y. (2013)** «Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) en seis estados de madurez.», Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 11(2), pp. 10-18. Disponible en: <http://revistabiotecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/biotecnologia/article/viewFile/306/260>.

- Badui Dergal, S. (2006)** Química de los alimentos, Ed. Pearson educación. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Butt, M. S. et al. (2008)** «*Morus alba L.* nature's functional tonic», 19. doi: 10.1016/j.tifs.2008.06.002.
- Cano Morales, T. M. (2008)** Evaluación de la capacidad tintórea de los tintes naturales obtenidos de los desechos agroindustriales del coco y del aguacate en el proceso de tinción de fibras naturales utilizadas en la elaboración de artesanías. Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/INF-2008-081.pdf>
- Cartaya, O. y Reynaldo, I. (2001)** «Flavonoides: Características químicas y aplicaciones», Cultivos Tropicales, 22(2), pp. 5-14. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1932/193215009001.pdf>
- Castañeda Ovando, A. et al. (2008)** «Estudio de efectos que afectan la estabilidad de antocianinas y piranoantocianinas en solución acuosa mediante herramientas estadísticas», pp. 177-182. Disponible en: https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_FisicAlim/Araceli_Ovan/8.pdf
- Castañeda Sánchez, A. y Guerrero Beltrán. J.A. (2015)** «Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas», pp. 25-33. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf>
- Castillo Membreño, S. A. y Ramírez González, I. E. (2006)** Ensayo preliminar para la obtención de colorantes naturales a partir de especies vegetales comestibles. Universidad de El Salvador.
- Čestić, S. et al. (2016)** «Phytochemical profile and biological potential of mulberry teas (*Morus nigra L.*)», Acta Agriculturae Serbica, 21(41), pp. 25-35.
- CLSI (2012)** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition, Clinical and Laboratory Standards Institute. doi: 10.4103/0976-237X.91790.
- CODEX STAN 192 (1995)** Norma general para los aditivos alimentarios. Disponible en: http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf

- Cofré Martínez, A. (2015)** Determinación de Polifenoles Totales, Actividad Antioxidante y Antocianinas de Jugo de Murtilla (*Ugni molinae Turcz*) Obtenido por Condensación de Vapor. Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2015/fac675d/doc/fac675d.pdf>
- Concepción García, L. (2006)** Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Universidad de la Rioja.
- COVENIN N°1151 (1977)** Norma Venezolana. Frutas y productos derivados. Determinación de la acidez. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1151-77.pdf>.
- COVENIN N°1769 (1981)** Norma Venezolana. Frutas. Toma de Muestras. Disponible en: <http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1769-81.pdf>
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002)** Aditivos alimentarios. A. Madrid Vicente. Disponible en: [https://books.google.com.py/books?id=d_8WL81-5ooC&dq=ADITIVOS+ALIMENTARIOS+\(EN+PAPEL\)++NURIA+CUBERO%3B+ALBERT+MONFERRER%3B+JORDI+VILLALTA+,+200&hl=es&sa=X&redir_esc=y](https://books.google.com.py/books?id=d_8WL81-5ooC&dq=ADITIVOS+ALIMENTARIOS+(EN+PAPEL)++NURIA+CUBERO%3B+ALBERT+MONFERRER%3B+JORDI+VILLALTA+,+200&hl=es&sa=X&redir_esc=y)
- Cubillo Arrieta, M. A. (2007)** Determinación de la actividad antimicrobiana de algunas especias naturales sobre microorganismos asociados a alimentos. Universidad de Costa Rica. Disponible en: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1050/1/28069.pdf>
- Enríquez, S. (2014)** «Extracción, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto de la mora (*Rubus urticaefolius* *poir* R.)», pp. 21-23.
- Ercisli, S. et al. (2010)** «Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes», 9862(1), pp. 102-106.
- Ercisli, S. y Orhan, E. (2007)** «Food Chemistry Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits», 103, pp. 1380-1384. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.10.054.

