

Reemplazo del colorante rojo 40 por antocianinas en mermeladas; influencia en el color y las propiedades reológicas.

Replacement of the red dye 40 with anthocyanins in jams; influence on color and
rheological properties.

Almachi Villalba D.^{*1}; Suárez Heredia M.²; Bonilla Valladares P.³; Díaz Basantes M.⁴

^{1,2,3}Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Carrera de Química
email:dpalmachi@uce.edu.ec*
email:masuarez@uce.edu.ec
email:pmbonilla@uce.edu.ec

⁵Universidad Central del Ecuador. Facultad de Ciencias Químicas. Carrera Química de Alimentos
email:mfdiaz@uce.edu.ec

Artículo original

Recibido: septiembre 2020

Publicado: abril 2021

DOI: <https://doi.org/10.29166/quimica.v7i1.2592>

Resumen: Se determinó el efecto sobre el color y las propiedades reológicas al reemplazar el colorante sintético rojo 40 por colorantes antocianínicos y copigmentos en una formulación de mermelada. Se preparó una base de mermelada con una metodología y fórmula unitaria estandarizadas. Se añadió los colorantes variando su concentración entre 200 y 800 ppm; es decir; los factores de estudio fueron el tipo de colorante y su concentración y las variables respuesta fueron el color y el área de histéresis. Se determinó que el tipo de colorante utilizado no presentó significancia estadística sobre el color, debido a que la interacción del copigmento en una matriz con 46,75% de agua desfavorece el equilibrio de las fuerzas de interacción entre la antocianina y el ácido rosmarínico, que forman el copigmento. El efecto de interacción generado por la concentración y tipo de colorante tiene significancia estadística en el área de histéresis. Por lo tanto, la reología permitió determinar que la adición de los colorantes aumenta el área de histéresis; es decir, favorece la destrucción del sistema al ser sometido a esfuerzos. Sin embargo, los colorantes podrían ser aplicados a nivel industrial, ya que no se observaron lazos de histéresis que significarían la destrucción irreversible del producto

Palabras clave: área de histéresis, propiedades reológicas, colorante rojo 40, colorante antocianínico, copigmento

Abstract: The effect on color and rheological properties was determined by replacing red 40 synthetic dye with anthocyanin dye and copigments in a jam formulation. A jam base was prepared with a standardized methodology and unitary formula. The dyes were added varying their

concentration between 200 and 800 ppm; that is, the study factors were the type of dye and its concentration and the response variables the color and the area of hysteresis. It was established that the type of dye used did not have statistical significance on color, because the interaction of the copigment in a matrix with 46.75% of water discourages the equilibrium of the interaction forces between the anthocyanin and the rosmarinic acid that form the copigment. Otherwise, the interaction effect generated by the concentration and type of dye has statistical significance in the hysteresis area. Thus, The Rheology allowed to determine that the addition of dyes increases the hysteresis area; in the other words, it favors the destruction of the system when subjected to efforts. However, it could have industrial applicability, since were not observed hysteresis ties, that would mean the irreversible destruction of the product.

Key Words: zone of hysteresis, rheological properties, dye red 40, anthocyanin dye, copigments

1. Introducción

El color de los alimentos es uno de los parámetros más importantes para los consumidores al momento de elegir un producto; los seres humanos tienen la tendencia a elegir alimentos con colores vivos ya que lo relacionan con frescura y beneficios para su salud.¹

La industria alimentaria utiliza colorantes, que en su mayoría son de origen sintético, debido a su alto poder de tinción. El uso de colorantes sintéticos genera daños a la salud, como lo demuestra el estudio desarrollado en la ciudad de Southampton. La investigación se enfocó en niños entre los 3 y 9 años, definió el efecto del consumo de ciertas mezclas de benzoato de sodio con colorantes; entre ellos el rojo 40, representado en la figura 1. El estudio concluyó que las mezclas podrían exacerbar la hiperactividad en los niños hasta la niñez media; motivando a organismos reguladores de Europa la prohibición de su consumo o que en la etiqueta se incluya la leyenda “podría tener un efecto en la actividad y atención de los niños”.²

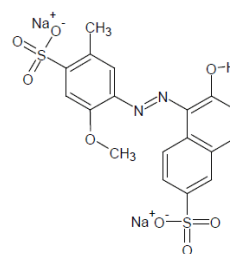


Figura 1 Estructura química de colorante sintético rojo 40.

Se ha demostrado que la microbiota intestinal metaboliza el 70% de los colorantes azo como el rojo 40; a través, de enzimas azoreductasas; en donde, los principales productos del metabolismo son compuestos químicos análogos al 1-naftol y aminas aromáticas tóxicas o mutagénicas.³ Por tanto, la industria alimenticia debe buscar nuevas alternativas; en donde, el uso de colorantes naturales debe cobrar relevancia, considerando los beneficios adicionales que éstos pueden aportar. Por ejemplo, la administración de una mezcla de bayas maduras de las variedades ‘Tifblue’ (*Vaccinium virgatum asheii* Aiton) y ‘Rubel’ (*Vaccinium corymbosum* L.) a adultos mayores con deterioro cognitivo leve; durante 16 semanas, mejora la memoria visual espacial.⁴ Además, existen estudios que demuestran que las

antocianinas representadas en la figura 2; tienen actividad anticancerígena positiva al atacar la inflamación, el estrés oxidativo y las vías de señalización apoptótica.⁵

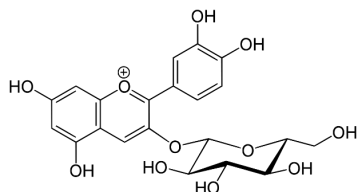


Figura 2 Estructura química de cianidina-3-O-glucósido.

Por lo tanto, la adición de antocianinas permite el desarrollo de alimentos funcionales; además, aumentan la vida útil y aceptabilidad de alimentos como; yogurt⁶, jarabes⁶ y caramelos duros,⁶ totillas de maíz.⁷ También se ha añadido antocianinas estabilizadas por copigmentación; a matrices alimenticias como; por ejemplo, néctares de fresa.⁸

Por otra parte, el tratamiento térmico empleado durante la elaboración de mermeladas provoca la pérdida de sustancias bioactivas, provocando cambios en su coloración; por ejemplo, la elaboración de mermeladas de fresa a 85°C disminuyó en 20,57% las antocianinas monoméricas totales en comparación con la fruta; además, el producto es más oscuro ya que disminuyó en 25.49% el parámetro L* con respecto a la fruta.⁹ Por lo tanto, la adición de antocianinas permite recuperar el color y las sustancias bioactivas perdidas en la manufactura de mermeladas.

