

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de
Alimentos para optar por el Grado de Licenciatura en Ingeniería de
Alimentos

Estudio de la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café
(*Coffea arabica*) para su aplicación como ingrediente colorante en alimentos.

Elaborado por:
Krisia Villalta Medina
Carné A86984

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica
Agosto, 2016

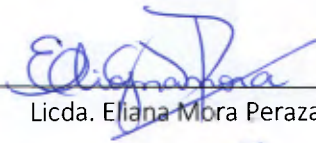
HOJA DE APROBACIÓN

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el Grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos

Elaborado por:

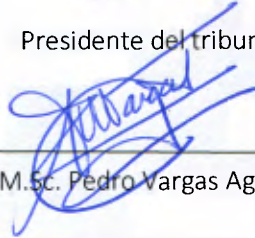
Krisia Villalta Medina

Aprobado por:



Licda. Eliana Mora Peraza

Presidente del tribunal



M.Sc. Pedro Vargas Aguilar

Director del proyecto



Ph.D. Elba Cubero Castillo

Asesora



Ph.D. Ana Ruth Bonilla Leiva

Asesora



M.Sc. Giselle Lutz Cruz

Profesor designado

DEDICATORIA

A Dios,

Que es inmensamente bueno, sin necesidad de pedirle algo, nos da todo lo que necesitamos.

y

A mis abuelitos Nireya y Candido.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a Dios, pues nunca me cansaré de estarle agradecida por darme las fuerzas, la voluntad, la paciencia, la salud, la comprensión y todo lo necesario para realizar este trabajo.

A mi familia, que sin ellos literalmente -no soy nada-, que me han dado todo y más, que están en las buenas, en las malas y en las peores. Que me dieron el amor, la atención, el cariño, los consejos y la compañía cuando ya no podía más (Mi Pelón, Mita, Bernalo-Mochi, Tomy, Snoki, Reich-Tío Joban y Esguitar).

A mi director Pedro Vargas, por sus consejos, porque entre la espada y la pared, me enseñó que siempre hay una alternativa, porque saco tiempo de donde no había para escucharme, y porque Dios me lo puso en el camino para enseñarme lecciones de vida.

A mi comité de profesoras asesoras Elba y Ana Ruth; y a la profesora Nadia que me brindaron su tiempo, su paciencia, su benevolencia, su conocimiento, su ayuda y comprensión. Porque nunca me dijeron que no a pesar de mis errores y siempre estuvieron apoyándome cuando las busque.

A Giova, que sería de nosotros sin personas como usted, que está siempre 24/7 para ayudarnos. Gracias, por involucrarse de lleno en el proceso de cada estudiante que pasa por ese laboratorio. Gracias, por ser mi laborista, mi enfermero, mi consejero, mi psicólogo y hasta mi terapeuta físico en todos los momentos que lo necesite.

A todos los que formaron parte de todo el proceso: profesores, personal de laboratorio, personal administrativo y hasta personal de seguridad, que en las noches largas y frías me acompañaron y con más de un cafecito me ayudaron.

A mis compañeros y amigos de generación Silvia, Greivin, Abea, Mariano, Nacho y “Las Cricketas” por dame ánimo cuando lo necesité, y en especial a dos que estuvieron siempre “hasta que salga el sol” David y Adro (que voy a hacer yo sin vos, la amo).

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	xxii
JUSTIFICACIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
MARCO TEÓRICO.....	4
3.1 El Café	4
3.1.1 Generalidades.....	4
3.1.2 Procesamiento del café	5
3.1.3 Composición de la broza de café	7
3.2 Colorantes naturales en alimentos	8
3.2.1 Antocianinas.....	8
3.3 Estabilidad de las antocianinas a lo largo del tiempo	11
3.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.....	11
3.3.1.1 Efecto del pH	11
3.3.1.2 Efecto de la temperatura.....	12
3.3.1.3 Efecto de la luz.....	13
3.3.1.4 Efecto de la concentración	14
3.3.1.5 Efecto del oxígeno y ácido ascórbico.....	14
3.3.1.6 Efecto de los azúcares	15

3.3.1.7	Otros efectos	15
3.3.2	Mecanismos de estabilización de antocianinas	16
3.3.2.1	Encapsulación	16
3.3.2.2	Copigmentación.....	17
3.3.2.3	Efecto de los metales.....	20
3.4	Aplicaciones de colorantes naturales en alimentos	21
3.5	Cinética química en alimentos.....	23
3.6	Teoría de la medición del color	27
3.7	Teoría de la medición de antocianinas y compuestos oscuros.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS		33
4.1	Localización del proyecto	33
4.2	Materia prima	33
4.3	Pruebas preliminares	34
4.3.1	Definición de la concentración de extracto rojo en polvo de broza de café a utilizar en disolución acuosa y aplicada a diferentes matrices alimentarias.....	34
4.3.2	Prueba de pre-estabilidad para la selección del rango de pH para realizar el estudio	35
4.3.3	Prueba de pre-estabilidad para la selección de los tiempos de evaluación para realizar el estudio del efecto de la temperatura	35
4.3.4	Definición de la concentración y tipo de aditivo con función preservante a utilizar a lo largo del estudio	36
4.3.5	Definición de la concentración del extracto a utilizar en las matrices alimentarias: yogur y sirope de fresa.....	36
4.4	Pruebas definitivas	37
4.4.1	Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café ante los efectos de pH, concentración de iones calcio y exposición a la luz	37
4.4.1.1	Prueba de estabilidad ante el efecto del pH.....	37

4.4.1.2	Prueba de estabilidad ante el efecto de iones calcio.....	38
4.4.1.3	Prueba de estabilidad ante la exposición a la luz.....	40
4.4.2	Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café ante el efecto de diferentes temperaturas y determinación de su cinética de reacción de degradación 42	
4.4.3	Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café durante un período de almacenamiento en una matriz alimentaria.....	45
4.5	Condiciones de almacenamiento de las muestras	46
4.6	Métodos de análisis fisicoquímicos	47
4.6.1	Determinación de pH.....	47
4.6.2	Determinación de color	47
4.6.3	Determinación de fotografías.....	47
4.6.4	Determinación de antocianinas por método espectrofotométrico	48
4.6.5	Determinación del índice de pardeamiento	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		51
5.1	Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante los efectos del pH.....	56
5.2	Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de iones calcio	60
5.3	Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz	69
5.4	Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes temperaturas y su cinética de reacción.....	74
	Temperatura 80 °C.....	74
	Temperatura 55 °C.....	76
	Temperatura 25 °C.....	79
	Temperatura 4 °C.....	81

Temperatura -20 °C.....	84
Cinética Química	86
5.5 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria.....	92
5.5.1 Yogur.....	92
5.5.2 Sirope de fresa	97
CONCLUSIONES	102
RECOMENDACIONES	103
REFERENCIAS	104
ANEXOS.....	113
9.1 Pruebas realizadas para la definición de la concentración y tipo de aditivo con función preservante a utilizar a lo largo del estudio.....	113
9.2 Resultados de color al evaluar la concentración de broza de café sirope 4 y 8%, yogur 6 y 10%	113
9.3 Ficha técnica del yogur.....	114
9.4 Ficha técnica del sirope de fresa	115
9.5 Resultados de análisis microbiológicos.....	116
9.6 Gráficas de los resultados crudos obtenidos para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café, ante los efectos de pH, concentración de iones calcio y exposición a la luz	117
9.7 Gráficas de los resultados crudos obtenidos durante la evaluación de las diferentes temperaturas para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café	120
9.8 Gráficas de los resultados crudos obtenidos durante de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café aplicado en dos matrices alimentarias.....	126
9.9 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante los efectos del pH.....	128
9.10 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de iones Ca	129

9.11	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.....	132
9.12	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 80 °C.....	135
9.13	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 55 °C.....	137
9.14	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 25 °C.....	139
9.15	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 4 °C.....	141
9.16	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura -20 °C	143
9.17	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria yogur	145
9.18	Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa	147

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las capas de un fruto de café (Adaptado de Esquivel & Jiménez, 2011).	4
Figura 2. Diagrama de flujo del beneficio húmedo del café (Adaptado de Morales, 2014).	5
Figura 3. Composición del café en fruta. (Adaptado de Alfaro & Rodríguez, 1994).	6
Figura 4. Estructura y sustituyentes de las antocianidinas (Adaptado de Quintero, 2004).	8
Figura 5. Cianidina-3-o-glucósido y cianidina-3-o-rutinósido (Adaptado de Polyphenols AS, s.f.).	9
Figura 6. Estructura de la antocianina a diferentes pH (Adaptado de Quintero, 2004).	11
Figura 7. Efecto de la copigmentación en la interacción de las antocianinas: (A) autoasociación, (B) copigmentación intramolecular, (C) complejo con metal, (D) copigmentación intermolecular (Adaptado de Castañeda <i>et al.</i> , 2009).	18
Figura 8. Esquema o sólido tridimensional de la percepción humana de los colores. (Adaptado de Montesinos, 2013).	28
Figura 9. Sistema de color tridimensional que muestra luminosidad (Adaptado de Montesinos, 2013).	29
Figura 10. Sistema de color que muestra tono o matiz (Adaptado de Montesinos, 2013).	30
Figura 11. Sistema de color que muestra saturación o cromaticidad (Adaptado de Montesinos, 2013).	30
Figura 12. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café a diferentes pH, con y sin tratamiento a 75 °C por 30 minutos.	54
Figura 13. Comparación de medias de los parámetros de color obtenidos en la evaluación del efecto de diferentes pH como indicador de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución al 4%.	56
Figura 14. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, durante la evaluación del efecto del pH.	58
Figura 15. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas totales obtenido a diferentes valores de pH como indicador de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%.	59

Figura 16. Comparación de medias para el parámetro de color luminosidad (L^*) obtenido durante la evaluación del efecto de los iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.	61
Figura 17. Comparación de medias para el parámetro de color cromaticidad (C^*) obtenido durante la evaluación del efecto de los iones calcio sobre la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.	62
Figura 18. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, en la evaluación del efecto de iones calcio durante 8 días.	64
Figura 19. Recta de regresión para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenida en la evaluación del efecto de los iones calcio sobre la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.	65
Figura 20. Comparación de medias para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas durante la evaluación del efecto de iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.	66
Figura 21. Cinéticas de degradación para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de diferentes concentraciones de iones calcio a lo largo de 8 días.	67
Figura 22. Recta de regresión del índice de oscurecimiento obtenida durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de los iones de calcio a lo largo de 8 días.	68
Figura 23. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, ante el efecto de la exposición a la luz durante 60 horas.	70
Figura 24. Rectas de regresión del parámetro de color croma C^* (lado izquierdo) y del parámetro tonalidad h^* (lado derecho), obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4% ante el efecto de la exposición a la luz por 60 horas.	70
Figura 25. Cinéticas de degradación para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de la exposición a la luz a lo largo de 60 horas.	73
Figura 26. Recta de regresión del parámetro de color tonalidad (h^*), obtenida durante la evaluación del efecto de la temperatura 80 °C sobre la estabilidad del extracto rojo de broza de café al 4% a lo largo de 8 horas.	74
Figura 27. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 80 °C a lo largo de 8 horas.	75

Figura 28. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café a 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 55 °C a lo largo de 8 horas.	78
Figura 29. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura a 25 °C a lo largo de 216 horas.	80
Figura 30. Recta de regresión para el parámetro de cromaticidad C* obtenida durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café ante el efecto de la temperatura 4 °C por un período de 76 días.	81
Figura 31. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 4 °C por un período de 76 días.	83
Figura 32. Rectas de regresión de los parámetros de color luminosidad y cromaticidad, obtenidas durante la evaluación del efecto de la temperatura -20 °C en la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución a lo largo de 106 días.	84
Figura 33. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura -20 °C, por un período de 106 días.	85
Figura 34. Cinéticas de degradación a diferentes temperaturas de las antocianinas presentes en un extracto rojo de broza de café en disolución al 4%.	87
Figura 35. Determinación de la energía de activación (E_a) de la degradación de las antocianinas presentes en el extracto rojo en polvo de la broza de café al 4%.	89
Figura 36. Rectas de regresión para el índice de oscurecimiento obtenidas durante la evaluación del efecto de la temperatura en la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%. ..	91
Figura 37. Rectas de regresión del parámetro de color luminosidad L* (lado izquierdo) y del parámetro tonalidad h* (lado derecho), obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 en yogur al 0,0006%, a lo largo de 40 días.	93
Figura 38. Comparación de medias para los parámetros de color luminosidad L* (lado izquierdo) y tonalidad h* (lado derecho), obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006% en yogur, por un período de 40 días.	94
Figura 39. Fotografías de las muestras de yogur durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006%, por un período de 40 días.	95

Figura 40. Fotografías de las muestras de sirope de fresa durante la evaluación de la estabilidad del FD&C Rojo No. 40 al 0,004%, por un período de 90 días.....	100
Figura 41. Fotografías de las muestras de sirope de fresa durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café al 4%, por un período de 90 días.....	101
Figura A 1. Resultados de luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes concentraciones de iones Ca: 0, 75, 125 y 200 (mg/100 mL).	117
Figura A 2. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.....	118
Figura A 3. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes concentraciones de iones Ca: 0, 75, 125 y 200 (mg/100mL).....	119
Figura A 4. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.....	119
Figura A 5. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 80 °C.	120
Figura A 6. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 55 °C.	121
Figura A 7. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 25 °C.	122
Figura A 8. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 4 °C.	123
Figura A 9. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura -20 °C.....	124
Figura A 10. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura.	125

Figura A 11. Luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café y del FD&C Rojo No. 40 en yogur. 126

Figura A 12. Luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café y del FD&C Rojo No. 40 en sirope de fresa..... 127

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I. Tratamientos evaluados para describir el efecto del pH sobre el comportamiento del extracto rojo en polvo de la broza de café a una concentración de 4%.	37
Cuadro II. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de cuatro concentraciones de iones calcio sobre el extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4%.....	39
Cuadro III. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de la luz en la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4%.	41
Cuadro IV. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4% en disolución acuosa. ..	42
Cuadro V. Comparación del color de diferentes concentraciones del extracto rojo en polvo de la broza del café en disolución a un pH de 3,25.	51
Cuadro VI. Comparación de color de diferentes concentraciones de extracto rojo en polvo de broza de café y FD&C Rojo No. 40, en muestras de yogur y sirope de fresa para seleccionar la concentración a utilizar en las pruebas definitivas.	52
Cuadro VII. Comparación del color del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a diferentes pH, a una concentración de 4%, con y sin tratamiento térmico de 75 °C por 30 minutos, para seleccionar el ámbito de pH a usar en la prueba definitiva.	53
Cuadro VIII. Comparación del color de las disoluciones del extracto rojo de la broza de café al 4% a diferentes temperaturas, para seleccionar las temperaturas de las pruebas definitivas.	54
Cuadro IX. Regresiones lineales para el parámetro de color tonalidad (h^*), obtenidas durante la evaluación del efecto de iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, a lo largo de 8 días.	63
Cuadro X. Regresiones lineales para el contenido de antocianinas monoméricas obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de la exposición a la luz a lo largo de 60 horas.	71
Cuadro XI. Regresiones lineales de los parámetros de color obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 55 °C a lo largo de 8 horas.	76
Cuadro XII. Regresiones lineales de los parámetros de color, obtenidas en la evaluación del efecto de la temperatura 25 °C sobre la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución a lo largo de 216 horas.	79

Cuadro XIII. Parámetros cinéticos de degradación de antocianinas presentes en disolución del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura.	88
Cuadro XIV. Energías de activación determinadas durante el estudio cinético de degradación de antocianinas de frutas y vegetales obtenidos en diferentes investigaciones siguiendo un procesamiento térmico.	90
Cuadro XV. Regresión lineal del parámetro de color cromaticidad (C^*), obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006% en yogur, a lo largo de 40 días.....	96
Cuadro XVI. Regresiones lineales de los parámetros de color, obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 4% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,004% en sirope de fresa, por un período de 90 días.	98
Cuadro A 1. Observaciones realizadas durante la evaluación del aditivo con función preservante en disoluciones con extracto rojo de broza de café al 4%. 113	113
Cuadro A 2. Evaluación de color de diferentes concentraciones de extracto rojo de broza de café en muestras de yogur y sirope de fresa.....	113
Cuadro A 3. Ficha técnica con datos teóricos para un yogur natural, marca “La Rueda”.	114
Cuadro A 4. Ficha técnica con resultados teóricos para un sirope de fresa.....	115
Cuadro A 5. Reporte de análisis microbiológico Laboratorio de Análisis de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.....	116
Cuadro A 6. Análisis de varianza del efecto del pH sobre el parámetro de color luminosidad L^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	128
Cuadro A 7. Análisis de varianza del efecto del pH, sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	128
Cuadro A 8. Análisis de varianza del efecto del pH, sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	128
Cuadro A 9. Análisis de varianza del efecto del pH sobre el contenido de antocianinas totales, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	128

Cuadro A 10. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	129
Cuadro A 11. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	129
Cuadro A 12. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	129
Cuadro A 13. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 0 (mg/ 100mL).....	130
Cuadro A 14. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 75 (mg/ 100mL).	130
Cuadro A 15. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 125 (mg/ 100mL).	130
Cuadro A 16. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 200 (mg/ 100mL).	131
Cuadro A 17. Análisis de varianza del efecto de la concentración de calcio sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión de la tonalidad h* contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	131
Cuadro A 18. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	131
Cuadro A 19. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	131
Cuadro A 20. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	132

Cuadro A 21. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	132
Cuadro A 22. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	132
Cuadro A 23. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	133
Cuadro A 24. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el contenido de antocianinas, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.	133
Cuadro A 25. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el contenido de antocianinas, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la oscuridad.	133
Cuadro A 26. Análisis de varianza del efecto de la condición luz/oscuridad sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión del contenido de antocianinas contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	133
Cuadro A 27. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	134
Cuadro A 28. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color luminosidad L^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	135
Cuadro A 29. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	135
Cuadro A 30. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	135
Cuadro A 31. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.	136

Cuadro A 32. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	136
Cuadro A 33. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	137
Cuadro A 34. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	137
Cuadro A 35. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	137
Cuadro A 36. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	138
Cuadro A 37. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	138
Cuadro A 38. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	139
Cuadro A 39. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	139
Cuadro A 40. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	139
Cuadro A 41. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	140
Cuadro A 42. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	140

Cuadro A 43. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	141
Cuadro A 44. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	141
Cuadro A 45. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	141
Cuadro A 46. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	142
Cuadro A 47. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	142
Cuadro A 48. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	143
Cuadro A 49. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	143
Cuadro A 50. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	143
Cuadro A 51. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	144
Cuadro A 52. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.....	144
Cuadro A 53. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.....	145

Cuadro A 54. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.....	145
Cuadro A 55. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria yogur.....	145
Cuadro A 56. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria yogur.....	146
Cuadro A 57. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.....	146
Cuadro A 58. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.	147
Cuadro A 59. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color luminosidad L^* , durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.	147
Cuadro A 60. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color luminosidad L^* , durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.	147
Cuadro A 61. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.	148
Cuadro A 62. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.	148
Cuadro A 63. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C^* , durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.	148
Cuadro A 64. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.	149

Cuadro A 65. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.	149
Cuadro A 66. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h^* , durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.	149
Cuadro A 67. Análisis de varianza del efecto de los tipos de colorantes sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión de la tonalidad h^* contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad de los colorantes en sirope de fresa.....	150

RESUMEN

Villalta Medina, Krisia.

Estudio de la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café (*Coffea arabica*) para su aplicación como ingrediente colorante en alimentos.