- Espinosa, J. M. (2014)** «La ciencia sensorial: su incidencia en la calidad del servicio de alimentos y bebidas y la satisfacción del cliente», pp. 1-2. Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/314294316/La-Ciencia-Sensorial>.
- Fan, G. et al. (2008)** «Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM)», *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), pp. 155-160. doi: 10.1016/j.lwt.2007.01.019.
- Fangio, M. F., Iurlina, M. O. y Fritz, R. (2007)** «Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*», *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2), pp. 120-123.
- Fazaeli, M., Hojjatpanah, G. y Emam-Djomeh, Z. (2013)** «Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate», *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), pp. 35-43. doi: 10.1007/s13197-011-0246-y.
- FDA (2016)** Color Additives. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Disponible en: <https://www.fda.gov/forindustry/coloradditives/>
- Fennema, O. (2010)** Química de los Alimentos.
- García Martínez, E., Fernández Segovia, I. y Fuentes López, A. (2015)** Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. Valencia - España.
- García Méndez, A. D. (2008)** «Evaluación de un Tratamiento postcosecha de la Tecnología IV Gama en Frutos de Moras (*Rubus glaucus* Benth)», *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 9(1), pp. 44-54. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/813/81311226007.pdf>
- García Nauto, N. (2014)** Evaluación de la estabilidad del colorante antociánico extraído a partir del fruto silvestre capachu (*Hesperomeles escalloniifolia Schltldl*) durante el almacenamieto de una bebida gasificada. Universidad Nacional José María Arguedas.
- Garzón, G. A. (2008)** «Anthocyanins as natural colorants and bioactive compounds: A review. *Acta Biológica Colombiana*», 13(3), pp. 27-36.

- Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2003)** «Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems», *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), pp. 217-225. doi: 10.1016/S1369-703X(02)00221-8.
- Gorriti, A. et al. (2009)** «Extracción de antocianinas de las corontas de las corontas de *Zea mays* L. “Maíz morado”», *Ciencia e Investigación*, 12(2), pp. 64-74.
- Guerrero Escobar, D. P. (2011)** Extracción y Evaluación de un colorante natural a partir de pepa de aguacate para el teñido de las fibras de algodón y poliéster. Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/1757/1/SBQ_2_Ref.3396
- Hassimotto, N. M. a., Genovese, M. I. y Lajolo, F. M. (2007)** «Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra* L.) Growing in Brazil», *Food Science and Technology International*, 13, pp. 17-25. doi: 10.1177/1082013207075602.
- Huang, H.-P., Ou, T.-T. y Wang, C.-J. (2013)** «Mulberry (桑葚子 Sang Shèn Zi) and its Bioactive Compounds, the Chemoprevention Effects and Molecular Mechanisms In Vitro and In Vivo», *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Elsevier Masson SAS, 3(1), pp. 7-15. doi: 10.4103/2225-4110.106535.
- Imran, M. et al. (2010)** «Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species», 11(12), pp. 973-980. doi: 10.1631/jzus.B1000173.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2000)** Microorganismos de los alimentos, Volumen 1. Editorial Acribia. Disponible en: <https://books.google.com.py/books?id=ZnEOAAAACAAJ&dq=Microorganismos+de+los+Alimentos+ICMSF&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwin1eHx6rzZAhUDQ5AKHcZmDCkQ6AEIJjAA>
- Jeton Baculima, J. M. (2014)** Desarrollo de bebidas con potencial antioxidante y antirradicalario a partir de frutos ecuatorianos. Universidad del Azuay. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4220/1/10782.pdf>
- Karaaslan, M. et al. (2016)** «Synthesis and accumulation of anthocyanins in sour cherries during ripening in accordance with antioxidant capacity development and chalcone synthase expression», *European Food Research and Technology*. Springer Berlin Heidelberg, 242(2), pp. 189-198. doi: 10.1007/s00217-015-2530-y.