El análisis sensorial es el método óptimo para determinar la calidad de los alimentos; sin embargo, se requiere mucho tiempo y dinero para formar y capacitar jueces expertos que solamente

son capaces de analizar de 6 a 8 muestras diarias debido a la fatiga del panelista.¹⁰ Por el contrario, la reología permite determinar cómo los alimentos fluyen o se deforman en función de parámetros medibles como viscosidad instantánea inicial, área de histéresis, módulo elástico, módulo viscoso, tixotropía y reopexia.¹¹

2. Parte experimental

2.1. Materiales y reactivos

Las materias primas para la formulación de la mermelada fueron grado alimenticio (USP): Pectina (Ceanpectin®), ácido cítrico anhidro, sorbato de potasio, benzoato de sodio, fructosa, rojo 40. Etanol al 96% grado técnico y hexano grado analítico. El estándar ácido rosmarínico al 96% (Sigma-Aldrich).

Con respecto a los equipos se utilizó una balanza analítica y de precisión con marcas Denver y Ohaus respectivamente. El Rotavapor marca J.P. Selecta, una tamizadora marca Gilson, fluidos supercríticos marca SCF GREEN TECHNOLOGY y estufas de convección forzada y natural marca Brinder; permitieron estandarizar la muestra de mortiño *Vaccinium floribundum* Kunt y extracción del colorante antocianínico. Los equipos que permitieron determinar las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de mermelada fueron: un potenciómetro marca Horiba, reómetro marca Malvern Instru, Calorímetro diferencial de barrido marca TA, espectrofotómetro marca Cary 50 y finalmente los refractómetros de 0-32° Brix y 50-80° Brix, marca BOECO.

2.2. Métodos

2.2.1 Estandarización de la muestra de mortiño.

Para la estandarización de la muestra de mortiño *Vaccinium floribundum* Kunt, que consiste en la selección, lavado, desinfección, secado, molienda

y desengrasado; se utilizó la metodología planteada en la investigación de Suárez & Narváez (2016)¹²; se hizo una modificación en cuanto al desengrasado que se realizó con CO₂ supercrítico en el equipo SCF GREEN TECHNOLOGY Speed SFE con los parámetros que se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones para el desengrasado con CO₂ supercrítico

Parámetro	Control de análisis
Fluido supercrítico CO ₂	350,6 bar y 40°C
Velocidad de entrada CO ₂	5L/min
Tanque de almacenamiento de la materia prima	42 °C
Vial de recepción del material apolar	89°C

2.2.2 Extracción de antocianinas.

La muestra de mortiño *Vaccinium floribundum* Kunt estandarizada; se sometió a percolación con etanol al 96% a 23 gotas por minuto. Concluida la percolación; al extracto etanólico de antocianinas se le realizó 3 extracciones líquido-líquido con 50 mL de hexano. Se concentraron los extractos en rotavapor J.P. Selecta RS 3000V; los residuos se secaron a 40°C ± 1°C en la estufa con aire circulante BINDER BF53 y se controló hasta peso constante en balanza analítica Denver Pt 214. Con este extracto se prepararon disoluciones de concentración de 10g/L y 5g/L de antocianinas.

2.2.3 Preparación de copigmentos.

Se prepararon en etanol al 96%. 5 mL de soluciones de 10g de antocianinas/L y 960 mg de ácido rosmarínico/L. Se mezclaron y la solución resultante se secó en una caja Petri prepesada hasta la evaporación total del etanol en una estufa con

aire circulante BINDER BF53 a 40°C ± 1°C. La evaporación total del etanol fue verificada por el peso constante.

2.2.4 Caracterización espectrofotométrica del extracto total de antocianinas y copigmentos

Se realizó un barrido en un rango entre 400-700nm de las soluciones etanólicas de 5g/L de antocianinas y copigmentos. Posteriormente se calculó el desplazamiento batocrómico e hiperocrómico.

2.2.5 Caracterización térmica del extracto total de antocianinas y copigmentos.

Se utilizó el calorímetro diferencial de barrido TA Instruments Q2000 para obtener termogramas de extractos secos de antocianinas y copigmentos. Se utilizaron cápsulas de aluminio Standar Pan TA T1G1122 y T1G1122. Se pesó en balanza Meter Toledo GWP® B451386191 de apreciación 0,001mg la cápsula de referencia; la cápsula vacía

y aproximadamente 0,8mg de la sustancia a analizar. El análisis se realizó en un intervalo de temperatura de 15 - 200°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min.

2.2.6 *Formulación de la mermelada y base de mermelada.*

Las fresas comerciales se lavaron con abundante agua potable, se cortaron los pedúnculos de las fresas y se licuaron para obtener la pulpa.

Se pesó en balanza analítica Denver Pt 214 los reactivos de la fórmula unitaria que se especifica en la tabla 2. Se trituroó en un mortero el sorbato de sodio y el benzoato de sodio (mezcla 1) y se molió en mortero el ácido cítrico.

Tabla 2. Fórmula unitaria de la mermelada.

INGREDIENTE	PORCENTAJE
Fructosa	28,0
Pulpa	70.9
Estabilizante para preparaciones de fruta	0,1
Ceanpectin ®	0,5
Sorbato de potasio	0,04
Benzoato de sodio	0,04
Ácido cítrico	0,42
TOTAL	100

En la figura 3 se observa el montaje del sistema para la preparación de la mermelada. Se colocó el agua, fructosa y la mezcla 1 en un vaso de precipitación de 250 mL. El sistema se sometió por 5 minutos a 300 rpm de agitación y la plancha de calentamiento a 50 °C. Manteniendo las mismas condiciones se añadió el ácido cítrico previamente molido. Se añadieron los gelificantes -Estabilizante para preparaciones de fruta- y - Ceanpectin® -se subió la agitación a 500 rpm durante 1 minuto y se sometió al sistema por 27 minutos a 300 rpm de velocidad de agitación con la plancha de calentamiento a 300°C.