Tesis en Ingeniería de Alimentos – San José, Costa Rica.

(K, VILLALTA. 2016; 150 pp: 53 fig.: 90 refs)

En la actualidad el interés y demanda de los colorantes naturales ha tenido un aumento significativo en el mercado de nuevos productos; debido a que es asociado a un uso seguro en el alimento y con beneficios en la salud. Por ello, a partir de este estudio se busca determinar la estabilidad de un extracto rojo de la broza del café (*Coffea arabica*) en su función como ingrediente colorante en alimentos.

Inicialmente, se aplicó el extracto rojo en soluciones modelo con diferentes condiciones fisicoquímicas (pH, concentración de iones calcio, con y sin luz, y temperatura) para observar la variación del color y del contenido de antocianinas totales. Luego se realizó un estudio de almacenamiento de dos productos: yogur y sirope de fresa comparando el extracto rojo en polvo de café con un colorante artificial mediante la determinación del color instrumental.

Para cada pH evaluado se observó un cambio de color y una variación en el contenido de antocianinas; para el pH 2 y el pH 3 se presentó el mayor contenido de antocianinas con diferencias significativas entre ellos para la variable luminosidad L*, cromaticidad C*, pero no para la variable tonalidad h*.

Por otro lado, el extracto presentó condiciones más estables con la presencia de iones calcio a la máxima concentración de estudio 200mg/ 100mL, además presentó estabilidad con luz y oscuridad y a temperatura ambiente (25 °C), refrigeración (4 °C) y congelación (-20 °C).

Sin embargo, se observó una degradación más acelerada tanto de color como de contenido de antocianinas en el extracto al ser sometido a temperaturas altas (55 y 80 °C). Misma degradación que se observó durante el almacenamiento del yogur y el sirope de fresa, en este último caso evidenciado como un cambio en la tonalidad (h*) roja del pigmento.

Ambos productos que contenían el extracto rojo en polvo de broza de café, presentaron diferencias significativas en los parámetros de color a lo largo del tiempo y al ser comparados con el FD&C Rojo No. 40; es decir, para la misma matriz alimentaria el color fue variando durante el tiempo de almacenamiento y también fue diferente entre un colorante y otro.

Finalmente, se determinó la cinética de la reacción de degradación de las antocianinas monoméricas totales presentes en el extracto ante el efecto de la temperatura, donde se observó vidas medias desde 6 horas hasta 53171 horas a las temperaturas de 80 °C y -20 °C; y una energía de activación de la reacción total de 67,29 KJ/mol.

Palabras clave: ANTOCIANINAS, BROZA, CAFÉ, COLORANTES NATURALES, ESTABILIDAD, YOGUR, SIROPE, CINÉTICAS, DEGRADACIÓN, APLICACIONES, CIANIDINA.

Director de la investigación: Vargas Aguilar, Pedro.

Unidad académica: Escuela de Tecnología de Alimentos.

Universidad de Costa Rica.

JUSTIFICACIÓN

Los colorantes alimentarios juegan un papel muy importante en mejorar la apariencia de los alimentos. La coloración de los alimentos, ya sea con aditivos naturales o sintéticos, tiene como finalidad ayudar a la comercialización y satisfacer a los consumidores al obtener los colores deseados en los productos. Además, en algunos productos se utilizan para restaurar los tonos naturales que se perdieron durante la exposición al aire, la luz, la temperatura, la humedad o condiciones inadecuadas de almacenamiento; y en el caso de los naturales pueden proteger sabores y vitaminas debido a su potencial como compuestos antioxidantes (Socaciu, 2007).

Particularmente, los colorantes naturales son de gran demanda para su uso en los alimentos. Las antocianinas junto a los carotenoides, se encuentran entre los colorantes naturales más utilizados en la industria alimentaria, y son las sustancias responsables del color naranja brillante, rosa, rojo, violeta y colores azules en las flores y frutos de algunas plantas y poseen propiedades importantes por su actividad antioxidante (Konczak & Zhang, 2004; Castañeda *et al.*, 2009).

Las antocianinas están ampliamente presentes en alimentos tales como las uvas, manzanas, arándanos, moras, fresas, cerezas, uvas, rábanos, maíz morado, entre otros (Bridle & Timberlake, 1997; Eder, 2004; Castañeda *et al.*, 2009); además recientemente, algunos estudios encontraron que las cáscaras de café fresco y la pulpa son una fuente potencial de las antocianinas cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido (Esquivel & Jiménez, 2011).

La broza de café (conjunto de cáscara y pulpa) es un residuo agroindustrial del procesamiento del café que es rico en nutrimentos, pues contiene carbohidratos, fibra, proteínas y otras sustancias antioxidantes como la cafeína y compuestos fenólicos (Vásquez, 1997; Pandey *et al.*, 2000; López *et al.*, 2011). Sin embargo, el manejo de este residuo ha llegado a ser un reto para los productores de este grano, debido a que representa el 45,5% de la composición total del café; que además por su composición química es un desecho muy contaminante con una demanda de oxígeno muy alta (Vásquez, 1997).

En Costa Rica, solo para el año 2015 las exportaciones de café alcanzaron las 69053 toneladas, para un monto de \$309550,8 millones de dólares incluyendo el café oro, café sin tostar ni descafeinar, café tostado descafeinado y café tostado sin descafeinar; lo anterior se traduce en

una producción de miles de toneladas de broza al año (PROCOMER, 2015). Ciertos estudios han llegado a estimar que solo el beneficiado húmedo de un kg de café verde provoca, mediante la generación de las aguas de lavado y los desechos del despulpado, una contaminación equivalente a la generada por 5,6 personas adultas por día (Alfaro & Rodríguez, 1994; Vásquez, 1997).

Por lo tanto, se han buscado alternativas para tratar estos subproductos, como son: abono orgánico, combustible, incorporación en la dieta alimentaria animal, transformación de la broza en un alimento saludable y en un extracto natural con propiedades colorantes (Alfaro & Rodríguez, 1994). Esta última alternativa posee gran potencial debido a que las antocianinas serían los sustitutos ideales para colorantes rojos sintéticos basados en sus colores brillantes que van desde rojo-naranja a azul.

No obstante, el uso de las antocianinas en los alimentos se ha visto obstaculizado por la falta de estabilidad, que se ve afectada por factores físicos y químicos, tales como temperatura, pH, luz, disolvente y la estructura de pigmento, así como factores como presencia de metales o contenido de azúcar, que prevalecen durante el procesamiento de alimentos y su almacenamiento (Mukhopadhyay, 2000; Mercadante & Bobbio, 2007; Socaciu, 2007). Estas características han conducido a que las aplicaciones de las antocianinas se realicen preferentemente en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio, molécula en su estado más estable (Aguilera *et al.*, 2011).

De esta manera, los colorantes naturales son muy buscados para aplicaciones en bebidas, productos de confitería, panadería y diversos productos lácteos; pues estos productos cumplen con características técnicas tales que permiten asegurar estabilidad en la aplicación. Por ejemplo, se ha observado que aplicaciones en productos lácteos como el yogur o la crema agria son alternativas viables al tener pH alrededor de 4,2 a 4,5, una vida útil de pocas semanas, y mantenerse en condiciones de refrigeración (Socaciu, 2007; Shipp & Abdel-Aal, 2010).

Debido al enorme potencial de las antocianinas como pigmentos naturales esta investigación procura encontrar las condiciones de estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza de café (*Coffea arabica*), en soluciones modelo y en productos alimenticios. Estas condiciones optimizarán la aplicación comercial del extracto como ingrediente colorante en alimentos, proporcionando una nueva alternativa natural y representando una opción viable y de gran impacto para la utilización de los desechos generados durante el procesamiento de café en Costa Rica.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza del café (*Coffea arabica*) en soluciones modelo a diferentes condiciones fisicoquímicas y en dos productos alimenticios en comparación con un colorante artificial; mediante la determinación del color y de las antocianinas totales, durante un estudio de almacenamiento.

2.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar el efecto del pH, concentración de iones calcio y la exposición a la luz sobre la estabilidad de las antocianinas en soluciones modelo que tienen una concentración fija del extracto rojo en polvo de la broza de café, a lo largo de un período de almacenamiento.
- II. Evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de las antocianinas en soluciones modelo que tienen una concentración fija del extracto rojo en polvo de la broza de café, a lo largo de un período de almacenamiento.
- III. Comparar la estabilidad de un extracto rojo en polvo de la broza del café con la de un colorante artificial aplicado a dos productos alimenticios, durante un período de almacenamiento.

MARCO TEÓRICO

3.1 El Café

3.1.1 Generalidades

El fruto de café (también llamado baya o cereza) es la fruta cruda producida a partir de la planta del género botánico *Coffea* y es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo ya que constituye una parte importante de la economía de exportación de muchos países (Pandey *et al.*, 2000; Murugan & Al-Sohaibani, 2012; Mussatto & Teixeira, 2013).

La mayor parte de las bebidas de café consumidas en todo el mundo se elaboran a partir de la variedad *Coffea arabica* (Arabica) que se considera la variedad con mejor calidad sensorial y corresponde aproximadamente el 75-80% de la producción mundial, mientras que la variedad de *Coffea canephora* (robusta), que es más ácido, representa alrededor del otro 20-25% (Murugan & Al-Sohaibani, 2012; Mussatto & Teixeira, 2013).

El fruto del café, como se puede observar en la figura 1, consiste en una piel suave externa, pericarpio o cáscara, generalmente de color verde en las frutas inmaduras, pero que se vuelve rojo-violeta o rojo oscuro cuando está maduro. El pericarpio cubre la pulpa de color amarillento, fibroso, dulce y suave llamada mesocarpio exterior. Esto es seguido por una capa de mucílago, translúcida, incolora, delgada, viscosa y altamente hidratada (también llamada la capa de pectina). Luego hay un endocarpio fino de color amarillento, también llamado pergamino. Por último, el endospermo, que corresponde a la piel plateada que cubre el hemisferio del grano de café (Murugan & Al-Sohaibani, 2012).

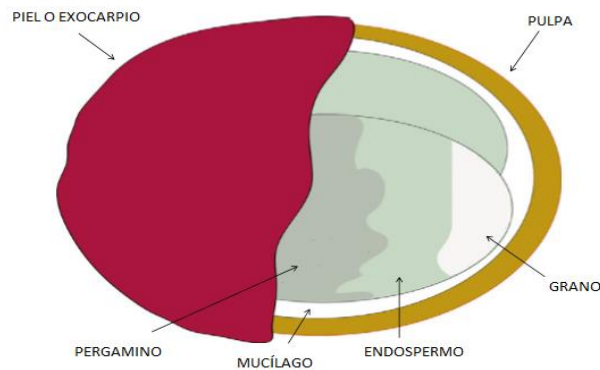


Figura 1. Estructura de las capas de un fruto de café (Adaptado de Esquivel & Jiménez, 2011).

El café es una mezcla de miles de diferentes compuestos químicos con propiedades beneficiosas para la salud; dentro de estos compuestos se encuentran carbohidratos, lípidos, vitaminas, y otras sustancias tales como la cafeína, el ácido clorogénico, alcaloides, moléculas nitrogenadas, y compuestos fenólicos (Muriel & Arauz, 2010; Murugan & Al-Sohaibani, 2012; Mussatto & Teixeira, 2013).

Actualmente, alrededor de 8,5 toneladas de café se producen anualmente en más de 50 países, donde Brasil es el mayor productor de café del mundo. El documento de perspectivas para el mercado del café preparado por la Organización Internacional del Café (OIC), organización que rige el comercio internacional del café en colaboración con la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estima que la producción mundial de café en el año 2015 fue de más de 143,4 millones de sacos, lo que probablemente aumente hasta 157.281 millones de sacos en el año 2019 (Pandey *et al.*, 2000; Murugan & Al-Sohaibani, 2012; International Coffee Organization, 2015).

3.1.2 Procesamiento del café

El procesamiento industrial del café, puede realizarse por tres diferentes sistemas: (i) el tratamiento en seco de café natural, (ii) el proceso húmedo de café lavado, y (iii) un proceso intermedio semi seco (despulpado natural) (Alfaro & Rodríguez, 1994; Pandey *et al.*, 2000; Murugan & Al-Sohaibani, 2012).

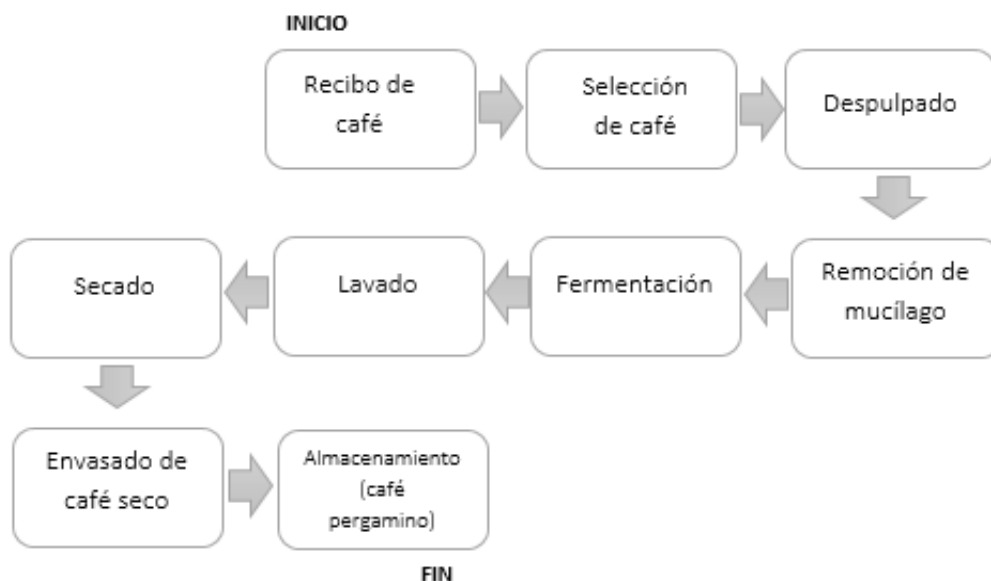


Figura 2. Diagrama de flujo del beneficio húmedo del café (Adaptado de Morales, 2014).

En Costa Rica el sistema más utilizado es el beneficiado húmedo, como se puede ver en la figura 2; este procesamiento requiere del empleo de agua para las distintas operaciones de preparación del grano, generando un café conocido como café "suave", de gran calidad y aceptación en el mercado internacional. Este procesamiento industrial del café involucra las siguientes operaciones: despulpado, desmucilaginado, lavado, secado y posteriormente, la separación de la cascarilla para ser clasificado y envasado (Alfaro & Rodríguez, 1994).

Durante el proceso se generan desechos o subproductos que ocasionan alteraciones directas e indirectas en el medio ambiente, como es el caso de la pulpa, las aguas residuales y la piel, exocarpio o cáscara del café. En algunos casos, la broza de café como se nombra en este documento al conjunto de la piel o cáscara más la pulpa, no es liberada junto con las aguas residuales y es acumulada en áreas cercanas al beneficio, constituyendo un foco generador de insectos y malos olores (Alfaro & Rodríguez, 1994; Murugan & Al-Sohaibani, 2012).

El manejo de la broza ha llegado a ser un reto para los productores de este grano, debido a que este residuo representa el 45,5% de la composición total del café, como se observa en la Figura 3. Por lo tanto, durante el procesamiento del café se generan grandes cantidades de residuo, además por su composición química la broza es un desecho muy contaminante puesto que posee una demanda de oxígeno muy alta (Alfaro & Rodríguez, 1994).

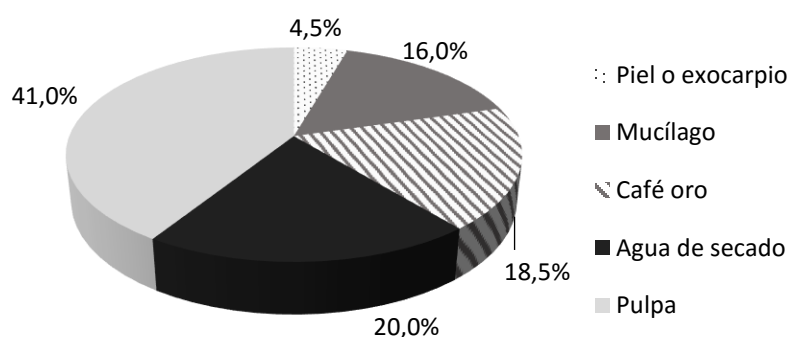


Figura 3. Composición del café en fruta. (Adaptado de Alfaro & Rodríguez, 1994).

Hoy en día, se han hecho esfuerzos para aprovechar los desechos de café como materia prima para derivar una serie de productos de valor añadido tales como enzimas, ácidos orgánicos, sabores, azúcares, setas y otros materiales compuestos mejorados (Murugan & Al-Sohaibani, 2012).

3.1.3 Composición de la broza de café

Como se mencionó anteriormente durante el procesamiento de café (beneficiado húmedo) se generan desechos que incluyen la piel o cáscara y la pulpa (broza de café). Estos dos componentes tienen una composición química muy similar, cerca de 7,5-15,0% de proteína, 2,0-7,0% de grasa y 21-32% de carbohidratos; pero además contiene sustancias como la cafeína y otros compuestos fenólicos entre los que se encuentran flavonoides, isoflavonoides, antraquinonas, antocianidinas y xantonas, así como los ácidos hidroxicinámicos, fenilpropenos, ligninas, fenoles simples, ácidos fenólicos, entre otros (Vásquez, 1997; Pandey *et al.*, 2000; López *et al.*, 2011, Esquivel & Jiménez, 2012).

Justamente, en la broza de café de la variedad *Coffea arabica* (Arabica) se pueden encontrar cuatro clases principales de polifenoles a saber flavanoles, ácido hidroxicinámico, flavonoides y antocianinas. Para el año 2010, se habían logrado identificar la presencia de las antocianinas cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido y su aglicona como las principales antocianinas, las cuales son las principales responsables de brindar los colores violetas o rojo oscuro cuando el grano está maduro. Además, taninos condensados (proantocianidinas) son también componentes importantes de la pulpa y piel de café (Konczak & Zhang, 2004; Prata & Oliveira, 2007; Castañeda *et al.*, 2009; Esquivel & Jiménez, 2012).

3.2 Colorantes naturales en alimentos

3.2.1 Antocianinas

Las antocianinas son flavonoides que pertenecen a una gran familia de polifenoles presentes en las plantas y son responsables de los colores para muchas frutas y flores observadas en la naturaleza. Su estructura se basa en un esqueleto de 15 carbonos que conforman un anillo cromano que lleva un segundo anillo aromático B en la posición 2; ésta se complementa con una o más moléculas de azúcar unidas en diferentes posiciones de hidroxilación de la estructura básica. Por lo tanto, las antocianinas son: antocianidinas + azúcares → antocianinas (Delgado & Paredes, 2003; Quintero, 2004; Ortíz *et al.*, 2011).

Estas moléculas muestran una gran diversidad en la naturaleza, pero todos se basan en el esqueleto de 15 carbonos de las antocianidinas. Tal diversidad representada por un infinito de colores naturales se produce por la combinación química de 6 de las principales antocianidinas (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, malvidina) con los azúcares y/o grupos acilo (Delgado & Paredes, 2003; Cuevas *et al.*, 2011; Andersen & Jordheim, 2013), como se observa en la figura 4.