- Karabiyikli, S., Degirmenci, H. y Karapinar, M. (2012)** «The survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in black mulberry (*Morus nigra*) juice», *African Journal of Microbiology Research*, 6(48), pp. 7464-7470. doi: 10.5897/AJMR12.1869.
- Karabiyikli, S., Degirmenci, Hü. y Karapinar, M. (2016)** «Inactivation of *Listeria monocytogenes* in black mulberry (*Morus nigra*) juice», *Journal of Food Processing and Preservation*, 00, pp. 1-8. doi: 10.1111/jfpp.12840.
- Khalid, N., Fawad, S. A. y Ahmed, I. (2011)** «Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice», *Pakistan Journal of Botany*, 43, pp. 91-96.
- Kostić, D. A. et al. (2013)** «A survey on macro and microelements, phenolic compounds, biological activity and use of *Morus spp.* (Moraceae)», *EDP Sciences*, 68(4), pp. 333-347. doi: 10.1051/fruits/2013079.
- López Valdez, G. A. (2012)** Extracción y Caracterización del Colorante del Fruto Almendra de la India (*Terminalia catappa*). Universidad Autónoma Agraria. Disponible en: <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/492/62120s.pdf?sequence=1>
- Mahmood, T. et al. (2012)** «Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry Cultivars and Mulberry Species from Pakistan», *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), pp. 4591-4607. doi: 10.3390/ijms13044591.
- Mallhi, T. H. et al. (2014)** «Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice», *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9(1), pp. 60-66. doi: 10.3329/bjp.v9i1.17337.
- Markakis, P. (1982)** «Anthocyanins as Food Additives», en *Anthocyanins As Food Colors*. Elsevier Science, pp. 245-253. doi: 10.1016/B978-0-12-472550-8.50013-5.
- Martínez Flores, S. et al. (2002)** «Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes», pp. 271-278. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Javier_Gonzalez-Gallego/publication/10961859_Flavonoids_Properties_and_antioxidizing_action/links/0deec52a6b0057f327000000/Flavonoids-Properties-and-antioxidizing-action.pdf

- Mazimba, O., Majinda, R. R. T. y Motlhanka, D. (2011)** «Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*», 5(June), pp. 751-754. doi: 10.5897/AJPP11.260.
- Orellana Barahona, L. M. (2015)** Extracción y caracterización de los pigmentos naturales presentes en *Beta vulgaris* (Remolacha) para la propouesta de una formulación cosmética y evaluación de su estabilidad fisicoquímica y microbiológica. Universidad de San Carlos de Guatemala. Disponible en: http://www.repositorio.usac.edu.gt/889/1/06_3717.pdf
- Ortuño, A. M., Díaz Expósito, L. y Del Río Conesa, J. An. (2015)** «Evolución de la Fisiología Vegetal en los últimos 100 años», Revista Eubacteria, 34, pp. 74-82. Disponible en: https://digitum.um.es/xmlui/bitstream/10201/48183/1/Fisiologia_vegetal_Eubacteria34.pdf
- Özgen, M., Serçe, S. y Kaya, C. (2009)** «Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits», Scientia Horticulturae, 119(3), pp. 275-279. doi: 10.1016/j.scienta.2008.08.007.
- Park, K. . et al. (2003)** «Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens», Journal of Ethnopharmacology, 84(2-3), pp. 181-185. doi: 10.1016/S0378-8741(02)00318-5.
- Parra Ortega, V. P. (2004)** Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico. Universidad Austral de Chile. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fap259e/pdf/fap259e-TH.5.pdf>
- Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A. y García-Viguera, C. (2010)** «Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence», International Journal of Molecular Sciences, 11, pp. 167-170. doi: 10.3390/ijms11041679.
- Pérez, A. et al. (2011)** «Evaluacion de métodos para medir la actividad inhibitoria de extractos vegetales nativos del departamento de sucre sobre bacterias y levadura patógenas», Revista Colombiana De Ciencias Animales, 3(1), pp. 90-101.
- Ponce, A. G. et al. (2003)** «Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard», 36, pp. 679-684. doi: 10.1016/S0023-6438(03)00088-4.