Figura 3. Montaje del sistema para la preparación de mermelada

Se pesó la mermelada en una balanza de precisión Ohaus PA 1502 y se determinó el rendimiento del proceso; considerando la fórmula unitaria como el 100%. Al producto final también se midió el pH en el potenciómetro Horiba F12, los grados Brix (°Bx) en el refractómetro de 50-80 °Bx BOECO 224159CB y finalmente se determinó la humedad.

Para la preparación de la base de la mermelada, se consideró que la fresa posee 90% de agua¹³. Por lo tanto, se sustituyó la pulpa por 63,81% de agua tipo III; utilizando la metodología de la preparación de la mermelada mostrada en la tabla 2.

2.2.7 Adición de colorantes.

A la mermelada y la base de mermelada se añadieron los diferentes colorantes que se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Formulaciones con los respectivos colorantes

Codificación	Descripción
200BA	Base de mermelada con 200 ppm de extracto total de antocianinas
200BAC	Base de mermelada con 200 ppm de copigmento
200BR40	Base de mermelada con 200 ppm de colorante sintético rojo 40
800BA	Base de mermelada con 800 ppm de extracto total de antocianinas
800BAC	Base de mermelada con 800 ppm de copigmento
200MA	Mermelada de fresa con 200 ppm de extracto total de antocianinas
200MAC	Mermelada de fresa con 200 ppm de copigmento
200MR40	Mermelada de fresa con 200 ppm de colorante sintético rojo 40
800MA	Mermelada de fresa con 800 ppm de extracto total de antocianinas
800MAC	Mermelada de fresa con 800 ppm de copigmento
800MR40	Mermelada de fresa con 800 ppm de colorante sintético rojo 40

2.2.8 Estudio espectrofotométrico

Se pesó en balanza analítica Denver Pt 214 0,1g de 200MA y se maceró en metanol por 1 hora. El macerado se filtró en membrana con tamaño de poro de 0,22 μ m. Al filtrado se añadió 1,5mL de estándar de antocianinas a 25 mg/mL, se aforó a 10mL y se realizó un barrido en el rango del visible

(400-700nm) en el espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 ELOG103519.

El mismo procedimiento se desarrolló para 800MA, 200MAC, 800MAC, con la adición de su respectivo estándar.

2.2.9 Evaluación de propiedades reológicas.

A la base de mermelada, y a las formulaciones 200BA, 200BAC, 800BA, 800BAC detalladas en la tabla 5, se les realizaron tres diferentes análisis

en el reómetro Bohlin 2004305 a un GAP de 2000 micra.

2.2.9.1 Barrido de amplitud.

Los parámetros de análisis se detallan en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros para el barrido de amplitud

Parámetro	Condición de análisis
Frecuencia (Hz)	0,1
Mínimo estrés aplicado (Pa)	0,2387
Máximo estrés aplicado (Pa)	50
Aplicación de esfuerzos	Logarítmico
Sentido	Ida y vuelta
Tiempo de espera para el descenso de esfuerzos (s)	2
Tiempo de integración (s)	10
Periodos	1
Número de puntos	20
Tiempo por punto (s)	12

Se graficó la curva G'' y G' en función de los esfuerzos.

2.2.9.2 Barridos de frecuencia simple oscilatoria.

Los parámetros de análisis que se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Parámetros para el barrido de frecuencia simple oscilatoria

Parámetro	Condición de análisis
Esfuerzo (Pa)	10
Mínima frecuencia (Hz)	0,1
Máxima frecuencia (Hz)	10
Aplicación frecuencias	Logarítmico
Sentido	Ida y vuelta
Tiempo de espera para el descenso de frecuencias (s)	2
Periodos	1
Número de puntos	100

Se graficó la curva G'' y G' en función de la frecuencia.

2.2.9.3 Viscosidad.

Los parámetros de análisis que se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros para la viscosidad

Parámetro	Condición de análisis
Mínimo estrés aplicado (Pa)	0,2387
Máximo estrés aplicado (Pa)	10
Aplicación de esfuerzos	Lineal con análisis de Tixotropía
Sentido	Ida y vuelta
Tiempo de análisis (s)	10
Periodos	1
Número de puntos	50
Velocidad máxima (rad/s)	10

Se graficó la curva de viscosidad instantánea (Π_i) en función de la velocidad de deformación (s^{-1}). Además, de la curva de flujo que es: Esfuerzo (Pa) en función de la velocidad de deformación (s^{-1}).

2.3. Diseño experimental

La tabla 7 detalla y codifica a los factores de estudio: Tipo de colorante (T_C) con dos niveles

(+1,-1) y la concentración de colorante (C_C) con dos niveles (+1,-1); por lo tanto, se obtiene un diseño factorial completo 2^2 a un intervalo del 95% de confianza y las variables respuesta fueron el área de histéresis (AH) y el color medio espectrofotométricamente

Tabla 7. Diseño experimental

Factor	Codificación	
	-	+
Tipo de colorante (T_C)	Extracto total de antocianinas	Copigmentos
Concentración (C)	200 ppm	800 ppm

2.4. Análisis estadístico

Para el diseño factorial completo se aleatorizaron las dos corridas experimentales en el programa

estadístico JMP©. Con los resultados de la primera réplica del diseño mediante Algoritmo de Yates se calculó para cada variable respuesta la magnitud y

signo de los efectos primarios y del efecto de interacción.

Para la determinación de la significancia estadística de los efectos se registraron los resultados de las dos réplicas de diseño. Para cada tratamiento se obtuvo la diferencia (d) y se calculó la variancia estimada de acuerdo con la ecuación 1.

$$S_i^2 = \frac{d^2}{2} \quad (1)$$

Cálculo de la variancia estimada para cada tratamiento.¹⁴

La raíz cuadrada de la variancia estimada para cada tratamiento corresponde a la desviación estándar de la respuesta S_{resp} que permitió calcular la desviación estándar de los efectos de acuerdo con la ecuación 2.

$$S_{efecto} = \frac{2S_{resp}}{\sqrt{\text{número de corridas efectivas}}} \quad (2)$$

Cálculo de S_{efecto} ¹⁴

Se consideró si el efecto es estadísticamente significativo; mediante el criterio que se muestra en la ecuación 3 en donde K proviene de la distribución t de Student a un intervalo del 95% de confianza. Procedimiento que permitió sugerir el uso de colorantes naturales en alimentos procesados.