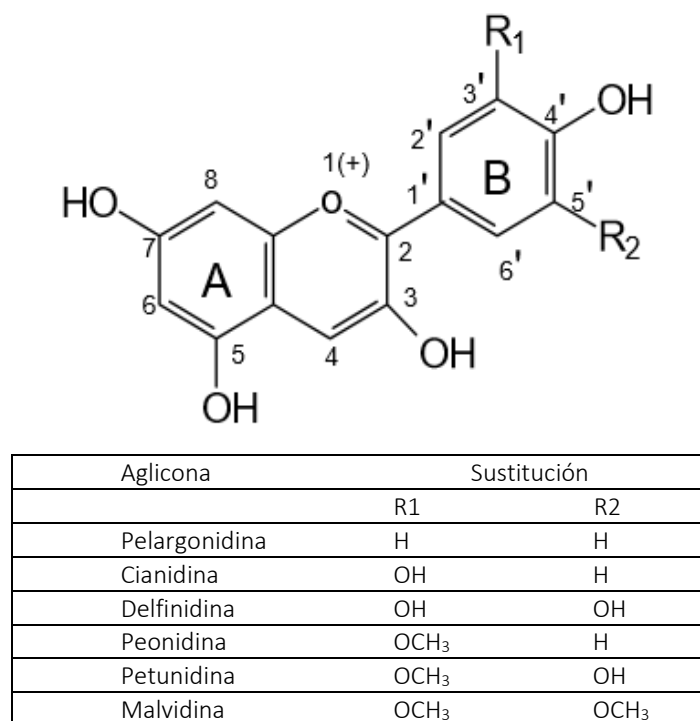


Figura 4. Estructura y sustituyentes de las antocianidinas (Adaptado de Quintero, 2004).

La estructura molecular juega el papel más importante pues interviene en la estabilidad de las antocianinas y a su vez en el color, generalmente con el incremento de hidroxilaciones decrece la estabilidad, mientras que un incremento de metilaciones incrementa la estabilidad. El color particular de cada antocianina también depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras que un incremento en la metoxilación produce un color rojo (Delgado & Paredes, 2003; Quintero, 2004; Cuevas *et al.*, 2011, Ortíz *et al.*, 2011).

A continuación, se observan las estructuras de las antocianinas identificadas en la broza del café, como se mencionó en la sección 3.1.3.

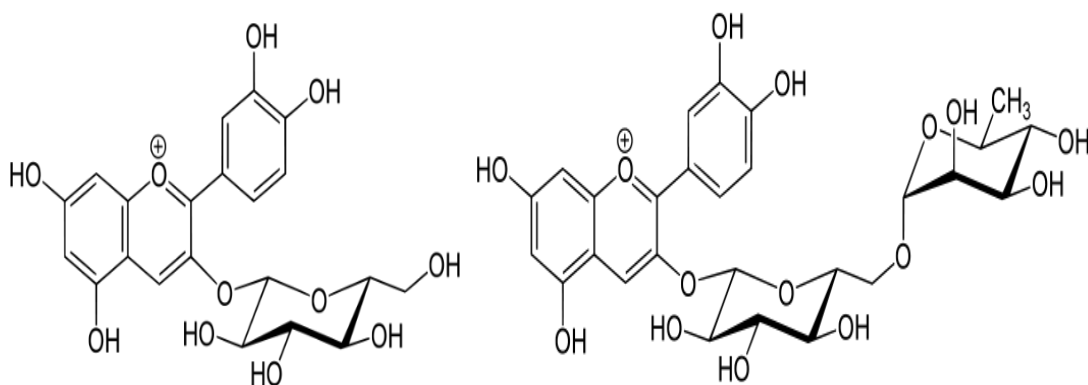


Figura 5. Cianidina-3-o-glucósido y cianidina-3-o-rutinósido (Adaptado de Polyphenols AS, s.f.).

El azúcar presente en la molécula les confiere una gran solubilidad y estabilidad, que generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero puede también hacerlo en las posiciones 5 y 7. Con base en el número de azúcares presentes en su estructura, las antocianinas se clasifican en: monoglucósidos (un azúcar), diglucósidos (dos azúcares) y triglucósidos (tres azúcares). Los tipos de azúcares presentes pueden ser: monosacáridos, disacáridos o trisacáridos. Los monosacáridos más comunes son: pentosas como arabinosa y xilosa, o bien hexosas, de las cuales la D-glucosa es la más frecuente, aunque también pueden estar presentes galactosa o ramnosa. Los disacáridos más frecuentes son gentobiosa, soforosa, sambubiosa y rutinosa. Los trisacáridos reportados pueden ser lineales como la gentotriosa, o bien ramificados como xilosilrutinosa o glucosilrutinosa (Strack & Wray, 1989; Ortíz *et al.*, 2011).

Estas estructuras son clasificadas como monoméricas, sin embargo, en algunos casos los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico, ferúlico o sináptico). Se ha observado que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura. Cuando en la molécula de antocianina se encuentran únicamente azúcares, se denominan no aciladas; pero si además de los azúcares están presentes uno o varios radicales acilo, se catalogan como aciladas poliméricas (Salinas *et al.*, 2010; Ortíz *et al.*, 2011).

En el caso de las antocianinas presentes en la broza de café, se puede hablar de una combinación de antocianinas aciladas y no aciladas, debido a que en estudios realizados evaluando las antocianinas presentes en la pulpa, se han encontrado $24 \pm 2,0$ mg de antocianinas monoméricas en 100 g de pulpa fresca sobre una base de peso seco, y un porcentaje de antocianinas poliméricas de $23 \pm 5,0$ %. Sin embargo, al realizar análisis de las antocianinas presentes en la cáscara del café, se identifica cianidina 3-rutinósido como la principal antocianina, seguido de una pequeña cantidad de cianidina 3-glucósido; ambas antocianinas determinadas como no aciladas con ácidos alifáticos. Es decir, un porcentaje del contenido de antocianinas presentes en la broza del café (cáscara y pulpa), estaría representado por antocianinas poliméricas o aciladas provenientes de la pulpa, lo cual puede llegar a concederle cierta estabilidad en un extracto (Prata & Oliveira, 2007; Murthy *et al.*, 2012).

La degradación de las antocianinas puede ocurrir durante su extracción, su procesamiento y su almacenamiento. Por lo tanto, un conocimiento correcto de los factores que rigen la estabilidad de antocianinas como se presenta en la siguiente sección, parece ser decisivo en términos de una aplicación en matrices de alimentos con función como colorante (Gould *et al.*, 2009).

3.3 Estabilidad de las antocianinas a lo largo del tiempo

3.3.1 Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

3.3.1.1 Efecto del pH

El pH es un factor de gran importancia en la estabilidad de las antocianinas, pues como se menciona con frecuencia en la literatura, las antocianinas coexisten en equilibrio en cuatro formas diferentes. Las condiciones de pH cambian este equilibrio hacia una variedad de formas estructurales, con las consecuencias directas de los cambios de color de estos pigmentos (Brat *et al.*, 2007; Francis & Markakis, 2009).

Esta capacidad de las antocianinas de cambiar de color de manera dramática con cambios en la acidez, ha llevado a diversos investigadores a iniciar estudios sobre la estructura de las antocianinas desde hace casi 90 años. Se estudiaron la cinética y los equilibrios de las cuatro especies de antocianina que existen en solución acuosa (ver figura 6). El catión flavilio es de color rojo, es la forma más estable y predominante a valores de pH por debajo de 4; la pseudobase carbinol, es incolora; la base chalcona, es de color amarillo pálido o incolora; y la base quinoidal es púrpura pálido o azul (Brat *et al.*, 2007; Francis & Markakis, 2009; Gould *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

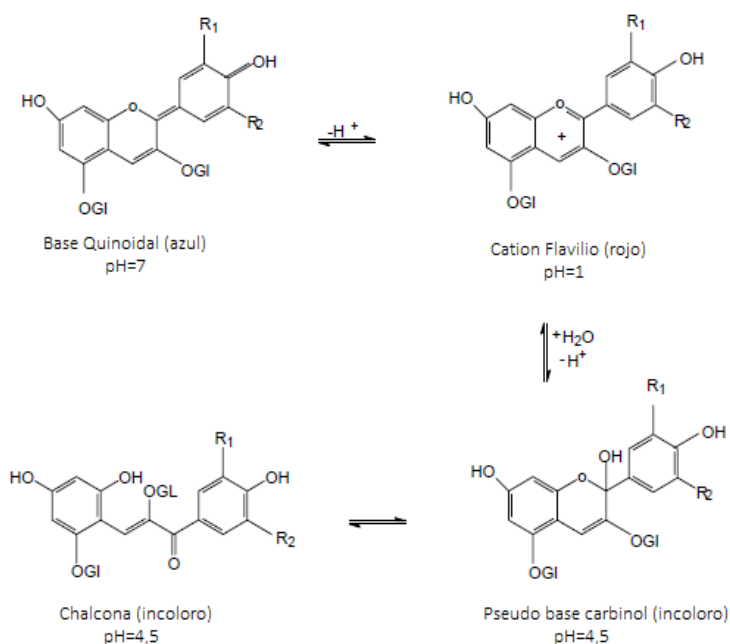


Figura 6. Estructura de la antocianina a diferentes pH (Adaptado de Quintero, 2004).

Los efectos del pH en condiciones modelo (de 0,6 a 5,5) fueron cubiertos por Nielsen *et al.* (2003) para cuatro antocianinas (3-o-glucósido, cianidina glicosilada, rutinósido y delphinidina rutinósido). Después de 24 horas, más del 90% de las antocianinas estaban intactos hasta pH 3,3, mientras que aumentó en gran medida la inestabilidad a un pH mayor que 4,5 (Brat *et al.*, 2007).

Al mismo tiempo que su estructura de catión flavilio le confiere inestabilidad, la molécula de antocianina posee propiedades hidrófilas a través de los grupos hidroxilo en las terminaciones de azúcares, en partes de su estructura y en los grupos acilo que posee. Estos grupos hidroxilo tienen una alta capacidad de formar enlaces de hidrógeno, lo que también contribuye a esta inestabilidad ante cambios del pH del medio (Francis & Markakis, 2009; Andersen & Jordheim, 2013).

3.3.1.2 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura sobre los pigmentos y colorantes, ha sido bien estudiado debido a su evidente importancia dentro de la calidad e inocuidad de los alimentos. Generalmente, se ha observado que a altas temperaturas se da una rápida disminución del pigmento y/o colorante; por ejemplo, algunos estudios informan una vida media de sólo 1 h para los pigmentos en una conserva de fresa a 100 °C (Mercadante & Bobbio, 2007; Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

En las investigaciones realizadas, se ha encontrado una relación logarítmica de primer orden entre la temperatura y la destrucción de las antocianinas, durante un tiempo de calentamiento a una temperatura constante. Sin embargo, el mecanismo de degradación de la antocianidina no se entiende completamente. Se ha observado que temperaturas más altas desplazan el equilibrio hacia la formación de la pseudo base carbinol y la forma chalcona (formas incoloras, ver figura 6), obteniendo una pérdida resultante de color (Mercadante & Bobbio, 2007; Francis & Markakis, 2009).

Afortunadamente, en frío y la acidificación, la base quinoidal y la pseudobase carbinol son fácilmente convertidos de nuevo a la forma catiónica (catión flavilio); la forma de chalcona también se reconvierte, pero el cambio es mucho más lento. La lentitud de la reconversión chalcona puede tener implicaciones en los datos cuando se realiza estudios de degradación de alta temperatura en

corto tiempo, por lo que se debe considerar que, si las condiciones de análisis no permiten reestablecer equilibrios, los datos pueden ser inexactos (Francis & Markakis, 2009; Gould *et al.*, 2009).

Se ha observado en estudios que cianidina 3-glucósido y cianidina 3-rutinósido fueron degradados a 100 °C en soluciones ácidas débiles en el rango de pH de 1 a 4. Sin embargo, también encontraron que el colorante secado por aspersión se mantuvo estable al calor (Mercadante & Bobbio, 2007).

3.3.1.3 Efecto de la luz

En diferentes estudios se ha demostrado como los efectos de la luz sobre soluciones que contienen antocianinas, es generalmente perjudicial. Los monoglucósidos tales como: cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido son menos estables y los diglucósidos no acilados presentan una estabilidad intermedia (Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Durante el estudio de los colorantes extraídos de la uva e incorporados en la formulación de una bebida carbonatada, se demostró un aumento de la degradación cuando estos eran expuestos a la luz. Las bebidas almacenadas a 20 °C en oscuridad la vida media fue de 416 días y la obtenida en los ensayos expuestos a la luz del día fue de solo 197 días (Francis & Markakis, 2009).

La degradación del pigmento, el desarrollo del color, la claridad e inestabilidad a la luz en los refrescos puede ser minimizada, mediante la adición de ácido gálico, dímeros de ácido gálico, ácido tánico, flavonas o flavonoles. También la adición de compuestos sulfonados o que contienen azufre puede aumentar la fotoestabilidad de antocianinas, este efecto se atribuye al enlace que se forma entre el sulfonato de carga negativa y la estructura flavilio deficiente en electrones; este efecto se observó en un refresco de uva que contenía cianidina-3- rutinósido, el cual se hizo más estable a la luz al añadir quercetina-5-sulfonato (Francis & Markakis, 2009).

3.3.1.4 Efecto de la concentración

Se ha encontrado que un aumento en la concentración de las antocianinas ha mejorado en gran medida la estabilidad del color en un jarabe de fresa. Además, se observó que la concentración total de antocianinas era más importante en relación con la estabilidad del color de los diferentes tipos de antocianinas individuales (Cavalcanti *et al.*, 2011).

En general, los cambios de color son dependientes del disolvente y la concentración de antocianinas. Por lo tanto, el agua juega un papel fundamental en la dimerización de sales de flavilio debido al hecho de que estas moléculas requieren neutralizar sus propias repulsiones electrostáticas con las moléculas de agua por lo que la dimerización puede llevarse a cabo (Castañeda *et al.*, 2009).

3.3.1.5 Efecto del oxígeno y ácido ascórbico

La pérdida de antocianinas ante la presencia de oxígeno depende del pH y se relaciona con la concentración presente de la pseudo-base. El oxígeno amplifica el impacto en procesos de degradación de antocianinas, y junto a la presencia de ácido ascórbico favorecen la pérdida de las antocianinas (Cavalcanti *et al.*, 2011).

La retención de color es mejorada cuando el oxígeno es removido (puede ser por calentamiento, por vacío o por flujo de nitrógeno). Esta eliminación de oxígeno protege contra la degradación térmica, pues algunos investigadores han llegado a demostrar que una atmósfera de oxígeno restringida permite mejorar la capacidad antioxidante inicial y el contenido de antocianinas en fresas frescas almacenadas en frío (Quintero, 2004; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Algunos autores han informado que la presencia de oxígeno, junto con la temperatura elevada, era las combinaciones más perjudiciales de muchos factores ensayados contra el deterioro del color tanto en los jugos como en las antocianinas aisladas, catalogados como los “agentes aceleradores más específicos” (Quintero, 2004; Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han identificado dos mecanismos mediante los cuales el ácido ascórbico puede aumentar la velocidad de degradación de antocianinas, el primero consiste en la condensación directa del ácido ascórbico en el carbono 4 de la molécula de antocianina, causando la pérdida de ambos. El segundo es por la ruptura oxidativa del anillo de pirilo, donde el ácido

ascórbico actúa como un activador de oxígeno molecular, produciendo radicales libres (Bobbio & Mercadante, 2008; Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti et al., 2011).

Durante un estudio de la estabilidad del color del jarabe de fresa con y sin la fortificación de antocianinas de grosellas negras (cianidina y delphinidina 3-glucósidos y 3-rutinósidos) y con niveles equivalentes de ácido ascórbico, se observó mayor estabilidad en las muestras fortificadas y una disminución de la estabilidad con la adición de ácido ascórbico (Bobbio & Mercadante, 2008; Cavalcanti et al., 2011).

La interacción de ácido ascórbico y el oxígeno puede ser mediada por el H_2O_2 , debido a que uno de los mecanismos de oxidación del ácido ascórbico produce peróxido, y el peróxido puede blanquear las antocianinas. Además, se informó que el ácido dehidroascórbico también podría decolorar las antocianinas, pero a un ritmo más lento que el ácido ascórbico (Francis & Markakis, 2009).

3.3.1.6 Efecto de los azúcares

El efecto de la adición de azúcar en la estabilidad de antocianinas depende de la estructura, concentración y tipo de azúcar. Se ha observado como una baja concentración de azúcar, menor a 20%, podía tener un efecto protector sobre el contenido de antocianinas y la calidad del color, pero al aumentar la concentración de azúcares este efecto se reduce y da lugar a la degradación (Bobbio & Mercadante, 2008; Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti et al., 2011).

Tanto los azúcares, como sus productos de degradación son conocidos por disminuir la estabilidad de las antocianinas y pueden reaccionar por mecanismos de Maillard. Los estudios han exhibido que la tasa de degradación del pigmento está asociada con la velocidad a la que se degrada el azúcar, cuando se forman compuestos marrones (Bobbio & Mercadante, 2008; Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti et al., 2011).

3.3.1.7 Otros efectos

Se ha observado que algunos compuestos pueden tener un efecto sobre la estabilidad de las antocianinas en condiciones de almacenamiento. Este es el caso de los sulfatos y sulfitos que son utilizados en el almacenamiento de frutas, estos compuestos son responsables de producir decoloración en las antocianinas (Bobbio & Mercadante, 2008; Cavalcanti et al., 2011).

El efecto ocurre debido a la adición de estos compuestos en los carbonos de las posiciones 2 o 4 con la formación de estructuras incoloras derivadas de azufre. La reacción es reversible, el color puede ser regenerado por acidificación y calentamiento del producto. Sin embargo, altas concentraciones mayores de 10 g de sulfitos por kg, pueden causar la destrucción irreversible de las antocianinas (Cavalcanti et al., 2011).

Por otra parte, se ha observado que el dióxido de azufre, EDTA, y una combinación de dióxido de azufre y EDTA ejerce pequeños efectos sobre las pérdidas de antocianinas en purés y jugos de fresa durante 10 semanas de almacenamiento a -20 °C (Bobbio & Mercadante, 2008).

3.3.2 Mecanismos de estabilización de antocianinas

3.3.2.1 Encapsulación

La encapsulación es una tecnología dirigida hacia la inmovilización e incorporación (atrapamiento) de un compuesto biológicamente activo dentro de las partículas sólidas (micro esferas) o vesículas de un líquido con el fin de estabilizar la estructura y proteger el compuesto activo (Cavalcanti et al., 2011).

Este mecanismo facilita que moléculas, tales como: antocianinas y carotenoides puedan mantener su estabilidad y mejorar su vida útil. En general, se ha observado como la encapsulación ha incrementado la estabilidad de las antocianinas con independencia de la técnica utilizada, en contraste el grado de estabilización parece estar directamente relacionada con la técnica empleada y las condiciones de encapsulación (Ersus y Yurdagel, 2007; Cavalcanti et al., 2011; Pagani et al., 2012).

Se ha estudiado diferentes técnicas de encapsulación con diferentes materiales de revestimiento como, por ejemplo: el uso de maltodextrina, beta-ciclodextrina, quitosano, acetato de celulosa, alginato de sodio, pectina, curdlan y otros polímeros naturales; en combinación con técnicas de encapsulación, tales como secado por aspersión, secados alternativos, secado en condiciones suaves, formación de micro-nanocápsulas homogéneas, técnicas de fluidos supercríticos, ultrasonido, entre otros. Sin embargo, la técnica más común aplicada para la encapsulación de antocianinas es el secado por aspersión con maltodextrinas como material de revestimiento (Cavalcanti et al., 2011; Pagani et al., 2012).