- R L Jackman y Smith, J. L. (1996)** «Anthocyanins and betalains. In: Natural food colourants».
- Ramírez Gonzalez, M. B., Neira Gonzalez, A. y Correa, L. J. (2007)** «Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la región de Bocayá», *Scientia Et Technica*, XIII (33), pp. 415-417. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/849/84933117.pdf>
- Redd, J. B., Hendrix, D. L. y Hendrix, C. M. (1992)** Quality control manual for citrus processing plants. AgScience. Disponible en: https://books.google.com.py/books/about/Quality_Control_Manual_for_Citrus_Processing_Plants.html?id=8sFGAAAAYAAJ&redir_esc=y
- Reglamento Técnico Centroamericano (2005)** Alimentos y Bebidas procesados. Néctares de frutas. Especificaciones. RTC 67.04.48:08.
- Rein, M. J. (2005)** Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki. Disponible en: <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/maa/skemi/vk/rein/copigmen.pdf>
- Restrepo Gallego, M. (2007)** «Sustitución de colorantes en alimentos», *Lasallista de investigación*, 4(1), pp. 35-39.
- Rodríguez, L., Lopez, L. y García, M. (2010)** «Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, Mora (*Rubus glaucus* B.), Maracuyá (*Passiflora edulis* S.), Guayaba (*Psidium guajava* L.) Y Papayuela (*Carica cundinam*)», *Revista De Alimentos*, 19, p. 21. doi: ISSN 2027-291X.
- Rodríguez, M. D. et al. (2017)** «Obtención de azúcares fermentables a partir de aserrín de pino pretratado secuencialmente con ácido-base», *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33(2), pp. 317-324. doi: 10.20937/RICA.2017.33.02.12.
- Salaheen, S. et al. (2014)** «Cheap extraction of antibacterial compounds of berry pomace and their mode of action against the pathogen *Campylobacter jejuni*», *Food Control*. Elsevier Ltd, 46, pp. 174-181. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.026.
- Santacruz Cifuentes, L. A. (2011)** Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos. Universidad Nacional de Colombia. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/5351/1/197518.2011.pdf>

- Soto Huamaní, H. M. P. (2014)** “Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del *Zea Mays L.* (maíz morado), *Rubus glaucus* (mora andina); *Opuntia soherensii* (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Tabar, A. I. et al. (2003)** «Asma y alergia por el colorante carmín», An. sis. sanit. Navar, 26(2). Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v26s2/original8.pdf>
- Ullauri, P. G. (2010)** Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido - Google Libros. 2010.^a ed. Editado por Revista ReCiTeIA. Quito. Disponible en: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=B5Ksb5i1nl4C&oi=fnd&pg=PA4&dq=Ullauri,+P.,+2010,+“Transporte+de+masa+en+extracción+fase+sólido-líquido”+Editorial+Reciteia,+Cali,+Colombia&ots=VElrsEjllV&sig=6o9UUNmrW8E15HiEua7ZuSQ>
- Vicente Castillo, A. (2013)** Análisis de polifenoles en smoothies, zumos y néctares de frutas rojas. Universidad Politécnica de Cartagena. Disponible en: <http://repositorio.bib.upct.es:8080/dspace/handle/10317/3577>.
- Yigit, D. y Yigit, N. (2009)** «Antibacterial activity of black mulberry (*Morus nigra*) fruits and leaves», Erzincan University Journal of Science and Technology.
- 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 Valencia. Disponible en: [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión 3 Tesis Luz Marina Zapata.pdf \(1\).PDF?sequence=21](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión%203%20Tesis%20Luz%20Marina%20Zapata.pdf(1).PDF?sequence=21).
- Zapata, L. M. et al. (2014)** «Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos», Ciencia, Docencia y Tecnología, 25, pp. 166-192. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/cdyt/n49/n49a08.pdf>.