$$|\text{efecto}| > k S_{efecto} \quad (3)$$

Criterio para la significancia estadística del efecto.¹⁴

3. Resultados y discusión

3.1. Extracción de la fase apolar

Las condiciones de extracción de la fase apolar con CO₂ supercrítico de una muestra estandarizada de

mortiño *Vaccinium floribundum* Kunt permitieron extraer 1,01% de la fase apolar; que representa el 93,52%, este cálculo se realizó en base al $1,00 \pm 0,8\%$ de fase apolar reportado en la investigación desarrollada por Suárez & Narváez (2016).¹² Es decir, no se pudo extraer la totalidad de la fase apolar; esto podría deberse a que el tanque de almacenamiento de la materia prima se mantuvo a 40 °C para conservar los compuestos sensibles al calor; debido a que, en la investigación realizada por Carlotta Campalani, se determinó que el desengrasado óptimo del orujo de frutas con CO₂ supercrítico es a una presión de 300 bar; un flujo de entrada del CO₂ de 5mL/min y una temperatura de almacenamiento de la materia prima de 70°C; pero, al disminuir la temperatura a 40°C, disminuye la eficiencia de extracción en un 35%¹⁵. Por lo tanto, se debe optimizar las condiciones para que mediante el uso de fluidos supercríticos se pueda extraer la totalidad de la fase apolar.

3.2. Extracción de antocianinas

Se determinó espectrofotométricamente que el extracto etanólico tiene un máximo de absorción de 538 nm que corresponde a la longitud de onda de absorción de las antocianinas.

Por otra parte; en la investigación de Catalina Vasco y colaboradores; se determinó por HPLC que el extracto de mortiño ecuatoriano *Vaccinium floribundum* Kunt contiene 345 mg cianidina-3-O-glucósido/100 g de muestra seca; además, proantocianidinas como (+) catequina y (-) epicatequina en una concentración de 10 ± 0.3 y 8 ± 4.1 mg/100 g de muestra seca respectivamente¹⁶.

3.3. Caracterización espectrofotométrica y calorimétrica del extracto total de antocianinas y copigmentos

El análisis espectrofotométrico de las soluciones etanólicas de 5mg/mL de extracto total de antocianinas y copigmentos representados en la tabla 8, indican que existe un porcentaje de desplazamiento batocrómico del 0,17% y un porcentaje de desplazamiento hipercrómico de 2,25%; es decir un aumento en la coloración

Adicionalmente, por calorimetría diferencial de barrido se demostró un desplazamiento de la

temperatura inicial de degradación de 26,68°C de los copigmentos con respecto a las antocianinas; este cambio importante podría deberse a las interacciones π - π intermoleculares entre las antocianinas y el copigmento (ácido rosmarínico)¹⁷. Este resultado podría estar relacionado con la investigación de Nattapong Kanha y colaboradores; que compararon la cinética de degradación térmica de las antocianinas y sus respectivos copigmentos; se determinó que la copigmentación tiene un efecto positivo con respecto a las antocianinas; ya que, sube el tiempo de vida media¹⁸

Tabla 8. Caracterización espectrofotométrica y calorimétrica del extracto total de antocianinas y copigmentos

Tipo de colorante	Espectrofotometría		Calorimetría diferencial de barrido
	Máximo de absorción (nm)	Absorbancia	Temperatura inicial de degradación (°C)
Extracto total de antocianinas	538	0,710	84,04
Copigmentos	538,9	0,726	110,72

3.4. Elaboración de la mermelada y base de mermelada

Es importante el orden de adición de las materias primas en el proceso de preparación de la mermelada y base de mermelada. La adición del ácido cítrico se hizo vez solubilizados el benzoato de sodio y el sorbato de potasio para asegurar la formación los ácidos sórbico y benzoico que tienen actividad antimicrobiana.¹⁹

La adición de los gelificantes –Ceanpectin®- y –Estabilizante para preparaciones de fruta- debe hacerse una vez desarrollado el procedimiento anterior para evitar que en el sistema exista una

competencia entre la precipitación y la gelificación.¹⁹

Otros aspectos considerados fueron el tiempo del tratamiento térmico y la velocidad de agitación. Un exceso del tratamiento térmico provocaría un daño irreversible al producto por la caramelización del azúcar. Por lo tanto, se incrementó la velocidad de agitación de 300 rpm a 500 rpm durante 1 minuto en la adición del -Ceampectin®- y el -Estabilizante para preparaciones de fruta- para evitar la formación de grumos en la solución y en la hélice del agitador.

La estandarización del procedimiento en la preparación de mermeladas es importante porque permite la reproducibilidad de los resultados de la investigación; además, en la industria permite la correcta determinación de los costos de la carga fabril.

3.5. Caracterización de la mermelada y base de mermelada

Las características fisicoquímicas que posee la mermelada y la base de mermelada se representan en la tabla 9 y se puede observar que se encuentran en un pH óptimo de acuerdo con el (CODEX STAN 296-2009, MOD) para las confituras, jaleas y mermeladas. Las mermeladas se encuentran en un pH bajo debido a que el ácido evita la formación de ácidos pectínicos, con lo cual disminuyen las partículas cargadas y aumenta la tendencia de las moléculas a asociarse.²⁰

Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas de la mermelada y base de mermelada.

Parámetro	Base de mermelada	Mermelada
pH	3,219	3,322
° Brix	55	55
Humedad	46,75% ± 0,34%	48,22% ± 0,30%
Rendimiento	60,98% ± 2,22%	68,80% ± 3,19%

El rendimiento del proceso presentado en la tabla 9; corresponde a todas las etapas del proceso, excepto a la adición del colorante. Este valor permite calcular la cantidad de colorante adecuada para la formulación final y estimar los costos de producción a escala industrial.

Además, las formulaciones tradicionales son elaboradas con 50% de sacarosa y tienen 65°Brix; en cambio la mermelada desarrollada en esta investigación tiene como edulcorante fructosa en un 28% obteniéndose un producto con 10°Brix menos. Esta característica proporciona una ventaja comparativa a la formulación elaborada y aporta a disminuir el consumo de azúcares en un producto que mantiene sus características sensoriales.

La base de mermelada y la mermelada tienen 55°Brix, esto podría justificarse analizando que la

mermelada supera en un 7.82% el rendimiento del proceso con respecto a la base de mermelada, es decir, en la preparación de la base de mermelada, aumentó la evaporación del agua, provocando un aumento en la concentración de sólidos totales y un menor rendimiento; posiblemente este aumento de la evaporación del agua no ocurrió en la preparación de la mermelada, por los componentes de la fruta.