Es decir, las técnicas de encapsulación son una forma efectiva de estabilización de antocianinas, en el que el efecto protector de encapsulación tiene muchas ventajas, no sólo en la estabilidad del compuesto que impiden posibles interacciones físicas o químicas con el ambiente externo asegurando con ello una mejor calidad y una mayor vida útil, sino también en la creación de una gama de posibles aplicaciones industriales. Sin embargo, este método de estabilización tiene algunos inconvenientes como el requisito de equipos sofisticados y alto porcentaje de pérdidas en el proceso (Cavalcanti *et al.*, 2011).

3.3.2.2 Copigmentación

La copigmentación es la interacción electrónica planar en los grupos cromóforos de las antocianinas. Es formada preferiblemente bajo condiciones ácidas y pueden aumentar la estabilidad de antocianinas, afectar su color y mejorar sus propiedades antioxidantes. Por ejemplo, este fenómeno puede hacer que el color de las antocianinas en una planta sea más azul, más brillante y más estable debido a la interacción entre las sustancias orgánicas y antocianinas (Del Pozo-Insfran *et al.*, 2004; Quintero, 2004; Brenes *et al.*, 2005; Jing & Giusti, 2005; Bordignon *et al.*, 2007; Francis & Markakis, 2009).

Los copigmentos son sistemas ricos en electrones que son capaces de asociarse con iones de flavilio, que son más bien pobres en electrones. Su papel básico es proteger el catión flavilio del ataque nucleófilo de la molécula de agua, en la posición 2 del ion flavilio y de otras especies tales como peróxidos y dióxido de azufre en la posición 4 (Bordignon *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2007; Bobbio & Mercadante, 2008; Castañeda *et al.*, 2009; Mulinacciand & Innocenti, 2012).

La copigmentación resultante se basa en dos efectos: (1) la formación del complejo π - π que causa cambios en las propiedades espectrales de las moléculas, específicamente en el ion de flavilio que aumenta la intensidad de absorción y su longitud de onda (desplazamiento batocrómico); y (2) la estabilización de la forma de flavilio que desplaza el equilibrio de tal manera que el color rojo aumenta, y puede afectar principalmente a dos atributos de color, croma y luminosidad. Por lo tanto, la magnitud del efecto de copigmentación es pH dependiente, debido a valores bajos de pH, todas las moléculas de antocianina están en forma de flavilio, y a valores altos de pH, la antocianina está en su forma carbinol pseudobase, que es incoloro (Gris *et al.*, 2007; Castañeda *et al.*, 2009).

La interacción antocianina-copigmento puede llevarse a cabo de diversas formas dependiendo de las especies que interactúan (ver Figura 7), por ejemplo, existe autoasociación cuando dos o más moléculas de antocianina se asocian, copigmentación intramolecular donde el copigmento es parte de la molécula de antocianina, copigmentación intermolecular donde la antocianina está vinculada con una sustancia incolora, la interacción con un metal, por ejemplo aluminio o cobre, y por último, en el caso más complejo, la copigmentación con sales inorgánicas (Giusti & Wrolstad, 2003; Castañeda *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011; Mulinacciand & Innocenti, 2012; Fischer *et al.*, 2013).

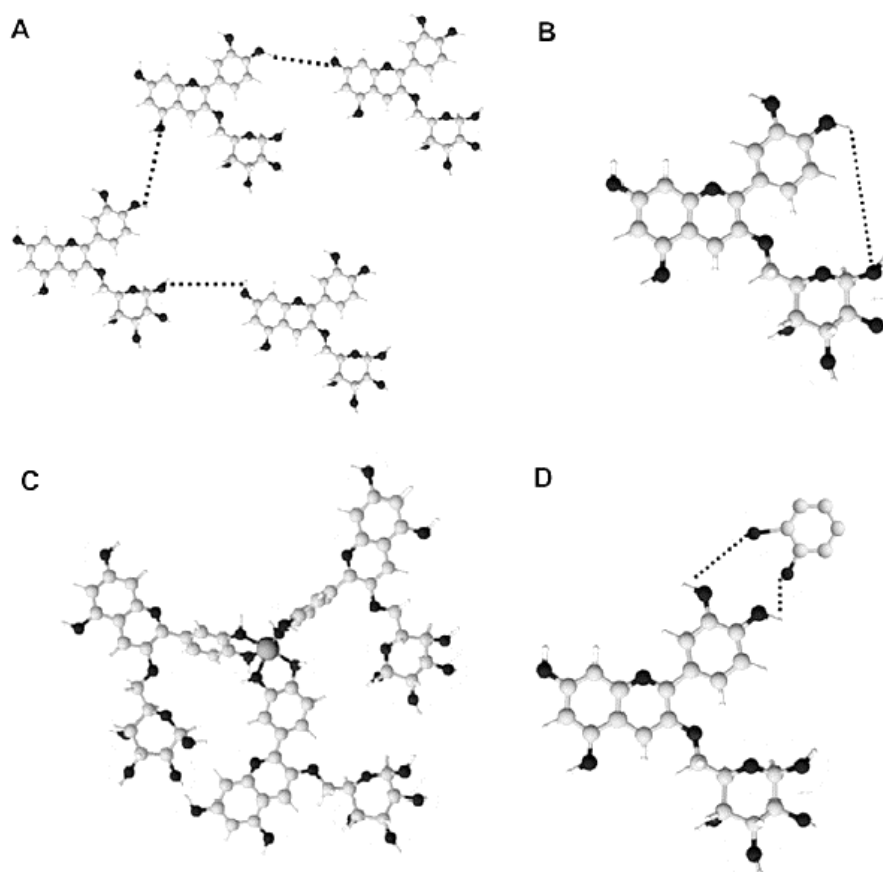


Figura 7. Efecto de la copigmentación en la interacción de las antocianinas: **(A)** autoasociación, **(B)** copigmentación intramolecular, **(C)** complejo con metal, **(D)** copigmentación intermolecular (Adaptado de Castañeda *et al.*, 2009).

El mecanismo de auto-asociación, es decir, cuando dos o más moléculas de antocianina están asociadas, es análogo a las interacciones de apilamiento vertical donde las moléculas de antocianinas se forman y estabilizan principalmente a través de las interacciones con grupos hidrófobos entre sus núcleos aromáticos. Este efecto se verificó, en una prueba donde se aumentó la concentración de cianidina 3,5-diglucósido, y se observó el consiguiente desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de máxima absorción en el espectro, estabilizando y mejorando el color de la antocianina (Bobbio & Mercadante, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Por otro lado, la copigmentación intermolecular es la interacción entre una antocianina y un copigmento incoloro, que no está unido covalentemente a la molécula de antocianina. La interacción se da por fuerzas de Vander Waals, interacción hidrofóbica u otras interacciones iónicas (Bobbio & Mercadante, 2008; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Los mejores cofactores son típicamente compuestos que contienen muchos grupos hidroxilo, tales pueden ser flavonoides (quercetina y rutina), alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, polisacáridos y nucleótidos, entre otros (Gris *et al.*, 2007; Bobbio & Mercadante, 2008; Castañeda *et al.*, 2009; Francis & Markakis, 2009).

En cuanto la copigmentación intramolecular, está implica principalmente las formas aciladas de las antocianinas en el que uno o dos restos de azúcar muestran un enlace éster con ácidos cinámico, incluyendo p-cumárico, cafeico, ferúlico, sinápico, gálico, ácidos p-hidroxibenzoico, grupos aromáticos y otros flavonoides (Brat *et al.*, 2007; Mulinacciand & Innocenti, 2012).

Se ha estudiado la influencia de la copigmentación de ácido pirúvico con cuatro antocianinas (cianidina-3-o-glucósido, cianidina-3-o-rutinósido, cianidina-3-o-sambubiósido, cianidina-3-o-soforósido), se encontró que a pH 1-2, se presentó una pérdida de saturación ($C^* < 0$) y un aumento de la luminosidad de la solución de ($L^* > 0$); es decir, una pérdida de color en comparación con soluciones que solo tenían el pigmento, en las mismas condiciones de pH y de concentración. Sin embargo, para pH 5 a 7, se observó el fenómeno inverso, con las soluciones que tenían el copigmento se obtuvo más color que el control. Por lo tanto, el comportamiento especial de estos copigmentos de acuerdo con el pH puede influir directamente en su aplicación en la industria alimentaria (Brat *et al.*, 2007).

3.3.2.3 Efecto de los metales

En cuanto a los metales, las antocianinas son muy reactivas frente a los metales por lo que han sido una preocupación dentro de los procesos de alimentos a causa de consideraciones de embalaje, contaminación en líneas de proceso, la presencia normal de metales en los productos o debido a la adición deliberada de sales a los alimentos (Francis & Markakis, 2009).

Esta capacidad de las antocianinas para interactuar con metales formando nuevos compuestos es muy relevante para la estabilidad del color en solución ya que se ha considerado como el primer paso en la formación de nuevos pigmentos derivados de antocianinas (Gould *et al.*, 2009). Se ha observado que, algunos cationes di y trivalentes pueden formar complejos débiles con antocianinas, causando desplazamientos batocrómicos de las longitudes de onda de máxima absorción, reflejado a través de un cambio de color o efecto "azulado" (Francis & Markakis, 2009; Gould *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Las antocianinas pueden formar complejos con estaño, aluminio, cobre e hierro, por ejemplo, se ha observado que cianidina-3-o-glucósido forma un complejo de color estable en presencia de iones de aluminio a un pH de 5,5; y con quelatos de hierro, aluminio y estaño, el pH es crítico (pH 3,0 a 3,5) ya que un cambio de pH de sólo 0,1 unidad puede cambiar el color de rojo a azul. Por otro lado, en investigaciones se observó que iones de metal bivalente como cobalto, níquel, calcio, magnesio o bario no forman complejos con cianidina 3,5-diglucósido, en el intervalo de pH 4 a 6; pero en otras condiciones el Ca, Cu y Fe son capaces de complejar y estabilizar la cianidina (Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Mientras que los quelatos, formados con estaño, titanio, cromo, uranio, plomo, hierro, estaño, y complejos de aluminio son relativamente estables y muestran un color azul profundo. En algunos estudios se ha estabilizado el color de puré de fresa mediante la adición de sales de estaño, pero una decoloración de color rosa similar se observó con el sauerkraut producido por la contaminación de los productos con metal proveniente de la lata en que era empacado. También, se ha logrado mejorar la estabilidad del color de la cereza amarga, uva y zumos de fresa mediante la adición de sales de aluminio y estaño (Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

La relativamente buena estabilidad de los complejos de metal de antocianina ha llevado a la sugerencia de que sean utilizados como colorantes, pues pueden provocar una variación de color

estable con efecto positivo o negativo. La quelación de metales representa una forma importante de estabilización de las antocianinas presentes en los productos derivados de frutas tales como zumos y vinos; y cuyo enriquecimiento con metales puede corresponder a un aumento del valor agregado, así como un mecanismo de estabilización química para garantizar la calidad nutricional y sensorial de los productos (Francis & Markakis, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

3.4 Aplicaciones de colorantes naturales en alimentos

Debido a la transformación de las antocianinas al experimentar cambios en el pH, su aplicación en sistemas para la alimentación suele realizarse en alimentos ácidos ($\text{pH} < 3$), para asegurar un predominio del catión flavilio. Esta estructura le da la capacidad para resistir a la hidratación, y por lo tanto le confiere mayor estabilidad de color ante cambios de pH, exhibiendo la coloración de ácido débil, neutro o de soluciones ligeramente alcalinas (Giusti & Wrolstad; 2003).

Dentro de la gama de productos lácteos se ha evaluado la viabilidad de utilizar antocianinas aciladas a partir de fuentes comestibles para dar color a productos como el yogur y la crema agria, con niveles de pH cercanos a 4,2-4,5. En este caso fueron evaluados los extractos de rábano rojo, zanahoria y la uva, los resultados mostraron que el rábano y zanahoria solos o en combinación podría proporcionar color rojo deseable a estos sistemas en concentraciones tan bajas como de 5 mg de antocianina por 100 g de muestra (Giusti & Wrolstad; 2003; Bordignon-Luiz *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2007; Hassani & Sharifi, 2012).

Por otra parte, en algunos estudios utilizaron las antocianinas extraídas de la uva para ser aplicadas en yogur almacenado a 4 °C, observándose que el enrojecimiento disminuyó y su amarillez aumentó en un período desde 12 horas hasta 45 días, concluyendo que estos pigmentos tienen la estabilidad adecuada y podrían aplicarse comercialmente (Giusti & Wrolstad; 2003; Bordignon-Luiz *et al.*, 2007; Gris *et al.*, 2007; Hassani & Sharifi, 2012).

También se aplicaron extractos de antocianinas provenientes de la uva en diferentes productos, evaluando la estabilidad a lo largo del tiempo. Se aplicó el extracto en un postre lácteo almacenado a 4 °C durante un período de 10 días y se observó como el enrojecimiento disminuyó y su amarillez aumentó; mientras que, al evaluarlo en gelatina conservada a 4 °C, el parámetro L* de luminosidad decreció y la proporción de rojo a amarillo disminuyó. De igual forma se aplicó en dos

versiones de helado, duro y suave, almacenados a -21 °C; en el caso del helado duro se presentó una disminución en el enrojecimiento del producto que se debe a la destrucción de las antocianinas; y en el helado suave, se observó un incremento de L* claridad; y se hizo más oscuro y se hizo menos rojo (Hassani & Sharifi, 2012).

Además, se han realizado estudios aplicando otros extractos de antocianinas en la leche descremada, en leche entera y en queso. Se observaron resultados satisfactorios, encontrando que estos extractos fueron estables durante 173 y 223 minutos a 70 °C, en el caso de la leche y de hasta un período de 40 días en el caso del queso (Prudencio et al., 2008; Jing & Giusti, 2015).

Es importante señalar que la vida útil de estos productos lácteos es de sólo unas pocas semanas bajo refrigeración, y estas condiciones favorecen la estabilidad de estos pigmentos naturales, por lo tanto, se convierten en alternativas viables. Sin embargo, también se descubrió que el contenido de grasa tiene un efecto sobre las características de color, lo que sugiere que el contenido de grasa puede afectar a la copigmentación y apilamiento de los pigmentos de antocianina (Giusti & Wrolstad; 2003).

Por otra parte, se han encontrado algunos estudios que han realizado mediciones en la gama de productos dulces y azucarados. Por ejemplo, se ha realizado mediciones de color en un jarabe de cerezas, encontrando que las antocianinas extraídas de rábanos rojos imparten el color rojo, muy cercano al obtenido por FD&C Rojo No. 40 a pH de 3,5. El color y la estabilidad del pigmento eran evaluados durante un año de almacenamiento en la oscuridad a 20 °C, y la vida útil encontrada fue de 29 a 33 semanas, muy similar a la encontrada con el FD&C Rojo No.40 de 24 semanas (Giusti & Wrolstad; 2003).

Igualmente, se observó la aplicación de un extracto de antocianinas en mermelada de fresa, almacenada a 20 °C y 4 °C, donde sólo se obtuvieron pequeñas diferencias en el parámetro de medición de color b* y de claridad L*, después de 24 semanas de almacenamiento independiente de las condiciones (Holzwarth *et al.*, 2013).

En cuanto a la aplicación en sistemas de bebidas, en algunos estudios evaluaron diferentes extractos de antocianinas provenientes del rábano y de las papas púrpuras, que fueron comparados con FD & C Rojo No.40, en una bebida a 25 °C. En el primer caso, se comparó ambos pigmentos y se obtuvo una mayor estabilidad para los jugos que contenían extracto de rábano con 22 semanas de

vida media en comparación con 11 semanas de vida media para las muestras que tenían extracto de papa. En el segundo caso, se aplicó el extracto obtenido de la papa púrpura en diferentes jugos de frutas: manzana, pera, naranja, mandarina, kiwi y limón, que fueron sometidos a un calentamiento entre 80-100 °C. Se observó mayor estabilidad en los jugos de manzana y pera, y una menor estabilidad en el jugo de limón (Giusti & Wrolstad, 2003; Li *et al.*, 2013).

Asimismo, se ha evaluado extractos de antocianinas obtenidos de la acerola y de açai, en una bebida isotónica de pH 2,5. Se logró verificar la degradación gradual del color rojo durante el almacenamiento de todos los sistemas, acompañado con una disminución de la intensidad del color y cambios de tonalidad de rojo a amarillo, después de aproximadamente 5 y 300 h de almacenamiento bajo la luz. En un modelo de sistema de bebida rehidratada con extracto de antocianinas de uva, se logró mejorar la estabilidad del color de los pigmentos aumentando el tiempo de vida media a 7 días, en relación con las muestras control a 4 °C (Bordignon-Luiz *et al.*, 2007; De Rosso & Mercadante, 2007).

3.5 Cinética química en alimentos

La cinética química trata principalmente del estudio de la velocidad de una reacción, considerando todos los factores que influyen sobre ella y explicando la causa de la magnitud de esa velocidad, esta magnitud permite a su vez conocer sobre la estructura molecular y la fuerza relativa de los enlaces químicos. Por reacciones se entiende a todo tipo de cambio que está teniendo lugar en los alimentos ya sean químicos, enzimáticos, físicos o microbiano. Por lo tanto, la cinética química estudia la velocidad con la que se da éste cambio (Tojo, 1990; Van Boekel, 2009).

La cinética permite conocer con que velocidad se desarrolla y se aproxima al equilibrio, así como cuáles serán las contribuciones cuantitativas de cada uno de los factores que influyen en la velocidad. Este seguimiento y determinación del valor de la velocidad con que un sistema químico evoluciona puede realizarse desde dos puntos de vista complementarios. El primero responde al enfoque académico, tiene un carácter relacionado directamente con la estequiometría del sistema. El segundo tiene un carácter más práctico y realista al responder con un único valor correspondiente a la velocidad de cambio de la composición de un compuesto y corresponde a la variación del número de moles de ese compuesto con el tiempo (Tojo, 1990; Izquierdo *et al.*, 2004).

En la siguiente reacción: $A \rightarrow B + C$. La concentración del reactivo decrece mientras que las concentraciones de B y C aumentan, la velocidad de esta reacción en cualquier instante t viene dada por la pendiente de la curva en dicho tiempo t :

$$Velocidad = \frac{[dA]}{dt} \quad [1]$$

Es decir, la velocidad de reacción es igual a la velocidad de decrecimiento de la concentración de A con el tiempo. La velocidad de una reacción química viene así expresada como una velocidad de descomposición o desaparición de un reactivo o la velocidad de formación de un producto (Avery, 1982; Tojo, 1990).

Generalmente, la velocidad de reacción depende de la temperatura, de la composición del sistema (reactivos, productos, catalizadores, disolvente, entre otros) y de la presión. A temperatura constante, la velocidad es, de este modo, función sólo de las concentraciones de las especies presentes (Tojo, 1990; Izquierdo *et al.*, 2004).

Sin embargo, la velocidad de reacción cambia durante el transcurso de la reacción. La velocidad que es inicialmente máxima, decrece a medida que transcurre la reacción; y se ha encontrado que, así como la concentración A en la reacción decrece, también lo hace la velocidad de la reacción, por lo tanto, se trata de encontrar un modelo aceptable que sea capaz de describir y explicar las observaciones experimentales y hacer predicciones, para lo cual se utiliza la ley de velocidad que se muestra a continuación (Van Boekel, 2009):

$$r = -\frac{d[A]}{dt} = k * [A]^n \quad [2]$$

Donde n es una constante conocida como orden de reacción, k es una constante para cada reacción a cada temperatura y se llama constante de velocidad. La ecuación de velocidad [2], establece que, la velocidad de una reacción varía con la concentración de los reactivos, la velocidad de una reacción no depende de la concentración de los productos (Avery, 1982; Tojo, 1990; Van Boekel, 2009).

Existen dos posibilidades para utilizar la ecuación [2] para su posterior análisis cinético. El primero es el denominado método de diferencial, donde las tasas se miden como una función de la concentración, y se puede estimar directamente el valor de k y n , por regresión no lineal o mediante el logaritmo de la ecuación como se observa a continuación (Van Boekel, 2009):

$$\log r = \log k + n \log A \quad [3]$$

El segundo método es el llamado método integral donde la ecuación [2] está ahora integrada con respecto al tiempo para obtener el curso de la concentración en función del tiempo, como se observa a continuación:

$$A_t = (A_o^{1-n} + (n-1)k t)^{\frac{1}{1-n}} \quad [4]$$

Equivalente a,

$$[A]_t = [A]_o \exp(-kt) \quad \text{para } n=1 \text{ (reacción de primer orden)} \quad [5]$$

O en forma logarítmica,

$$\text{Ln}[A] = \text{Ln}[A]_o - kt \quad [6]$$

El orden de la reacción n es determinado experimentalmente, si en la reacción anterior se encuentra que la velocidad es directamente proporcional a la concentración de A, se dice que la reacción es de primer orden, es decir, $n=1$, y si se encuentra que la velocidad depende del cuadrado de la concentración de A, se dice que la reacción es de segundo orden. La constante de velocidad de reacción k y el orden de reacción n son importantes porque se pueden derivar de forma experimental, y en base a sus valores se puede empezar a construir modelos mecánicos (Avery, 1982; Tojo, 1990; Izquierdo et al., 2004; Van Boekel, 2009).

Un parámetro que se utiliza con frecuencia en combinación con una reacción de primer orden es el Tiempo de Reducción a la Mitad, conocido como $t_{1/2}$, y equivale al tiempo necesario para que se de una reducción a la mitad de la concentración del reactivo. Un efecto típico para el tiempo de reducción a la mitad de una reacción de primer orden es que es independiente de la concentración (Van Boekel, 2009). La ecuación se observa a continuación:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{k} \quad [7]$$

En cuanto, a la constante de proporcionalidad k , coeficiente cinético o constante de velocidad, es independiente de las concentraciones, pero varía significativamente con la temperatura. Para muchas reacciones (en particular todas las elementales) y en intervalos de temperatura no muy elevados, se ha observado experimentalmente que la constante de velocidad aumenta con la temperatura y que al representar gráficamente el logaritmo neperiano del valor de la constante de velocidad frente al inverso de la temperatura se obtiene aproximadamente una

línea recta. Este comportamiento puede ser descrito mediante la denominada ecuación de Arrhenius,

$$k = A * \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad [8]$$

En la cual R es la constante de los gases en (J/mol*K) y T es la temperatura absoluta en K. A es el denominado factor pre-exponencial o factor de frecuencia cuyas unidades son idénticas a las de k y E_a es la energía de activación, cuyas unidades en el SI son (J/mol). Esta última magnitud está relacionada con las necesidades energéticas para que la reacción tenga lugar. Una reacción con un valor elevado de E exigirá temperaturas altas para que se produzca con una velocidad significativa (Tojo, 1990; Izquierdo *et al.*, 2004; Melgar *et al.*, 2008; Van Boekel; 2009).

La ecuación de Arrhenius resume las predicciones de las versiones más sencillas de las distintas teorías sobre la variación del coeficiente cinético con la temperatura, constituyendo una buena aproximación para la dependencia de la temperatura, aplicable tanto a la teoría de transición como a la de colisión (Tojo, 1990). Puesto que el efecto de la temperatura sobre la velocidad de reacción viene dado por la energía de activación y por el nivel de temperatura, se deduce lo siguiente:

- Si se cumple la ecuación de Arrhenius, representando $\ln k$ frente a $1/T$ se obtiene una recta de pendiente grande si E_a es grande, y pendiente pequeña si E_a es pequeña.
- Las reacciones con energía de activación grande son muy sensibles a la temperatura; las reacciones con energías de activación pequeñas son muy poco sensibles a la temperatura.
- El efecto de la temperatura sobre una reacción es mucho mayor a temperatura baja que a temperatura alta. (Tojo, 1990).

Es posible reparametrizar la ecuación de Arrhenius, al introducir una temperatura de referencia “ T_{ref} ”. La base para esto surge de la aplicación de la ecuación (8) a dos temperaturas “ T_1 ” y “ T_2 ”, en el supuesto de que el factor pre-exponencial y E_a no dependen de temperatura.

$$\frac{k}{k_{ref}} = \exp\left(-\frac{E_a}{R}\left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad [9]$$

El resultado real de esto es que el factor pre-exponencial se sustituye por una constante de velocidad a alguna temperatura de referencia. La temperatura de referencia preferiblemente debe

ser elegida entre las temperaturas estudiadas. Sin embargo, se debe ser consciente de que las constantes pueden no reflejar una única barrera de energía, sobre todo en los alimentos en los que es difícil de estudiar las reacciones elementales (Tojo, 1990; Van Boekel; 2009).

3.6 Teoría de la medición del color

Según el diccionario de la Lengua Española (RAE), el color es la sensación producida por los rayos luminosos que impresionan los órganos visuales y que depende de la longitud de onda. Numerosos estudios efectuados a lo largo del siglo pasado han demostrado que el cerebro humano, cuando compara colores, lo hace usando directamente los atributos perceptuales de tono, claridad y colorido. Cada uno de ellos fue definido desde 1931 por la CIE (Comisión Internacional de la Iluminación), institución responsable de las recomendaciones internacionales para la fotometría y colorimetría (Socaciu & Diehl, 2008).

Bajo la dirección de la CIE, varios sistemas de descripción de color han sido desarrollados y determinan los procedimientos utilizados en la actualidad:

- CIE XYZ
- CIE L*a*b*
- CIE L*C*h*

Por definición, cualquier color puede ser descrito por una combinación de X, Y, y Z. Estas especificaciones se realizan siempre en relación con la luminosidad de un objeto blanco perfecto, donde la Y para el blanco perfecto es siempre 100. Sin embargo, desde 1958 se empezó a utilizar el sistema de Hunter Lab, el cual fue el primer sistema que utiliza la teoría color oponente que establece que el espacio de color es rectangular en tres dimensiones, en la que L* (luminosidad) varía de 0 (negro) a 100 (blanco), a* (eje rojo-verde) con valores positivos (rojo) y los valores negativos (verde), y b* (eje amarillo-azul) con valores negativos (azul) y positivos (amarillo), estos valores se calculan a partir de los valores de triple estímulo (X, Y, y Z), que son la columna vertebral de todos los modelos de color matemáticos (Kheng, 2002; Good, 2004; Socaciu & Diehl, 2008).

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad [10]$$

$$a^* = 500 \left[\left(\frac{X}{X_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} \right] \quad [11]$$

$$b^* = 200 \left[\left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - \left(\frac{Z}{Z_n} \right)^{1/3} \right] \quad [12]$$

Posteriormente, con la aparición del sistema CIE LCh (1976) se logra estandarizar estrictamente la fuente de luz y el observador. $L^* C^* h^*$, son las coordenadas de color utilizadas y se derivan de L^* , a^* y b^* , pasando de un sistema de coordenadas rectangulares a un sistema de coordenadas cilíndricas en formato tridimensional (Lauro & Johnson, 2005; Socaciu & Diehl, 2008; Montecinos, 2013).

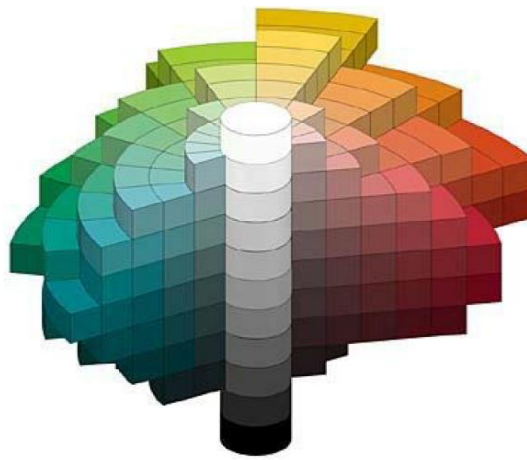


Figura 8. Esquema o sólido tridimensional de la percepción humana de los colores. (Adaptado de Montesinos, 2013).

$$L^* = 116 \left(\frac{Y}{Y_n} \right)^{1/3} - 16 \quad [13]$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad [14]$$

$$h^* = \arctan \left(\frac{b^*}{a^*} \right) \quad [15]$$

Como se observa en la figura 8, la claridad se relaciona con el eje central (arriba-abajo), el tono es el giro, y el colorido indica la separación respecto al eje central. El valor L^* es el mismo que el valor L^* en el espacio CIELAB, y representa la ligereza plana en el que reside el color. El valor C^* es el vector de distancia calculada desde el centro del espacio de color al color medido y h^* son las medidas hue o tono (Master Color Control, 2002; Socaciu & Diehl, 2008; Montesinos, 2013).

Claridad o luminosidad (L^*) es el atributo que permite evaluar la sensación visual claro-oscuro de un color. Los colores pueden ser clasificados como tenues u oscuros al comparar sus valores. Por ejemplo, cuando se colocan lado a lado un tomate y un rábano el rojo del tomate parece ser mucho más tenue, en contraste con el rábano que tiene un valor de rojo más oscuro. En la figura 9 se representa la claridad o luminosidad en el eje vertical (Master Color Control, 2002; Montesinos, 2013).

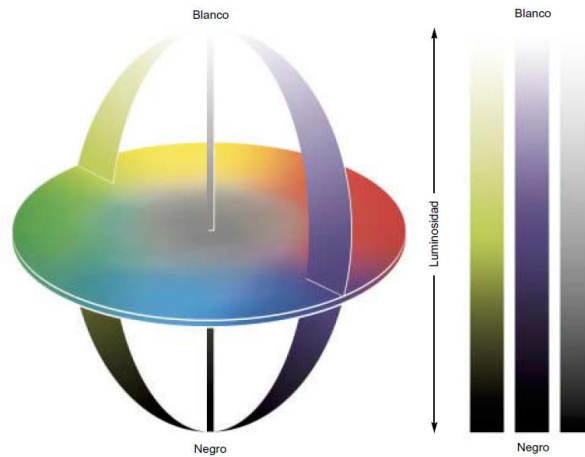


Figura 9. Sistema de color tridimensional que muestra luminosidad (Adaptado de Montesinos, 2013).

El tono o matiz (h^*) es el atributo que describe la sensación visual de los colores percibidos: rojo, amarillo, verde y azul, o a una combinación de dos de ellos; sencillamente el matiz es como se percibe el color de un objeto. El anillo de color de la figura 10 muestra la continuación de color de un matiz al siguiente. Así como se muestra en el anillo, al mezclar pinturas de azul y verde se obtiene un verde azul, al mezclar amarillo con verde se obtiene un verde amarillo (Master Color Control, 2002; Montesinos, 2013).

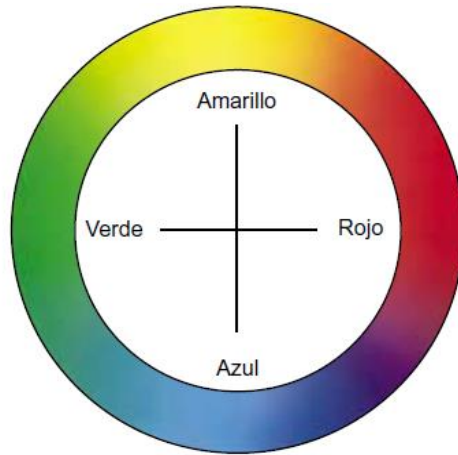


Figura 10. Sistema de color que muestra tono o matiz (Adaptado de Montesinos, 2013).

Colorido, saturación o cromaticidad (C^*) es el atributo que permite diferenciar entre un estímulo más o menos cromático, o sea, la sensación visual débil-fuerte, pálido-intenso, llamativo-apagado de un color. Por ejemplo, al comparar un tomate con un rábano, el rojo del tomate es mucho más llamativo mientras que el rábano parece más apagado. La figura 11 muestra cómo cambia la cromaticidad conforme nos movemos del centro hacia la periferia. Los colores en el centro son grises (apagados o sucios) y conforme avanzamos hacia la periferia se vuelven más saturados (vivos o limpios) (Master Color Control, 2002; Montesinos, 2013).

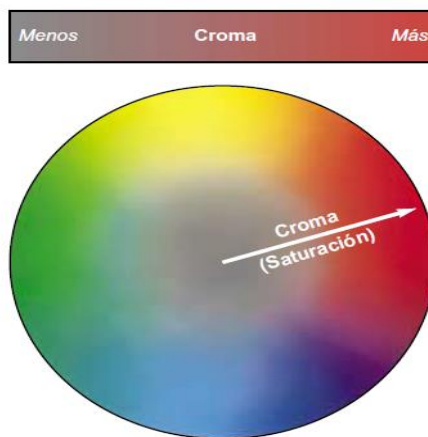


Figura 11. Sistema de color que muestra saturación o cromaticidad (Adaptado de Montesinos, 2013).

El uso del sistema CIELCh permite lecturas instrumentales que pueden aproximarse más a la percepción de los colores de los observadores humanos. La expresión $L^*C^*h^*$ además ofrece una

ventaja sobre CIELAB, ya que es fácil de correlacionar con los sistemas anteriores basados en muestras físicas como por ejemplo la Escala de Color Munsell (Kheng, 2002; Master Color Control, 2002; Socaciu & Diehl, 2008).

3.7 Teoría de la medición de antocianinas y compuestos oscuros

El contenido del pigmento de antocianina tiene un papel crítico en la calidad de color de muchas bebidas, frutas y otros productos elaborados. Por lo tanto, la medición precisa de las antocianinas, junto con sus índices de degradación, es muy útil para evaluar la calidad (Guisti & Wrolstad, 2001).

Sin embargo, en muchas situaciones una simple determinación de antocianinas totales es inapropiada debido a la interferencia de las antocianinas poliméricas, productos de degradación de antocianinas, o melanoidinas de la reacción de pardeamiento. En esos casos, el enfoque ha sido utilizar el método del pH diferencial (AOAC Official Method 2005.02) el cual permite una medición precisa y rápida. Este concepto fue introducido en 1948 por Sondheimer y Kertesz, utilizando valores de pH de 2 y 3,4 para el análisis de mermeladas de fresa; desde entonces, se han realizado modificaciones a la técnica aplicando el método a diferentes valores de pH (Guisti & Wrolstad, 2001; Giusti & Jing, 2007).

Este método de pH diferencial, se describe como un ensayo rápido y conveniente para la cuantificación de las antocianinas monoméricas por Giusti & Wrolstad (2001), y consiste en la medición de la absorbancia a dos valores de pH y se basa en la transformación estructural de la antocianina cromóforo como una función del pH, que se puede medir usando espectroscopia óptica (Giusti & Jing, 2007).

El efecto es debido a que las antocianinas pueden cambiar de un color rojo azulado brillante saturado a pH 1 a la forma hemiacetal incolora a pH 4,5. Por lo tanto, la medición de las muestras de antocianina a pH 1 y 4,5 puede eliminar la interferencia de otros materiales que no pueden mostrar la absorbancia a la longitud de onda máxima (510nm). Se determina la absorbancia de las antocianinas a 700 nm, como una forma de corregir errores por interferencias (niebla) en la muestra. Las antocianinas totales son calculadas por los pesos moleculares y absortividades

molares de los compuestos más abundantes, como se observa a continuación, (Giusti & Wrolstad, 2001; Lee *et al.*, 2005; Giusti & Jing, 2007; Jiménez *et al.*, 2010).

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad [16]$$

Donde A es igual a pH 1.0 ($A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}}$) - pH 4,5 ($A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}}$); MW (masa molecular) = 449,2 g / mol para cianidina-3-o-glucósido; DF = factor de dilución; l = longitud de trayectoria en cm y $\epsilon = 26\,900$ coeficiente de extinción molar en (L/mol*cm) (Lee *et al.*, 2005).

Asimismo, se utiliza otras técnicas espectrofotométricas para medir el grado de polimerización de la antocianina y el índice de pardeamiento. Mediante métodos sustractivos que se basan en el uso de métodos de decoloración de antocianinas monoméricas, pero que no afectan al color polimérico. Los agentes blanqueadores más utilizados son el sodio, potasio o metabisulfito de potasio, y se mide la absorbancia a 420 nm puesto que la acumulación de productos de degradación de color marrón aumenta la absorción en el intervalo de 400 y 440 nm, para los polifenoles tales como proantocianidinas (Giusti & Jing, 2007).

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del proyecto

Los diferentes ensayos preliminares y definitivos se efectuaron en el laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, al igual que las pruebas definitivas de almacenamiento y los análisis físicos químicos.

4.2 Materia prima

El proceso de producción del extracto inició con la selección, lavado y despulpado del café orgánico de la especie arábigo, proveniente de la finca y beneficio Naturalba localizado en Pavones de Turrialba, que se encuentra a una altitud de 1000 msnm. El proceso que el subproducto del despulpado sufrió es establecido por Quirós (2014).

El extracto obtenido se filtró para eliminar impurezas y se almacenó empacado en bolsas Doy Pack con laminado metálico a -20 °C. Posteriormente, se descongeló, se agregó un carbohidrato encapsulante y fue secado por aspersión con el secador por atomización marca Büchi Mini Spray Dryer B-290, del laboratorio de química de la Escuela de Tecnología de Alimentos utilizando los parámetros establecidos por Ariza, (2011).

El producto final fue el extracto con el encapsulante en estado polvo que para efectos de esta investigación es nombrado como: extracto rojo en polvo de la broza de café; y corresponde a la materia prima utilizada en las diferentes pruebas.

4.3 Pruebas preliminares

4.3.1 Definición de la concentración de extracto rojo en polvo de broza de café a utilizar en disolución acuosa y aplicada a diferentes matrices alimentarias

Para determinar la concentración de extracto necesaria para colorear un alimento se aplicó el extracto en agua y en diferentes productos comerciales como leche, soda carbonatada, yogur natural y gelatina sin sabor, tratando de igualar el color a los productos homólogos (las mismas matrices con ingredientes y condiciones de acidez similares) que se encuentran disponibles en el mercado, pero que contienen un colorante sintético. Se agregaron cantidades de extracto suficiente que permitiera alcanzar un color similar, para lo que se midió los parámetros de color L^* , a^* , b^* , h^* y C^* ; además se trató de duplicar las características químicas como el pH, para obtener condiciones equivalentes en las diferentes matrices homólogas.

A partir de los resultados obtenidos se escogieron las concentraciones necesarias del extracto según la matriz alimentaria, que permitieran obtener los colores similares a sus productos homólogos disponibles en el mercado. Los criterios de decisión fueron los siguientes parámetros de color: la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono o hue (h^*) en donde se obtuvo valores equivalentes a sus productos homólogos.

Se definieron las diferentes concentraciones para cada matriz evaluada, de manera que en agua se determinó un mínimo de 4% de extracto rojo en polvo de broza de café y en yogur un mínimo de 7,5 % de extracto rojo en polvo de broza de café. Las concentraciones para las demás matrices no fueron comparables entre ellas, debido a que las características del extracto no fueron compatibles con las del producto, ocasionando cambios en las características del alimento como turbidez o formación de coágulos como se observó con la leche.

4.3.2 Prueba de pre-estabilidad para la selección del rango de pH para realizar el estudio

Para establecer el rango de pH más adecuado en donde se observará una mayor estabilidad del extracto, se realizaron siete disoluciones del pigmento en medio acuoso a la concentración determinada en el punto 4.3.1. que correspondió a 4% de extracto rojo en polvo de broza de café. Cada una de las disoluciones se llevó a diferentes pH desde pH 2 hasta pH 8, utilizando disoluciones de HCl (0,09914 mol/L) y NaOH (0,1144 mol/L).