3.6. Estudio espectrofotométrico

Los copigmentos tienen un desplazamiento hipercrómico del 2,25% con respecto de las antocianinas; es decir, un aumento de coloración. Sin embargo, como se representa en la tabla 10, la adición de 800ppm de antocianinas a la mermelada aportan una absorbancia de 0.033; y los

copigmentos a la misma concentración; aportan una absorbancia de 0.034, es decir un desplazamiento hipercrómico del 3,03%. Por lo tanto, la adición de copigmentos a la mermelada aumenta el desplazamiento hipercrómico, esto podría estar relacionado con el pH 3.219 de la

mermelada; ya que, en la investigación de Nattapong Kanha se determinó que para los copigmentos de cianidina-3-O-glucósido con ácido ferúlico; el porcentaje de desplazamiento hipercrómico aumenta en 27,11%, al subir de un pH 3 a un pH 4¹⁸.

Tabla 10. Estudio espectrofotométrico de las formulaciones

Código	Absorbancia en pico a 538nm	Variación de absorbancia
MERMELADA CON ANTOCIANINAS		
Estándar	0,184	0,000
000MA	0,192	0,008
200MA	0,196	0,012
800MA	0,217	0,033
MERMELADAS CON COPIGMENTOS		
Estándar	0,217	0,000
000MAC	0,219	0,002
200MAC	0,231	0,014
800MAC	0,251	0,034

3.7. Estudio reológico

El estudio reológico se realizó con la base de mermelada sin la adición de colorantes. No se realizó el estudio reológico con la mermelada para evitar la introducción de variables que no se puedan controlar al añadir la fruta; ya que existen diferentes tipos de fresas. Estudios similares se desarrollan en la industria farmacéutica para evaluar la interacción de los excipientes con los principios activos de la formulación²¹

3.7.1 Barrido de amplitud

El barrido de amplitud de la base de mermelada representado en la figura 4 demuestra que en la base de mermelada no existe viscoelasticidad lineal porque no hay una tendencia constante del módulo

elástico y viscoso en función del esfuerzo.²² Por el contrario, se observa una caída drástica del módulo viscoso en el intervalo de 0 a 10 Pa, por lo tanto, este rango fue utilizado como intervalo de esfuerzos para los ensayos de viscosidad.

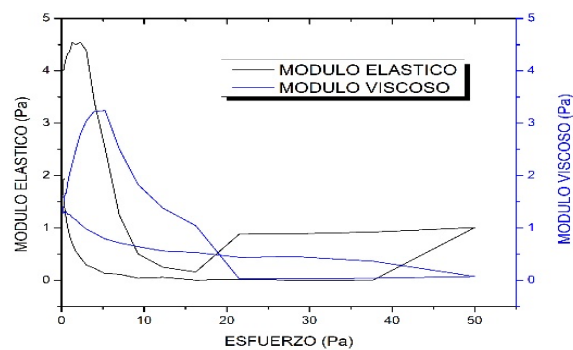


Figura 4. Barrido de amplitud de la base de mermelada

3.7.2 Barrido de frecuencia

En el barrido de frecuencias de la base de mermelada representado en la figura 5, se observa un aumento del módulo elástico a bajas frecuencias; es decir a largo plazo primará el módulo elástico sobre el viscoso en la base de mermelada.

Otro aspecto importante es que; la adición de los diferentes colorantes no modifica el barrido de amplitud y de frecuencias.

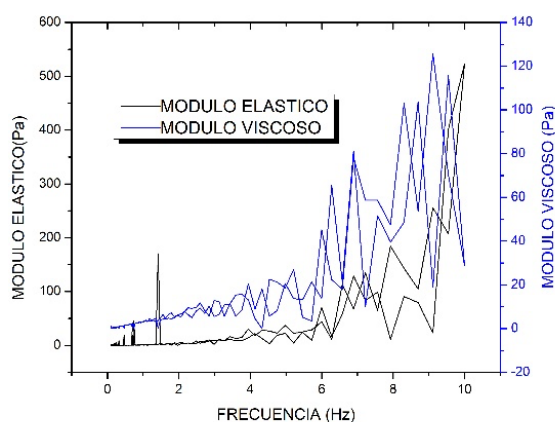


Figura 5. Barrido de frecuencias de la base de mermelada

3.7.3 Curvas de flujo

En las curvas de flujo de la base de mermelada con los diferentes colorantes a 200 ppm y 800 ppm representadas en la figura 6, se observa que la base de mermelada sin colorantes regresa al punto inicial del reograma; es decir, se reconstruye la estructura del sistema en la aplicación del descenso de los esfuerzos (10,094 s).

El fenómeno anterior puede deberse a que; la base de mermelada al ser sometida al ascenso de esfuerzos cortantes se va gradualmente rompiendo hasta que todas las partículas están dispersadas – sol–, dando una viscosidad mínima. En el descenso de los esfuerzos las partículas comienzan a formar racimos, flóculos delgados y nuevamente el gel.²³

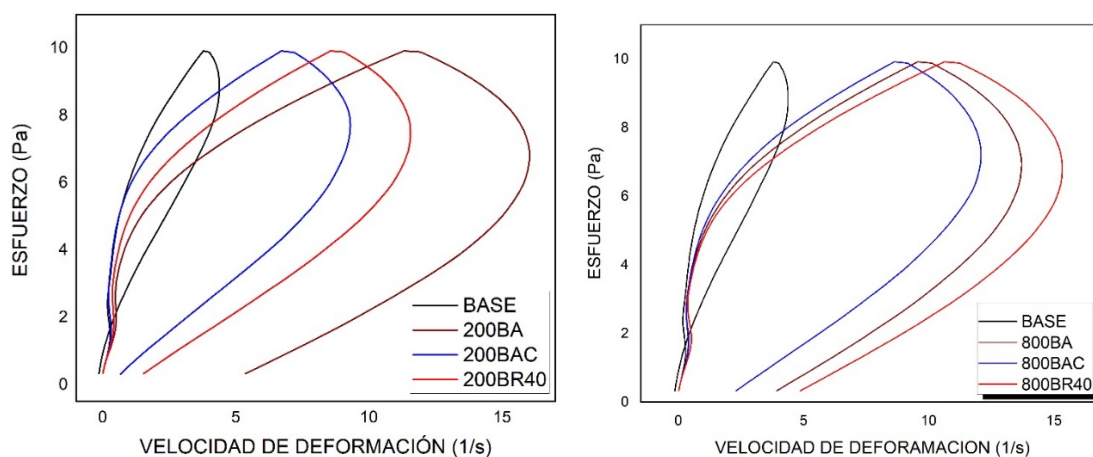


Figura 6. Curvas de flujo de la base de mermelada con los diferentes colorantes: a 200 ppm (izquierda), 800 ppm (derecha)