Se determinaron los parámetros de color L^* , a^* , b^* , h^* y C^* ; de cada una de las disoluciones. A partir de los resultados obtenidos se procedió a seleccionar el rango de pH que permitiera apreciar el cambio en el color que experimentaba el extracto, los criterios principales fueron los siguientes parámetros de color: la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono o hue (h^*).

4.3.3 Prueba de pre-estabilidad para la selección de los tiempos de evaluación para realizar el estudio del efecto de la temperatura

Para la definición de los tiempos a los que se estudiaría el efecto de la temperatura en las disoluciones modelo, se colocaron las disoluciones del extracto al 4% (concentración determinada en el punto 4.3.1), a diferentes temperaturas, y a pH de 3,25 que corresponde al pH del extracto en disolución con agua. Se evaluó las disoluciones a 4 °C y -20 °C en cámaras de refrigeración y congelación, respectivamente; y las disoluciones sumergidas en su totalidad en baños de agua a 25 °C, 37 °C, 60 °C y 80 °C, todos los tratamientos en condiciones de oscuridad.

Se determinó los parámetros de color L^* , a^* , b^* , h^* y C^* ; de cada una de las disoluciones. Para las muestras sometidas a baños de agua, se realizaron mediciones al tiempo 0 y posteriormente cada dos horas, durante un tiempo aproximado de 6 horas, y para las muestras que se encontraban en refrigeración y congelación se determinó los parámetros a los tiempos 0 horas, 6 horas y a 30 días.

A partir de los resultados obtenidos se procedió a escoger los rangos de tiempo adecuados para cada temperatura. Los criterios principales fueron los siguientes parámetros de color: la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono o hue (h^*), donde se obtuvo valores diferentes al tiempo 0.

4.3.4 Definición de la concentración y tipo de aditivo con función preservante a utilizar a lo largo del estudio

Durante la evaluación de las diferentes muestras en el tiempo se observó cambios por deterioro del producto, por lo tanto, se realizó un análisis microbiológico en una muestra del extracto. A partir de los resultados obtenidos, se decidió utilizar un aditivo con función preservante para detener la actividad de los microorganismos de deterioro, por lo que se evaluaron tres productos con actividad preservante de mayor uso en la industria: sorbato de potasio, benzoato de sodio y propionato de calcio.

Para la evaluación se utilizaron dos concentraciones de cada preservante, una concentración máxima de 1% (máxima permitida por regulaciones nacionales) y una concentración mínima donde se garantizará su efectividad 0,1%. Se realizaron disoluciones con estas concentraciones y se dejaron a temperatura ambiente durante una semana, trascurrido este tiempo se hicieron evaluaciones sensoriales visuales de cada una de las disoluciones y se seleccionó el tipo de preservante y la concentración que se iba a utilizar en la preparación de todas las muestras que conllevaran almacenamiento prolongado.

4.3.5 Definición de la concentración del extracto a utilizar en las matrices alimentarias: yogur y sirope de fresa

Se determinó las concentraciones de colorante natural (extracto en estudio) y artificial (colorante FD&C Rojo No. 40) necesarias para un yogur y un sirope de fresa, tratando de igualar el color de ambos tipos de colorante en cada producto. Además, se buscó en ambos casos que el color fuera similar a lo que se encuentra disponible en el mercado con colorante sintético.

Lo primero que se realizó fue seleccionar una concentración de extracto rojo de broza de café evaluando dos concentraciones 6% y 10% en yogur; y de 4% y 8% en el sirope de fresa (ver Anexo 9.2, Cuadro A 2) de manera que fueran lo más semejante posible al comparar con lo que se encuentra en el mercado nacional en este tipo de productos, para el yogur 6% y para el sirope de fresa 4% (a criterio del investigador),

Posteriormente, se seleccionó la concentración de FD&C Rojo No. 40 que se iba utilizar en cada producto, siguiendo el procedimiento anterior, pero esta vez comparando con el color de los productos que contenían el extracto rojo en polvo de broza de café.

Para realizar la determinación se evaluó los parámetros de color L^* , a^* , b^* , h^* y C^* de cada uno de los productos con colorante natural y con colorante artificial. A partir de los resultados obtenidos se definieron las diferentes concentraciones para realizar las pruebas de almacenamiento de los productos. Los criterios de decisión fueron los siguientes parámetros de color: luminosidad (L^*), la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tono o hue (h^*), en donde se obtuvieron valores semejantes entre ambos tipos de colorantes.

4.4 Pruebas definitivas

4.4.1 Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café ante los efectos de pH, concentración de iones calcio y exposición a la luz

4.4.1.1 Prueba de estabilidad ante el efecto del pH

Se identificó el comportamiento del extracto rojo en polvo de la broza del café a diferentes pH, mediante seis tratamientos por triplicado, que se muestran en el Cuadro I. Los tratamientos consistieron en realizar para cada pH, tres disoluciones por separado en buffer de fosfatos que contenían H_3PO_4 , KH_2PO_4 Y $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ (cada uno en diferentes proporciones para alcanzar el pH deseado). Cada repetición se colocó en tres tubos de centrifuga cubiertos externamente con papel aluminio para generar condiciones de oscuridad, a la concentración del extracto determinada en el punto 4.3.1 que corresponde a 4%, y por un tiempo de 30 minutos.

Cuadro I. Tratamientos evaluados para describir el efecto del pH sobre el comportamiento del extracto rojo en polvo de la broza de café a una concentración de 4%.

Tratamiento	pH
1	2
2	3
3	4
4	5
5	6
6	7

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio unifactorial, para la variable pH con 6 niveles, pH: 2, 3, 4, 5, 6 y 7 por triplicado. Para cada tratamiento se determinaron los parámetros de color L^* , la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tonalidad o hue (h^*), buscando obtener valores más

cercanos al color rojo puro que se encuentra entre -15 y 15° de tonalidad o hue (h^*) (Quirós, 2014). También se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales presentes.

Con cada variable respuesta se realizó un ANDEVA para buscar diferencia entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%, cuando existió esta diferencia se comparó los promedios por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) con el fin de encontrar entre cuáles tratamientos se presentó la diferencia. Los datos obtenidos, fueron reportados calculando el promedio de cada variable respuesta evaluada, junto al intervalo de confianza y los análisis estadísticos se realizaron con el software de estadística JMP 8.

4.4.1.2 Prueba de estabilidad ante el efecto de iones calcio

Se determinó las condiciones de mayor estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café en presencia de iones calcio. Se evaluaron cuatro concentraciones de calcio a partir de cloruro de calcio (Pureza: $>99,99\%$ / MM: $110,98$ g/mol) con el extracto, para cada concentración se realizaron tres disoluciones (repeticiones) por separado en buffer de fosfatos y las muestras fueron colocadas en tubos de centrifuga cubiertos externamente con papel aluminio, se almacenaron y se evaluaron durante un período de almacenamiento de 8 días. La concentración de extracto utilizada fue de 4%, determinada en el punto 4.3.1. y el pH determinado en el punto 4.4.1.1.

Las concentraciones fueron seleccionadas según el nivel de calcio que se encontraba en productos usualmente disponibles en el mercado como leche, yogur y jugos de frutas. En el caso de leche fluida se encontraron concentraciones de calcio desde $42,5$ mg, 108 mg, 120 mg hasta 150 mg en 100 mL en leche descremada. En yogur, por ejemplo, se reportó concentraciones que iban de 78 mg en 100 mL para el BioPlus, 121 mg en 100 mL el BioBalance, 105 mg en 100 mL y 112 mg en 100 mL en otros productos similares. En bebidas y jugo de naranja fortificado, se encontró concentraciones de $1,3$ mg en 100 mL bebidas isotónicas, 108 mg y 120 mg en 100 mL en jugos y otras bebidas. Los tratamientos se observan en el cuadro II.

Cuadro II. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de cuatro concentraciones de iones calcio sobre el extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4%.

Tratamiento	Concentración de calcio (mg/100mL)	Tiempo (días)
1		0
2		2
3	0	4
4		6
5		8
6		0
7		2
8	75	4
9		6
10		8
11		0
12		2
13	125	4
14		6
15		8
16		0
17		2
18	200	4
19		6
20		8

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de dos factores (concentración de calcio y tiempo) con niveles de 4 y 5 respectivamente, para evaluar un total de 20 tratamientos por triplicado. Para cada tratamiento se determinaron los parámetros de color L*, la pureza o cromaticidad (C*) y el ángulo de tonalidad o hue (h*). También se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales y el índice de pardeamiento no enzimático (índice de oscurecimiento) a través del tiempo.

Para cada variable respuesta se realizó un ANDEVA tomando el tiempo como variable continua y la concentración de calcio como variable categórica, para buscar diferencia entre cada tratamiento con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontró diferencia significativa con la variable tiempo se elaboraron gráficas para realizar un análisis de regresión; cuando se encontró diferencia significativa en la variable concentración de calcio se comparó los promedios por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) con el fin de encontrar entre cuáles tratamientos se presentó la diferencia; y cuando se encontró diferencia significativa en la interacción tiempo*concentración de calcio, se realizaron gráficas para realizar un análisis de regresión de cada tratamiento de calcio por separado. Los datos obtenidos, fueron reportados calculando el promedio de cada variable

respuesta evaluada, junto al intervalo de confianza y los análisis estadísticos se realizaron con el software de estadística JMP 8.

Además, el contenido de antocianinas monoméricas totales fue analizado para determinar las tasas de degradación de antocianinas. Ajustado a un modelo cinético de primer orden, se determinó la constante de velocidad de degradación (k) para cada tratamiento, lo que permitió describir la estabilidad de las antocianinas ante el fenómeno de los iones calcio (Jiménez *et al.*, 2010; Hellstrom *et al.*, 2013). Estos análisis estadísticos, se realizaron con el programa Excel 2016 de Microsoft Office.

4.4.1.3 Prueba de estabilidad ante la exposición a la luz

Se evaluó el efecto de la luz en la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café en disolución, aplicando dos tratamientos por triplicado. Para cada tratamiento se realizó tres disoluciones del extracto por separado, a la concentración determinada en el punto 4.3.1. que corresponde a 4% del extracto, el pH determinado en el punto 4.4.1.1. y en placas de Petri.

El primer tratamiento consistía en colocar las muestras dentro de una caja y exponerlas a una fuente de luz fluorescente a una distancia de 26 cm (Janna *et al.*, 2007). Para ello se utilizó una bombilla LED de marca Osram (120 V/65 mA/6W/60 Hz), debido a que por su funcionamiento evita el calentamiento de la muestra y su pérdida por evaporación, pues emiten el mínimo de calor. El segundo tratamiento se basó en mantener las muestras cubiertas por papel aluminio en cajas sin entrada de luz, para obtener condiciones de oscuridad absoluta. Los tratamientos se muestran a continuación en el cuadro III, ambos se aplicaron por un período de 60 horas a temperatura ambiente.

Cuadro III. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de la luz en la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4%.

Tratamiento	Efecto	Tiempo (horas)
1	Sin luz	0
2	Sin luz	24
3	Sin luz	60
4	Con luz	0
5	Con luz	24
6	Con luz	60

Se utilizó un diseño irrestricto aleatorio con un arreglo factorial de 2 niveles (presencia/ausencia) y 3 tiempos (0 h, 24 h, 60 h) por triplicado. Para cada tratamiento se determinó los parámetros de color L^* , la pureza o cromaticidad (C^*) y el ángulo de tonalidad o hue (h^*). Además, se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales para ambos tratamientos.

Para cada variable respuesta se realizó un ANDEVA tomando el tiempo como variable continua y la condición luz/oscuridad como variable categórica, para buscar diferencia entre los tratamientos con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontró diferencia significativa con la variable tiempo se elaboraron gráficas para realizar un análisis de regresión; cuando se encontró diferencia significativa en la variable condición de luz/oscuridad, se comparó los promedios por medio de una prueba t de Student ($p < 0,05$) para encontrar si existían diferencias significativas entre la presencia o ausencia de luz; y cuando se encontró diferencia significativa en la interacción tiempo*condición de luz/oscuridad, se realizaron gráficas para realizar un análisis de regresión de cada tratamiento por separado. Los datos generados fueron reportados calculando el promedio de cada variable respuesta evaluada y el intervalo de confianza. Los análisis estadísticos se realizaron con el software de estadística JMP 8.

Además, el contenido de antocianinas monoméricas totales fue analizado para determinar las tasas de degradación de antocianinas. Ajustado a un modelo cinético de primer orden, se determinó la constante de velocidad de degradación (k) para cada tratamiento, lo que permitió describir la estabilidad de las antocianinas ante la exposición a la luz (Jiménez *et al.*, 2010; Hellstrom *et al.*, 2013). Estos análisis estadísticos, se realizaron con el programa Excel 2016 de Microsoft Office.

4.4.2 Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café ante el efecto de diferentes temperaturas y determinación de su cinética de reacción de degradación

Para estudiar las cinéticas de reacción de degradación del extracto rojo en polvo de la broza del café con la temperatura, se evaluaron cinco condiciones de temperatura diferentes. Los distintos tratamientos se muestran a continuación en el cuadro IV.

Cuadro IV. Tratamientos evaluados para determinar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza del café a una concentración de 4% en disolución acuosa.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (horas o días)
1		0,0 horas
2		0,5 horas
3		1,0 horas
4		1,5 horas
5		2,0 horas
6		2,5 horas
7		3,0 horas
8		3,5 horas
9	80	4,0 horas
10		4,5 horas
11		5,0 horas
12		5,5 horas
13		6,0 horas
14		6,5 horas
15		7,0 horas
16		7,5 horas
17		8,0 horas
1		0,0 horas
2		0,5 horas
3		1,0 horas
4		1,5 horas
5		2,0 horas
6		2,5 horas
7		3,0 horas
8		3,5 horas
9	55	4,0 horas
10		4,5 horas
11		5,0 horas
12		5,5 horas
13		6,0 horas
14		6,5 horas
15		7,0 horas
16		7,5 horas
17		8,0 horas

Continuación **Cuadro IV.**

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (horas o días)
1		0 horas
2		2 horas
3		4 horas
4		6 horas
5		8 horas
6		16 horas
7		24 horas
8		32 horas
9	25	40 horas
10		48 horas
11		72 horas
12		96 horas
13		120 horas
14		144 horas
15		168 horas
16		192 horas
17		216 horas
<hr/>		
1		0 días
2		3 días
3		6 días
4		9 días
5		15 días
6		20 días
7	4	25 días
8		30 días
9		35 días
10		40 días
11		45 días
12		55 días
13		76 días
<hr/>		
1		0 días
2		6 días
3		13 días
4		20 días
5		27 días
6	-20	34 días
7		41 días
8		48 días
9		61 días
10		76 días
11		106 días

Se realizaron disoluciones por triplicado, con la concentración de extracto de 4% determinada en el punto 4.3.1. el pH 3 determinado en el punto 4.4.1.1., colocados en tubos de centrifuga cubiertos externamente con papel aluminio para generar condiciones de oscuridad.

Para los tratamientos correspondientes a las temperaturas de 55 °C y 80 °C, se utilizó 30 mL de la disolución en tubos de centrifuga de 50 mL cubiertos en su exterior con papel aluminio, estos tubos se colocaron en baños de agua a temperatura controlada durante un período de 8 horas. Los tubos estaban cerrados para evitar la evaporación de la disolución sin que presentara una variación en el volumen total, puesto que esto afectaría directamente el resultado de concentración de antocianinas totales que se estaba determinando.

Con los tratamientos de las temperaturas de 25 °C, 4 °C y -20 °C, se utilizó de igual forma 30mL de la disolución en tubos de centrifuga de 50 mL cubiertos en su exterior con papel aluminio y cerrados, colocados en baño de agua para la temperatura de 25 °C y en cámaras de refrigeración y congelación en los casos de los tratamientos 4 y 5, durante un período aproximado 9 días, 76 días y 106 días, respectivamente.

Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio unifactorial para cada una de las temperaturas, con 17 niveles para la temperatura 80 °C, con 17 niveles para la temperatura 55 °C, 17 niveles para la temperatura 25 °C, 13 niveles para la temperatura de 4 °C y 11 niveles para la temperatura -20 °C, cada una por triplicado. Para cada tratamiento se determinaron los parámetros de color L*, pureza o cromaticidad (C*) y el ángulo de tonalidad o hue (h*). También se determinó el contenido de antocianinas monoméricas totales y el índice de pardeamiento no enzimático a través del tiempo durante la aplicación de los tratamientos.

Para cada temperatura en sus respectivas variables respuesta se realizó un ANDEVA para buscar diferencia entre los tiempos con un nivel de confianza del 95%, cuando se encontró diferencia se elaboraron gráficas tomando el tiempo como una variable continua para realizar un análisis de regresión entre la variable de color contra tiempo, y determinar si existe alguna relación entre ellas con un $\alpha = 0,05$. Todos los resultados obtenidos, fueron reportados calculando el promedio de cada variable respuesta evaluada, junto al intervalo de confianza, y los análisis estadísticos se realizaron con el software de estadística JMP 8.

El contenido de antocianinas monoméricas totales fue analizado para determinar las tasas de degradación de antocianinas. Ajustado a un modelo cinético de primer orden, se determinó la constante de velocidad de degradación (k) para cada tratamiento, y se aplicó la ecuación de Arrhenius para calcular la energía de activación (E_a), la cual permitió describir la estabilidad de las

antocianinas ante el efecto de la temperatura (Jiménez *et al.*, 2010; Hellstrom *et al.*, 2013). Estos análisis estadísticos de regresión se realizaron con el programa Excel 2016 de Microsoft Office.

4.4.3 Determinación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café durante un período de almacenamiento en una matriz alimentaria

Se aplicó el extracto a dos matrices de alimentos: yogur y sirope de fresa, que reunían las mejores características de pH 4,4 para el yogur y 3,2 para el sirope, concentración de iones calcio y concentración alta de azúcares (ver fichas técnicas en anexo 9.3 y 9.4), de forma que permitieron obtener una buena estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café durante un período de almacenamiento.

Además, se aplicó a estos mismos productos el colorante artificial disponible y utilizado actualmente en la industria FD&C Rojo No. 40, a las concentraciones determinadas en el punto 4.3.4., controlando las condiciones de luz y empaque a lo largo de 40 y 90 días de almacenamiento a la temperatura de 4 °C para el yogur y 17-27 °C para el sirope.

Se aplicó un diseño irrestricto aleatorio con arreglo factorial de dos factores (colorante y tiempo) con 15 niveles de tiempo para sirope y 8 para el yogur; y con 2 niveles del colorante para ambos casos. Como método de comparación se determinaron los parámetros de color L*, la pureza o cromaticidad (C*) y el ángulo de tonalidad o hue (h*), con una frecuencia aproximada de 5 días a través del tiempo.

Se realizó un ANDEVA para cada variable respuesta, tomando el tiempo como variable continua y el tipo de colorante como variable categórica, para buscar diferencia entre cada tratamiento con un nivel de confianza del 95%. Cuando se encontró efecto significativo para la variable tiempo se realizó gráficas de regresión para observar el cambio del color en el tiempo; cuando se encontró diferencia significativa en la variable tipo de colorante se comparó los promedios por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$) con el fin de encontrar cuáles tratamientos presentan las diferencias; y cuando se encontró diferencia significativa en la interacción tiempo*tipo de colorante se realizaron gráficas para realizar un análisis de regresión de cada tratamiento por separado. Los resultados obtenidos fueron reportados calculando el promedio de

cada variable respuesta evaluada y el intervalo de confianza. Los análisis estadísticos se realizaron con el software de estadística JMP 8.

4.5 Condiciones de almacenamiento de las muestras

Como se mencionó anteriormente, para realizar todas las determinaciones se utilizó diferentes muestras del extracto rojo en polvo de broza de café que se encontraban almacenadas en bolsas Doy Pack con laminado metálico y en congelación a -20 °C.

Para las pruebas preliminares, se utilizaron tubos centrífuga de 50 mL cubiertos en su exterior por papel aluminio y placas cubiertas con papel aluminio.

Para las pruebas de estabilidad definitivas, se utilizaron tubos de centrífuga cubiertos externamente con papel aluminio y placas cubiertas con papel aluminio para las pruebas de pH, concentración de iones calcio y estabilidad a la luz. Además, los tubos de centrífuga de 50 mL cubiertos de papel aluminio fueron colocadas en baños de agua a las temperaturas 25 °C, 55 °C y 80 °C, y almacenadas en las correspondientes cámaras de refrigeración y congelación donde se alcanzarán las temperaturas adecuadas del tratamiento en estudio (4 °C y -20 °C).

Para la aplicación del extracto en alimentos, cada uno de los productos elegidos con extracto rojo en polvo de broza de café y con colorante artificial se almacenaron en vasitos de 2 oz de poliestileno (PS) cubiertos externamente con papel aluminio; a las temperaturas 4 °C para el yogur y 17-27 °C para el sirope.

4.6 Métodos de análisis fisicoquímicos

4.6.1 Determinación de pH

El pH de las diferentes disoluciones se determinó según el método establecido por la AOAC 981.12: pH de alimentos acidificados (AOAC, 2005). Utilizando un pH metro calibrado, marca Metrohm, modelo 827 pH Lab.

4.6.2 Determinación de color

Se determinó empleando un colorímetro HunterLab, modelo Color Flex 45/0 (fuente iluminante D65) del Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos. Se utilizó una escala CIELCh, expresando el color a través de los parámetros L^* , C^* y h^* y δE .

Para las mediciones se utilizó un volumen aproximado de muestra de 30 mL y se realizó la determinación con un ángulo de visión de 10° , un ángulo de incidencia de la fuente de luz sobre la muestra de 45° y un fondo blanco. El equipo se calibró utilizando una teja negra y posteriormente la teja blanca parámetros L^* 93,02, a^* -1,12 y b^* 1,51; y se estandarizó mediante la teja verde L^* 53,11, a^* -26,13 y b^* 12,28.

4.6.3 Determinación de fotografías

Se realizaron fotografías para observar los cambios de color visuales a lo largo del tiempo en cada prueba realizada. Esta determinación se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

Las imágenes se capturaron utilizando una cámara de 5 mega píxeles, marca Samsung. Para asegurar que las imágenes fueran comparables, se planificó la composición final para generar las mismas condiciones de captura.

En todos los casos se empleó un ángulo de incidencia directo sobre la muestra y un fondo blanco para evitar errores por efecto de la luz o en la interpretación de las dimensiones de color: matiz, brillo y saturación. Además se utilizó una fuente iluminantes de 6W a 40 centímetros de distancia de las muestras.

4.6.4 Determinación de antocianinas por método espectrofotométrico

El contenido de antocianinas monoméricas totales se determinó por el método de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001), el cual se realizó utilizando el equipo y los reactivos que se encuentran en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

Equipo y reactivos

- Buffer de cloruro de potasio (KCl) 0,025 M, pH=1
- Buffer de acetato de sodio (C₂H₃O₂Na) 0,4 M, pH=4,5
- Espectrofotómetro marca Jasco, modelo V-630

Procedimiento

-Determinar el factor de dilución (FD) apropiado para la muestra, diluyendo con KCl (0,025 M), pH=1, hasta lograr que la absorbancia a $\lambda_{\text{vis-máx}}$ esté dentro del rango adecuado (0,2 a 0,8) para cumplir la Ley de Beer (Pino y Pérez, 1983). En este caso $\lambda_{\text{vis-máx}}$ es 510 nm, según lo indicado por Wrolstad *et al.* (2005) para las antocianinas principales de la broza de café cianidin-3-rutinósido y la cianidin-3-glucósido. Dividir el volumen final de la muestra entre el volumen inicial para obtener el factor de dilución.

- Utilizar como cero en el espectrofotómetro con agua destilada a cualquier longitud de onda que se utilizará.

- Preparar dos diluciones de la muestra, una con cloruro de potasio KCl (0,025 M), pH=1, y la otra con acetato de sodio, pH=4,5, diluyendo cada uno por el factor de dilución determinado previamente. Dejar estas disoluciones equilibrar por 15 minutos.

-Medir la absorbancia de cada disolución al $\lambda_{\text{vis-máx}}$ y al $\lambda=700$ nm (para corregir por turbidez), contra una celda blanco llena con agua destilada.

- Calcular la absorbancia de las muestras diluidas, con la siguiente ecuación:

$$A = (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 1,0} - (A_{510nm} - A_{700nm})_{pH\ 4,5} \quad [17]$$

-Calcular la concentración de antocianinas monoméricas (mg cid-3-rut/L muestra) en la muestra original según la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de antocianinas totales } \left(\frac{\text{mg cianidina-3-rutinósido}}{L} \right) = \frac{(A * MM * FD * 1000)}{(\epsilon * l)} \quad [18]$$

Donde A es el valor obtenido según la ecuación [17], MM es la masa molar de la antocianina mayoritaria cianidina-3-rutinósido (Ariza, 2011), igual a 631 g/mol, FD es el factor de dilución obtenido en el primer paso, 1000 es el factor de conversión de gramos a miligramos y ϵ es la absorptividad molar 28800.

4.6.5 Determinación del índice de pardeamiento

El índice de pardeamiento se determinó según Buglione & Lozano (2002); Del Pozo-Insfran *et al.* (2007); Jiménez *et al.* (2010); Wrolstad *et al.*, (2005). La determinación se realizó utilizando el equipo y los reactivos que se encuentran en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

Equipo y reactivos

- Buffer de cloruro de potasio (KCl) 0,025 M, pH=1
- Espectrofotómetro marca Jasco, modelo V-630

Procedimiento

-Determinar el factor de dilución (FD) apropiado para la muestra, diluyendo con KCl (0,025 M), pH=1, hasta lograr que la absorbancia a $\lambda_{\text{vis-máx}}$ esté dentro del rango adecuado (0,2 a 0,8) para cumplir la Ley de Beer (Pino y Pérez, 1983). En este caso $\lambda_{\text{vis-máx}}$ es 510 nm, según lo indicado por Wrolstad *et al.* (2005) para las antocianinas principales de la broza de café cianidin-3-rutinósido y la cianidin-3-glucósido. Dividir el volumen final de la muestra entre el volumen inicial para obtener el factor de dilución.

- Utilizar como cero en el espectrofotómetro con agua destilada a cualquier longitud de onda que se utilizará.

- Preparar una dilución de la muestra con cloruro de potasio KCl (0,025 M), pH=1, diluyendo cada uno por el factor de dilución determinado previamente. Dejar estas disoluciones equilibrar por 15 minutos.

- Medir la absorbancia de la disolución a $\lambda=510\text{nm}$ (para las antocianinas totales) y al $\lambda=420\text{nm}$ (para medir la absorbancia de las antocianinas y de los productos de pardeamiento), contra una celda blanco llena con agua destilada.

- Calcular el índice de las muestras diluidas, con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de pardeamiento} = \frac{A_{510\text{nm}}}{A_{420\text{nm}}} \quad [19]$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el cuadro V, se presentan los resultados obtenidos en las pruebas preliminares para la determinación de la concentración de extracto rojo en polvo de broza de café en disolución; concentración que se utilizó en todas las pruebas descritas como se especifica en los puntos 4.4.1 y 4.4.2 de la sección anterior.

Cuadro V. Comparación del color de diferentes concentraciones del extracto rojo en polvo de la broza del café en disolución a un pH de 3,25.

Concentración de extracto (%)	Color		
	L*	C*	h*
2,3	58,6±0,2	24,1±0,3	57,8±0,2
4,0	43,4±0,3	51,8±0,7	42,5±0,8
7,0	40,1±0,2	47,7±0,5	40±1

*Promedios reportados con L.C = $x \pm \frac{t*s}{\sqrt{n}}$, con n = 3 y un 95 % de confianza.

Con las tres concentraciones se obtuvo visualmente un color rojo, sin embargo, a partir del análisis de los parámetros de color y de, específicamente, la tonalidad o matiz (h*), se decidió seleccionar como concentración base la de 4% de extracto rojo en polvo de broza de café, debido a que ésta era la mínima concentración con la que se alcanzaron los parámetros característicos del color rojo. La tonalidad (h*) es la medición que hace referencia al color en sí que tiene el producto, donde el color rojo puro se encuentra entre -15 y 15° y el rojo en general (incluyendo colores difuminados) presenta valores desde -45 hasta 45° (Quirós, 2014).

De igual forma, se determinó la concentración a utilizar de extracto rojo en polvo de broza de café y de FD&C Rojo No. 40, en las matrices alimentarias seleccionadas: yogur y sirope de fresa. Los resultados se observan a continuación.

Cuadro VI. Comparación de color de diferentes concentraciones de extracto rojo en polvo de broza de café y FD&C Rojo No. 40, en muestras de yogur y sirope de fresa para seleccionar la concentración a utilizar en las pruebas definitivas.

Yogur	Color			Sirope de fresa	Color		
	L*	C*	h*		L*	C*	h*
Concentración de 6% de extracto broza de café	80±4	15±4	46±2	Concentración de 4% de extracto broza de café	35±7	60±7	46±2
Concentración de 0,0006% de Rojo No. 40	90±7	14±7	39±2	Concentración de 0,010% de Rojo No. 40	41±7	59±7	32±2
Concentración de 0,0008% de Rojo No. 40	87±7	17±7	24±2	Concentración de 0,004% de Rojo No. 40	35±7	69±7	42±2

*Promedios reportados con L.C = $x \pm \frac{t*s}{\sqrt{n}}$, con n = 3 y un 95 % de confianza.

Con base en estos resultados, se seleccionó en el caso del yogur una concentración de FD&C Rojo No. 40 de 0,0006% como se puede observar en el cuadro anterior. En cuanto al sirope de fresa se seleccionó una concentración de FD&C Rojo No. 40 de 0,004%. El criterio de selección consistió en lograr concentraciones donde los parámetros de color (especialmente h*), fueran más similares con la concentración ya seleccionada de extracto rojo en polvo de broza de café: 6% para el yogur y 4% para el sirope de fresa (ver sección 4.3.5 de materiales y métodos).

Los resultados de las pruebas preliminares donde se evaluó el extracto desde pH 2 hasta pH 8, para determinar el rango de pH que se utilizaría en las pruebas definitivas del objetivo 1, con y sin tratamiento térmico se presentan a continuación.

Cuadro VII. Comparación del color del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a diferentes pH, a una concentración de 4%, con y sin tratamiento térmico de 75 °C por 30 minutos, para seleccionar el ámbito de pH a usar en la prueba definitiva.

Sin tratamiento				Con tratamiento			
pH	Color			pH	Color		
	L*	C*	h*		L*	C*	h*
2,028	45,2±0,4	51,7±0,3	36,0±0,4	2,028	51,3±0,3	49,9±0,9	36,3±0,6
3,066	60,3±0,6	35±1	35,0±0,8	3,061	49,6±0,1	42,3±0,3	39,4±0,3
3,501	55,8±0,7	31±1	42,6±0,7	3,490	65,5±0,4	27,0±0,9	49±2
4,035	58,8± 0,6	24±1	57±1	4,011	66,6±0,2	23,2±0,7	63±1
5,072	62,2±0,3	19,9±0,8	74,0±0,5	5,030	62,6±0,3	25,7±0,2	75,4±0,2
6,004	60,0±0,8	21±1	76±1	5,991	57,4±0,2	37,7±0,3	73,9±0,3
8,010	58,5±0,5	22,2±0,6	79,5±0,3	8,025	49,3±0,6	44,9±0,3	68,6±0,6

*Promedios reportados con L.C = $x \pm \frac{t^*s}{\sqrt{n}}$, con n = 3 y un 95 % de confianza.

En los resultados obtenidos en la columna “sin tratamiento” se puede observar que hubo una variación general del color al ir aumentando el pH, al observar el parámetro de color h* se evidenció una degradación del color rojo, que pudo deberse a que la molécula de antocianina cambia su estructura molecular y muestra a su vez un color diferente con cada pH (Gould *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011). Por lo tanto, se decidió trabajar con un rango de pH desde 2, aumentando de uno en uno hasta el pH 7; se dejó fuera del rango de pH a evaluar el de 8 debido a que el color rojo estaba casi totalmente degradado, además se decidió no usar pH intermedios como el de 3,5 donde no se observa un cambio tan drástico en comparación con un cambio en una unidad de pH.

En cuanto al color obtenido después del tratamiento térmico, como se observa en la figura 12, la pérdida del color rojo fue indiscutible al alcanzar los pH más altos, mientras que era menos evidente a pH más ácidos (más bajos), esto muy probablemente debido a la degradación de las antocianinas presentes en el extracto rojo en polvo de broza de café.

Adicional a esta pérdida de antocianinas por la temperatura, con esta prueba se demostró que al someter una disolución del extracto rojo en polvo de la broza de café a altas temperaturas la disolución sufrió cambios de color al compararla con la coloración mostrada inicialmente, sin importar el pH del medio en que se encontraba. Esto fue corroborado en un estudio realizado por Sui *et al.* (2014), donde se estudiaron seis antocianinas, incluyendo cianidina-3-o-glucósido, señalando que la estabilidad de las seis antocianinas sometidas a tratamiento térmico se redujo en

gran medida con el aumento de pH hacia 5,0-6,0 y pH neutro. La tendencia mostró que las antocianinas fueron estables a pH bajo e inestables en condiciones de pH más altos, manifestando una degradación drástica con un tratamiento térmico a pH por encima de 6,0.

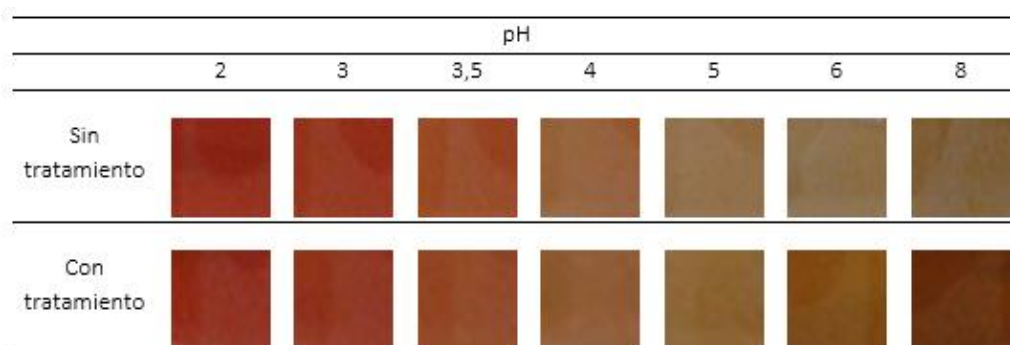


Figura 12. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café a diferentes pH, con y sin tratamiento a 75 °C por 30 minutos.

A partir de esta información se evaluó la pérdida de antocianinas que se daba como efecto del tratamiento térmico a alta temperatura. Es por esta razón que para cumplir el objetivo 2 de esta investigación, se diseñaron experimentos para obtener curvas de cinética de reacción de degradación del extracto rojo en polvo de broza de café, que se asocia al comportamiento de las antocianinas a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas.

Para diseñar estos experimentos, se ejecutaron pruebas preliminares para ver el cambio de color que sufriría el extracto a lo largo del tiempo y a diferentes temperaturas, como se describe en la sección 4.3.3 de materiales y métodos.

Cuadro VIII. Comparación del color de las disoluciones del extracto rojo de la broza de café al 4% a diferentes temperaturas, para seleccionar las temperaturas de las pruebas definitivas.

Tiempo (horas/ días)	0 horas			6 horas			30 días		
	L*	C*	h*	L*	C*	h*	L*	C*	h*
Temperaturas (°C)									
-20	42,1±0,3	51,3±0,3	44,0±0,3	41,9±0,3	51,7±0,3	44,8±0,3	42,6±0,3	49,0±0,3	44,5±0,3
4	42,2±0,3	51,3±0,3	44,8±0,3	42,8±0,3	51,7±0,3	43,1±0,3	41,0±0,3	48,9±0,3	45,7±0,3
25	41,1±0,3	52,1±0,3	43,2±0,3	42,4±0,4	49,8±0,4	44,8±0,4			
37	41,3± 0,3	51,5±0,3	43,6±0,3	42,5±0,2	49,7±0,2	44,2±0,2			
60	40,6±0,3	51,8±0,3	43,7±0,3	43,2±0,5	51,1±0,5	47,7±0,5			
80	40,2±0,3	50,3±0,3	44,1±0,3	47,4±0,2	51,9±0,2	57,5±0,2			

*Promedios reportados con L.C = $x \pm \frac{t^*s}{\sqrt{n}}$, con n = 3 y un 95 % de confianza.

Para cada temperatura evaluada se encontró cambios a diferentes tiempos; por ejemplo, en un mes no se encontró cambios a -20 °C, mientras que se encontró cambios muy leves a 4 °C. Para las temperaturas de 25 °C y 37 °C, se observaron cambios muy leves por un período de 6 horas; y para las temperaturas más altas de 60 °C y 80 °C se encontró que a lo largo de 6 horas había cambios bastante considerables. Por tanto, se decidió extender las mediciones a un tiempo de 8 horas para las pruebas definitivas para las temperaturas de 55 °C y 80 °C; un tiempo de medición de 8 días al realizar las pruebas a la temperatura de 25 °C; y tiempos de 2,5 meses y 3,5 meses para las temperaturas de refrigeración y congelación, respectivamente.