Por el contrario, las bases de mermelada con diferente concentración de colorantes no llegan al punto inicial del reograma; por lo tanto, necesitan más tiempo para reconstruir su estructura; sin embargo, no ocurrirán fenómenos de sedimentación y daños en el producto ya que en las curvas de flujo no se observan lazos de histéresis

que son indicativos de la destrucción irreversible.²³ El tiempo extra que necesitan las demás formulaciones para reconstruir su estructura en comparación con la base mermelada sin colorantes, se ve reflejado en las áreas de histéresis que se representan en la tabla 11, y son indicativos del grado de destrucción del sistema²³.

Tabla 11. Áreas de histéresis de las formulaciones

Tratamiento	Área de histéresis (Pa/s)
BASE	11,772
200BR40	59,986
200BA	94,504
200BAC	46,509
800BR40	91,315
800BA	80,342
800BAC	65,992

La formulación 200BA aumenta el área de histéresis en 82,732 Pa/s en comparación con la base de mermelada sin colorantes; esto podría deberse a que las antocianinas presentes en la base de mermelada provocan un cambio en la conformación de la pectina; es decir modifican su posición relativa y aumentan el grado de destrucción.²⁴ Por el contrario, la formulación 200BAC aumenta el área de histéresis en 34,737 Pa/s en comparación con la base de mermelada sin colorantes; es decir, las antocianinas favorecen el grado de destrucción con respecto a los copigmentos; esto podría deberse a que en los copigmentos las antocianinas forman enlaces de hidrógenos con el ácido rosmarínico; por lo tanto, ya no existe antocianina libre para provocar un cambio conformacional en la pectina.

Además, la formulación 800BR40 aumenta el área de histéresis en 79,543 Pa/s en comparación con la

base de mermelada; esto podría suceder debido a que, como afirma Fereyra Susana (2015);²⁰ la disminución de partículas cargadas en la mermelada aumenta la tendencia de las moléculas a asociarse. El rojo 40 representado en la figura 1; es una sal arildiazonio que aporta con cargas y disminuye la tendencia de las moléculas asociadas a formar el gel; por lo tanto; 800BR40 tiene un mayor grado de destrucción.

La formulación 800BAC aumenta el área de histéresis en 54,22 Pa/s en comparación con la base de mermelada sin colorantes; esto podría deberse a que el ácido rosmarínico presente en la base de mermelada, no ayuda a disminuir el grado de destrucción; de igual manera la formulación 200BAC aumenta el área de histéresis en 34,737 Pa/s en comparación con la base de mermelada.

Por lo tanto, la adición de antocianinas y copigmentos aumenta el área de histéresis; es decir

el grado de destrucción del sistema. Sin embargo, podrían ser aplicados a nivel industrial porque no se observan lazos de histéresis que son indicativos del grado de destrucción del sistema coloidal²³. De igual manera, en la investigación de Vernon-Carter; se determinó una disminución de la dureza de tortillas de maíz por la adición de antocianinas.⁷

3.7.4 Curvas de viscosidad

En la curva de viscosidad de la base de mermelada sin colorantes representada en la figura 8, se observa un descenso de la viscosidad instantánea

desde 24,13 Pas a 2,036 Pas cuando fluyen hasta una velocidad de desplazamiento de $4,377 \text{ s}^{-1}$, es decir corresponde a un fluido pseudoplástico. Esta propiedad es importante porque la mermelada podrá formar pequeñas películas al ser untada en el pan o en el producto que el consumidor desee.

Además, se observa un efecto reopéxico al aplicar el descenso de los esfuerzos que corresponde a un aumento de la viscosidad instantánea de 17,33 Pas a 306 Pas al descender los esfuerzos de 1,107 Pa a 0,9128 Pa respectivamente.

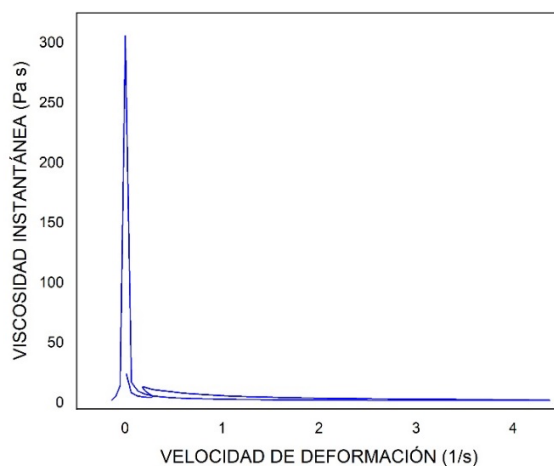


Figura 7. curva de viscosidad de la base de mermelada

Todos estos efectos, se comprenden mediante la teoría del entrecruzamiento de cadenas (Chain Entanglement), que explica el espesamiento de polímeros de alto peso molecular solubles en agua. Las cadenas son solvatadas por el agua formando enlaces de hidrógeno lo que les permite estirarse; el desorden así generado provoca un entrecruzamiento entre las cadenas atrapando componentes de la matriz.²⁵ En el caso de la base de mermelada este efecto podría deberse a que los gelificantes -Ceampectin®- y - Estabilizante para preparados de frutas- son polímeros de alto peso molecular y solubles en agua.

Por el contrario, como se observa en la figura 6, la adición de los colorantes en la base de mermelada a 200 ppm y 800 ppm baja el efecto reopéxico de la base de mermelada sin colorantes, esto podría justificarse asumiendo que la formación de enlaces de hidrógeno entre el agua y los polímeros disminuyen; debido a que los colorantes también forman enlaces de hidrógeno con los polímeros y/o las moléculas de agua. Por lo tanto, esta disminución representaría que las cadenas de polímero no se estiren y que no disminuya notablemente entrecruzamiento de estas.

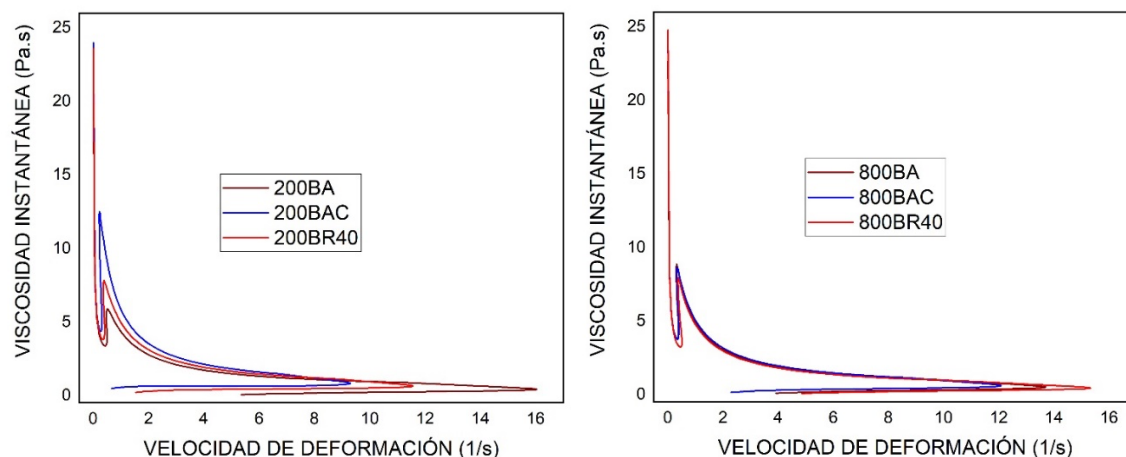


Figura 8. Curvas de viscosidad de la base de mermelada con los diferentes colorantes: a 200 ppm (izquierda), 800 ppm (derecha)

Las curvas de viscosidad permitieron determinar la viscosidad instantánea inicial; que es un parámetro indicativo de la presentación del producto.²⁵ El análisis de la tabla 12 muestra que en las bases de mermeladas con los tipos de colorantes a 200 ppm

y 800ppm, no hay variaciones en la viscosidad instantánea inicial. Por lo tanto, las mermeladas con los diferentes colorantes a dichas concentraciones almacenadas en los envases presentarán la misma viscosidad

Tabla 12. Parámetros reológicos de las formulaciones

Tratamiento	Velocidad de deslizamiento final (s ⁻¹)	Esfuerzo (Pa)	Viscosidad Instantánea Inicial (Pas)	Viscosidad Instantánea mínima (Pas)
200BR40	11,56	7,359	23,6	0,6365
200BA	16,04	6,744	22,22	0,4205
200BAC	9,3	7,734	23,98	0,8316
800BR40	15,33	6,939	24,78	0,4527
	15,33	6,744		0,4398
800BA	13,71	6,938	22,67	0,5062
800BAC	12,08	7,327	24,54	0,6067
	12,08	7,132		0,5902

Si la viscosidad instantánea de la mermelada es demasiado baja, se caerá de la rodaja de pan.²² Sin embargo; no se pudieron realizar comparaciones con datos teóricos ya que en la bibliografía consultada no existen valores de la viscosidad de mermeladas en la cual ocurra este fenómeno.

Tomando como referencia el análisis anterior y la tabla 12; se concluye que las mejores formulaciones son 200BAC y 800BAC ya que

tienen la mayor viscosidad instantánea mínima en comparación con las demás formulaciones.

3.8 Análisis estadístico del color

El diseño experimental para el color se desarrolló en la base de mermelada y la significancia estadística de los efectos representados en la tabla 13; fueron determinados por el método estadístico Algoritmo de Yates.

Tabla 13. Significancia estadística de los efectos para el área de histéresis

Tipo de efecto	Variables	Valor del efecto ± error estándar	Significancia estadística
Primarios	T _c	-0,0014± 0,0067	No Significativo
	C _c	0,0694± 0,0064	Significativo
Secundario	T _c . C _c	-0,0034± 0,0099	No Significativo

Tal como se esperaba la concentración del colorante tiene un efecto significativo en el color. Sin embargo, no existe significancia estadística entre los tipos de colorantes; por lo tanto, la adición de los copigmentos a la mermelada no generará una mayor coloración en comparación con las antocianinas. Esta determinación es importante ya que la producción de copigmentos implica el tratamiento de antocianinas con fenoles libres, lo que incrementa los costos del colorante; en consecuencia, el costo del producto final.

La ecuación 4 establece que la absorbancia –color-, únicamente depende de la concentración de colorante en la zona experimental analizada.

$$A=0.0879 - 0,0347C_c \quad (4)$$

Ecuación matemática que describe la absorbancia en función del efecto significativo

3.9. Análisis estadístico de las propiedades reológicas

En la tabla 14 se representa la significancia estadística de los efectos para el área de histéresis, determinado por el método estadístico Algoritmo de Yates.

Tabla 14. Significancia estadística de los efectos para el área de histéresis

Tipo de efecto	Variables	Valor del efecto ± error estándar	Significancia estadística
Primarios	T _c	-31,1725± 4,9362	Significativo
	C _c	2,6605± 6,6124	No Significativo
Secundario	T _c . C _c	16,8225± 3,5048	Significativo

Por lo tanto, el área de histéresis depende del tipo de colorante y de la interacción con la concentración de colorante en la zona experimental analizada, como se representa en la ecuación 5.

$$AH=71,8368-15,5863 T_c+8,4113T_c \cdot C_c \quad (5)$$

Ecuación matemática que describe el área de histéresis en función del efecto significativo

Cuando la interacción de los efectos es significativa, las conclusiones que se obtienen a partir de los efectos primarios no siempre son correctas. Por lo tanto, sólo se interpretan los efectos primarios de aquellos factores que no interactúan con ningún otro.²¹

En base análisis anterior y la tabla 14, se concluye que la interacción del tipo de colorante con la concentración tiene significancia estadística en el área de histéresis. Esto podría deberse a los cambios conformacionales, formación de enlaces de hidrógeno que se detallan en la sección 3.7. El enlace de hidrógeno es una atracción electrostática débil (20 kJ/mol o 4.7 kcal/mol), en comparación con el enlace covalente (400 kJ/mol o 95 kcal/mol); sin embargo, como todas las antocianinas y copigmentos tienen la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, en conjunto representan una gran fuerza.²⁷

4. Conclusión

La adición del colorante sintético rojo 40, antocianinas y copigmentos, influyeron en las propiedades reológicas de una formulación base de mermelada; esto se ve reflejado en el aumento del área de histéresis, sin embargo, los colorantes estudiados podrían ser aplicados a nivel industrial, ya que no se observan lazos de histéresis que son indicativos de la destrucción irreversible del sistema al someterse a esfuerzos. Con respecto al color, la adición de copigmentos a la mermelada, aumenta el efecto hipercrómico; pero no es estadísticamente significativo con respecto al color que proporcionan las antocianinas sin copigmentar. De tal manera las antocianinas corresponden a un colorante natural efectivo para reemplazar el colorante rojo 40; es decir el desarrollo de alimentos funcionales.

Agradecimientos.

Al Ministerio de Ambiente del Ecuador, contrato marco de acceso a recursos genéticos MAE-DNB-CM-2017-0078

Referencias

1. Lee, S. M., Lee, K. T., Lee, S. H., & Song, J. K. (2013). Origin of human colour preference for food. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 508–515.

- <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.021>
2. McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., & Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, *370*(9598), 1560–1567. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)
 3. Chavez-Bravo, E., Alonso-Calderon, A. I. A., Sanchez-Calvario, L., Castaneda-Roldan, E., Vidal Robles, E., & Salazar-Robles, G. (2016). Characterization of the degradation products from the red dye 40 by enterobacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *10*(4), 2569–2575. <https://doi.org/10.22207/JPAM.10.4.12>
 4. Krikorian, R., Kalt, W., McDonald, J. E., Shidler, M. D., Summer, S. S., & Stein, A. L. (2020). Cognitive performance in relation to urinary anthocyanins and their flavonoid-based products following blueberry supplementation in older adults at risk for dementia. *Journal of Functional Foods*, *64*(July), 103667. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103667>
 5. Fakhri, S., Khodamorady, M., Naseri, M., Farzaei, M. H., & Khan, H. (2020). The ameliorating effects of anthocyanins on the cross-linked signaling pathways of cancer dysregulated metabolism. *Pharmacological Research*, 104895. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104895>
 6. Swer, T. L., Chauhan, K., Mukhim, C., Bashir, K., & Kumar, A. (2019). Application of anthocyanins extracted from *Sohiong* (*Prunus nepalensis* L.) in food processing. *Lwt*, *114*(July), 108360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108360>
 7. Vernon-Carter, E. J., Alvarez-Ramirez, J., Bello-Perez, L. A., Gonzalez, M., Reyes, I., & Alvarez-Poblano, L. (2020). Supplementing white maize masa with anthocyanins: Effects on masa rheology and on the in vitro digestibility and hardness of tortillas. *Journal of Cereal Science*, *91*(September 2019), 102883. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.102883>
 8. Ertan, K., Türkyılmaz, M., & Özkan, M. (2020). Color and stability of anthocyanins in strawberry nectars containing various co-pigment sources and sweeteners. *Food Chemistry*, *310*, 125856. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125856>
 9. Martinsen, B. K., Aaby, K., & Skrede, G. (2020). Effect of temperature on stability of anthocyanins, ascorbic acid and color in strawberry and raspberry jams. *Food Chemistry*, *316*, 126297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126297>
 10. Joyner, H. S. (2018). Explaining food texture through rheology. *Current Opinion in Food Science*, *21*, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.04.003>
 11. Upadhyay, R., & Chen, J. (2020). Rheology and tribology assessment of foods. In *Biopolymer-Based Formulations*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816897-4.00028-x>
 12. Suárez, M., & Narváez, G. (2016). *Copigmentación intermolecular de antocianinas glicosiladas*. Quito: editorial académica española.
 13. P. Alvarado and D. Espinoza. (2013).

- Estudio investigativo de la frutilla y su aplicacion en la gastronomía.*
14. Vega, R. (2016). Curso de diseño experimental y análisis estadístico. Quito, Escuela Politécnica Nacional.
 15. C. Campalani *et al.* (2020), "Supercritical CO₂ as a green solvent for the circular economy: Extraction of fatty acids from fruit pomace," *J. CO₂ Util.*, vol. 41, no. July, p. 101259, doi: 10.1016/j.jcou.2020.101259.
 16. C. Vasco, K. Riihinen, J. Ruales, and A. Kamal-Eldin. (2009). "Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*vaccinium floribundum kunth*)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 57, no. 18, pp. 8274–8281, doi: 10.1021/jf9013586.
 17. Zhao, X., Ding, B. W., Qin, J. W., He, F., & Duan, C. Q. (2020). Intermolecular copigmentation between five common 3-O-monoglucosidic anthocyanins and three phenolics in red wine model solutions: The influence of substituent pattern of anthocyanin B ring. *Food Chemistry*, 326(17), 126960. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126960>
 18. Kanha, N., Surawang, S., Pitchakarn, P., Regenstein, J. M., & Laokuldilok, T. (2019). Copigmentation of cyanidin 3-O-glucoside with phenolics: Thermodynamic data and thermal stability. *Food Bioscience*, 30(November 2018), 100419. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100419>
 19. López, G. (21 de noviembre de 2017). Criterios para la formulación de productos alimenticios. (D. Almachi, Entrevistador) Quito, Pichincha, Ecuador.
 20. Fereyra, S. (2015). *Estudio de prefactibilidad. Producción de confituras con integración sociolaboral*. San Rael - Mendoza: Universidad Nacional del Cuyo.
 21. Ramírez, R. (2013). *Estudios de interacción fármaco-excipientes de antiinflamatorios no esteroideos formulados en matrices sol-gel por calorimetría diferencial de barrido*. México D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.
 22. World of Rehology. (2017). Obtenido de Anton Pear GmbH.
 23. Remington, A. (2003). *Farmacia* (Vol. 20). Bueno Aires: PANAMERICANA.
 24. Sui, Xiaonan. Zhang, Yan. Jiang, Lianzhou. Zhou, W. (2018). Anthocyanins in foods. In *Antocyanins in food* (Vol. 7, Issue 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1080/10408397609527207>
 25. Maestro, A. (2002). *Reología de espesantes celulósicos para pinturas al agua*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
 26. Gutiérrez, H., & Salazar, R. d. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda edición ed.). México D.F: McGRAW HILL/INTERAMERICANA.
 27. Badui, S. (2006). *Química de Alimentos* (Cuarta ed.). México D.F: Pearson.