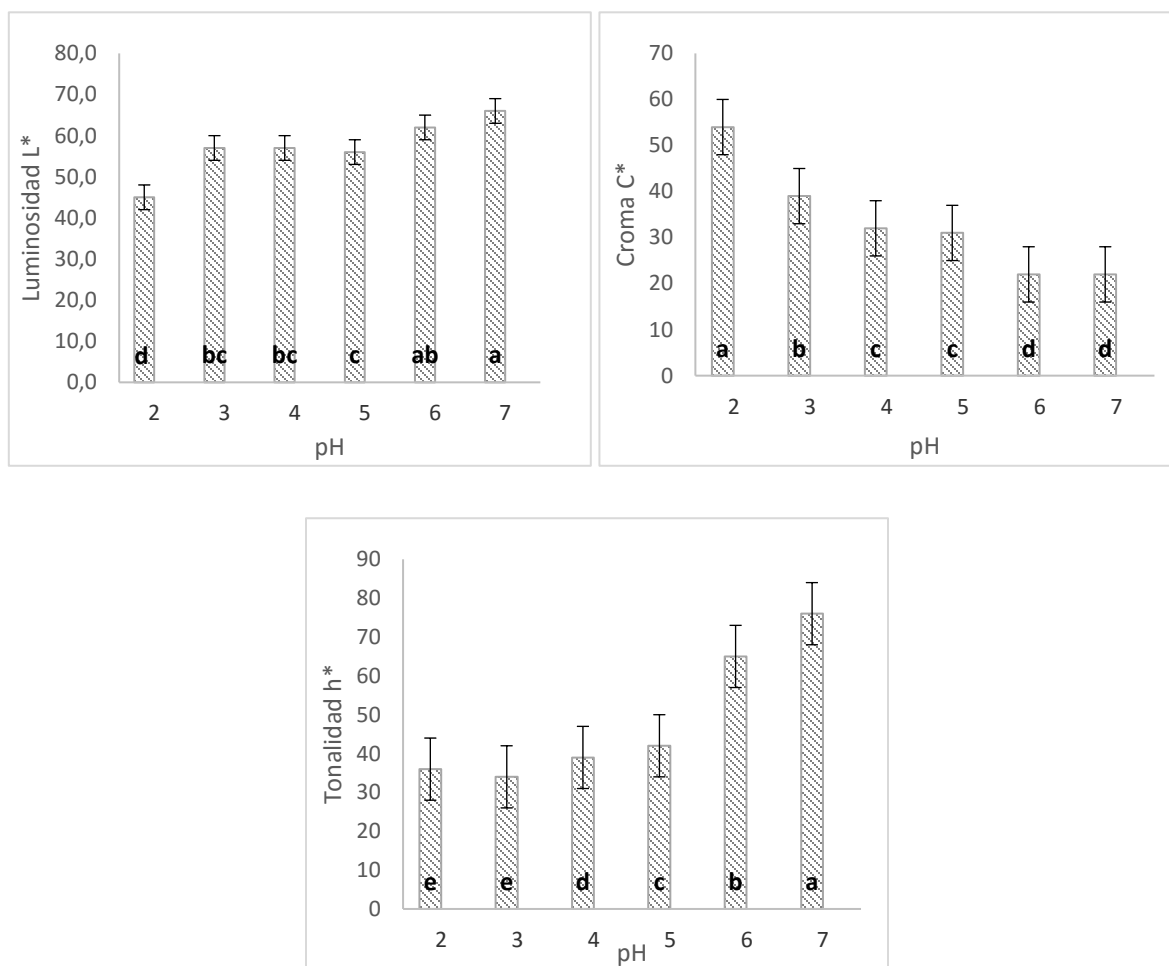
Sin embargo, para las pruebas que se realizarían por tiempos prolongados se efectuó un análisis microbiológico para asegurar que no había microorganismos que pudieran alterar la homogeneidad de la muestra. El análisis se llevó a cabo con una muestra del extracto rojo en polvo de broza de café y el reporte de resultados se puede observar en el anexo 9.5.

Se obtuvo $1,4 \times 10^2$ UFC/g de recuento de mesófilos aerobios y <10 UFC/g de recuento de mohos y levaduras, por lo que se decidió utilizar un aditivo con función preservante para interrumpir cualquier actividad de los microorganismos de deterioro. En este caso, como se mencionó en la sección 4.3.4 de materiales y métodos, se evaluaron tres de los productos preservantes: sorbato de potasio, benzoato de sodio y propionato de calcio, evaluando dos concentraciones para cada preservante.

En esta determinación se observó que las concentraciones máximas no se disolvían en la muestra que se estaba utilizando, por lo que se descarta el uso de esta concentración. Por otro lado, las disoluciones con benzoato de sodio al 0,1%, mostraron las mejores características sin evidencia de deterioro, por lo tanto, se seleccionó como preservante utilizándolo al 0,1% en la preparación de todas las muestras de las pruebas que requerían de un almacenamiento prolongado. Los resultados se muestran en el anexo 9.1.

5.1 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante los efectos del pH

Esta prueba tenía como objetivo evidenciar el comportamiento del extracto rojo en polvo de broza de café ante los cambios en el pH de la disolución, para ello se midieron los parámetros de color: luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*), además del contenido de antocianinas monoméricas totales. Como se muestra en el anexo 9.9, el análisis de varianza mostró que los tres parámetros de color, luminosidad L^* , cromaticidad C^* y tonalidad h^* , presentaron diferencias significativas entre los pH ($p < 0,0001$). Por lo que se efectuó una prueba de Tukey ($p < 0,05$) para cada variable. A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las variables de color.



*Letras diferentes dentro de cada gráfico, representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Figura 13. Comparación de medias de los parámetros de color obtenidos en la evaluación del efecto de diferentes pH como indicador de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución al 4%.

En el caso de la luminosidad (L^*) que permite describir la sensación visual claro-oscuro, se presentaron diferencias significativas entre el pH 2 y los demás pH; además el pH 7 fue significativamente diferente a los pH 2 y 5 siendo los más claros; y los pH 3, 4 y 6 no presentaron diferencias significativas entre sí ($p > 0,05$), y el pH 5 fue diferente significativamente de los pH 2,6 y 7.

En cuanto al atributo saturación o cromaticidad (C^*), se encontró diferencias significativas entre el pH 2 y pH 3 con todos los demás pH, es decir, presentaron una sensación visual de pálido-intenso diferente; mientras que los pH 4 y 5 y pH 6 y 7 fueron considerados no significativamente diferentes entre sí (Master Color Control, 2002). De esta forma, a los pH menores se observa que el color fue más vívido y a pH mayores fue menos vívido.

No obstante, aunque el pH 2 en ambos parámetros L^* y C^* , fue significativamente diferente a los demás, podemos recordar que el catión flavilio es la forma más estable y predominante a valores de pH por debajo de 4, por lo tanto, a pH 3 todavía se encuentra presente esta molécula; mientras que a pH de 4,5 predomina la pseudobase carbinol que es incolora (Francis & Markakis, 2009; Gould *et al.*, 2009; Cavalcanti *et al.*, 2011).

Esto se puede corroborar, al observar el parámetro tonalidad (h^*) donde se encuentra que todos los pH fueron significativamente diferentes entre sí, excepto el pH 2 y pH 3. Como se mencionó anteriormente, este parámetro hace referencia al color percibido de un producto, donde tanto el pH 2 y el pH 3 presentaron valores dentro del rango del color rojo en general entre “-45° hasta 45°” (Master Color Control, 2002; Quirós, 2014).

Sumado a esto, en la Figura 14 se puede observar como las imágenes de los pH 2 y pH 3 presentaban tonalidades de rojo muy similares, mientras que a pH 4 ya la tonalidad de rojo se percibió un poco diferente y al aumentar el pH se presentó la pérdida de la tonalidad y el aumento de la presencia de productos pardos. Esta pérdida de color indicó que las antocianinas fueron muy susceptibles al deterioro de color por cambios de pH (Janna *et al.*, 2007). También Prudencio *et al.* (2008), refiere como en un estudio que la cianidina-3-o-glucósido a pH 4,1 fue cambiando ligeramente su coloración de rojo a naranja como se observa en este caso.

Además, con estas imágenes y a partir de los resultados anteriores donde se observa la pérdida de saturación ($<C^*$) y el incremento de la luminosidad ($>L^*$) al aumentar el pH, se demostró

una decoloración y pérdida de intensidad de color (característica descrita por estos dos parámetros) (Oliveira *et al.*, 2006). Estos resultados también fueron evidenciados en el estudio realizado por Jing *et al.* (2012), donde el incremento del pH causó un aumento en la luminosidad L*, una cromaticidad menor C* y un cambio desde 30 a 70 en el ángulo de tonalidad h*.

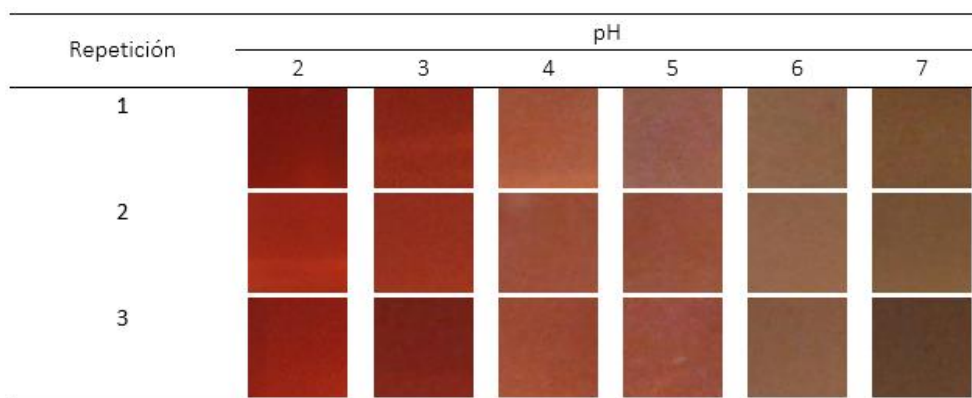
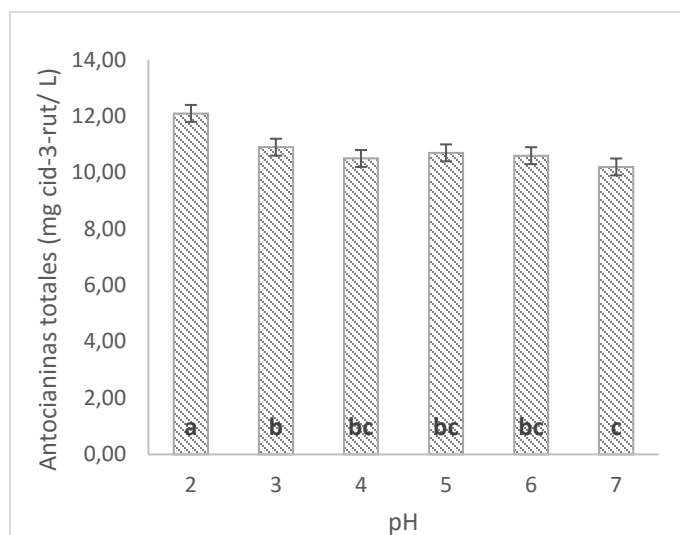


Figura 14. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, durante la evaluación del efecto del pH.

Además de la determinación de color, se realizó la medición del contenido antocianinas monoméricas totales por el método de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). El análisis de varianza del anexo 9.9, cuadro A9, mostró que el contenido de antocianinas presentó una diferencia significativa entre los pH ($p < 0,0001$). Por lo tanto, se realizó el correspondiente análisis y se determinó mediante una prueba de Tukey ($p < 0,05$), entre cuáles pH existió diferencias significativas, los resultados se pueden observar a continuación.



*Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Figura 15. Comparación de medias del contenido de antocianinas monoméricas totales obtenido a diferentes valores de pH como indicador de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%.

Según la figura anterior, el contenido de antocianinas monoméricas totales de las muestras presentó una tendencia a disminuir al aumentar el pH, lo cual se debió a la reducción en la estabilidad de la molécula ante cambios del pH del medio. Este efecto del pH fue visualmente confirmado por la diferencia del color en las imágenes de las disoluciones que se muestra en la figura 14. (Janna *et al.*, 2007).

Aunque la estructura de catión flavilio es la más estable, cuando está sometida a pH básico o alcalino (pH por arriba de 4), el ion flavilio es inestable porque su carga positiva es susceptible al ataque nucleofílico por parte del agua produciéndose la pseudobase carbinol. Sumado a esto la molécula de antocianina posee propiedades hidrófilas a través de los grupos hidroxilo de las terminaciones de azúcares, de su estructura y de los grupos acilo. Estos grupos hidroxilo tienen una alta capacidad de formar enlaces de hidrógeno, lo que también contribuye a esta inestabilidad ante cambios del pH del medio (Quintero, 2004; Francis & Markakis, 2009; Andersen & Jordheim, 2013).

En este caso, se observa que el pH 2 fue significativamente diferente a los demás, mientras que entre los pH 3 y los pH 6 no se presentaron diferencias significativas en el contenido de antocianinas monoméricas totales, ni tampoco entre el pH 4 al pH 7. Aunque el pH 2 presentó un contenido de antocianinas significativamente mayor que el pH 3, a pH 3 fue un valor intermedio

que era significativamente diferente al pH 7 donde sí se observó mayor reducción en el contenido de antocianinas.

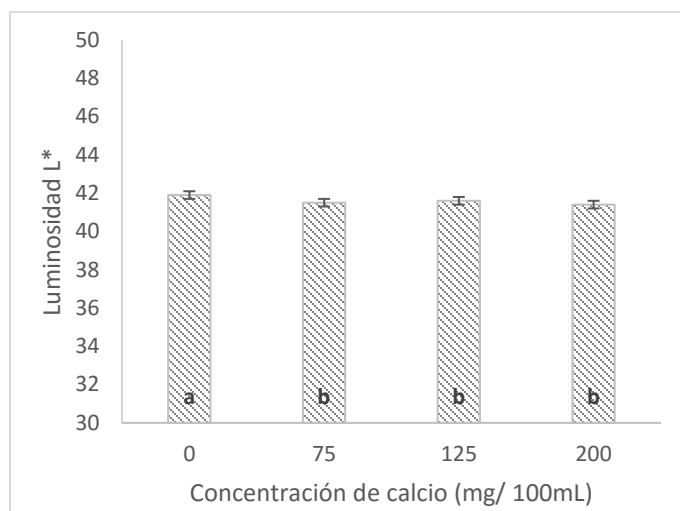
Con estos resultados, se seleccionó el pH 3 para las siguientes pruebas de la investigación debido a que este pH puede representar mayor cantidad de alimentos que se encuentran en sistemas ácidos, pero no tan extremos como el pH 2.

5.2 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de iones calcio

Esta prueba tenía como objetivo evidenciar el comportamiento del extracto rojo en polvo de broza de café ante el efecto de los iones calcio a diferentes concentraciones. Para ello, se evaluaron cuatro tratamientos de diferentes concentraciones a los cuales se le determinó los parámetros de color; además del contenido de antocianinas monoméricas totales y el índice de pardeamiento no enzimático o índice de oscurecimiento.

Los análisis de varianza se pueden observar en la sección 9.10 de anexos, donde se evaluó los efectos de la variable tiempo, concentración de calcio e interacción tiempo*concentración de calcio.

Al estudiar la variable luminosidad (L^*), no se encontró diferencia significativa para la variable tiempo ($p=0,1326$), ni para la interacción tiempo*concentración de calcio ($p=0,3010$); es decir, no se pudo considerar que hubo un cambio en la sensación visual claro-oscuro del color a lo largo del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, sí se encontró una diferencia significativa al comparar entre las diferentes concentraciones de calcio ($p<0,0001$) en la luminosidad; por lo tanto, se efectuó una prueba de Tukey ($p<0,05$) (ver Figura 16).

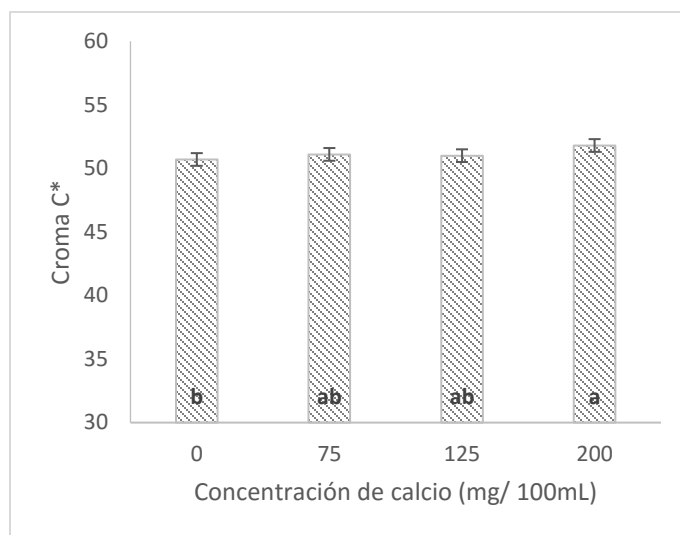


*Letras diferentes entre barras representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Figura 16. Comparación de medias para el parámetro de color luminosidad (L^*) obtenido durante la evaluación del efecto de los iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.

En este caso, se obtuvo diferencia significativa entre la concentración de calcio 0 y el resto de concentraciones 75, 125 y 200 (mg/100mL), por lo que se podría pensar que la presencia de iones calcio tuvo cierto efecto sobre la estabilidad de las antocianinas al formarse complejos entre el ion calcio y las antocianinas, dando como resultado un color más oscuro para las muestras del extracto rojo sin calcio.

En cuanto a la variable cromaticidad (C^*), se obtuvo que los cambios en el tiempo no fueron significativamente diferentes ($p=0,2408$); es decir, no se puede considerar que hubo un cambio en la sensación visual pálido-intenso del color a lo largo del tiempo de almacenamiento. Además, tampoco se encontró interacción significativa entre tiempo*concentración ($p=0,7811$). Sin embargo, al igual que con el parámetro luminosidad L^* , sí se encontró una diferencia significativa ($p=0,0036$) al comparar entre los diferentes tratamientos de calcio, como se muestra en la Figura 17.



*Letras diferentes entre barras representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Figura 17. Comparación de medias para el parámetro de color cromaticidad (C^*) obtenido durante la evaluación del efecto de los iones calcio sobre la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.

Estos resultados muestran que la concentración de calcio de 200 (mg/100mL) fue significativamente diferente de la concentración de calcio 0 (mg/100mL), pero no de las otras concentraciones que si contenían calcio en niveles intermedios 75 y 125 (mg/100mL), y además estas concentraciones tampoco fueron diferentes de la concentración 0. Por lo tanto, con estos resultados se podría decir que a concentraciones bajas de calcio el efecto de los iones no se hizo significativo, pero a partir de concentraciones de 200 (mg/100mL) si se observó un efecto significativo en el aumento de la cromaticidad C^* de la disolución que contiene el extracto rojo en polvo de la broza de café, es decir el color fue menos vívido.

Al realizar el análisis de la variable tonalidad (h^*), se obtuvo diferencias significativas para la variable tiempo ($p < 0,0001$), para la variable concentración de calcio ($p = 0,0014$) y para la interacción de ambas ($p = 0,0231$). Por lo tanto, se realiza el análisis a partir de esta interacción, como se muestra a continuación.

Cuadro IX. Regresiones lineales para el parámetro de color tonalidad (h^*), obtenidas durante la evaluación del efecto de iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, a lo largo de 8 días.

Tratamiento	Ecuación	Pendiente ¹	Intercepto	R ²	Valor P
Calcio 0	$h^*=42,733333 + 0,8666667*\text{tiempo}$	0,8666667 ^a	42,733333	0,975469	<0,0001*
Calcio 75	$h^*=42,933333 + 0,7833333*\text{tiempo}$	0,7833333 ^{ab}	42,933333	0,982651	<0,0001*
Calcio 125	$h^*=43,109333 + 0,7305*\text{tiempo}$	0,7305 ^{ab}	43,109333	0,989255	<0,0001*
Calcio 200	$h^*=42,8 + 0,7166667*\text{tiempo}$	0,7166667 ^b	42,8	0,973158	<0,0001*

*Efecto significativo ($p<0,05$);¹Letras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Como se puede observar en este caso, todas las concentraciones fueron significativamente diferentes, es decir en todos los casos hubo un cambio en la variable tonalidad (h^*), a lo largo del tiempo.

Para las cuatro concentraciones se dio un aumento del valor h^* , es decir, se va perdiendo el tono rojo como se puede ver en la Figura 18, donde se encontraron las imágenes de cada tratamiento en el tiempo. Al observar la columna del tiempo 8 días, en todos los tratamientos se pudo percibir como el tono rojo fue cambiando a un tono un poco café y en algunas ocasiones naranja, que fue lo esperado para las antocianinas, que durante el almacenamiento van disminuyendo el enrojecimiento, y suelen aumentar la luminosidad al aumentar su amarillez (Hassani & Sharifi, 2012).

Por lo tanto, se espera que para la concentración de calcio de 0 (mg/100mL), por cada aumento de 1 día en el tiempo, el ángulo de tonalidad h^* aumente $0,87^\circ$. Para la concentración de calcio de 75 (mg/100mL) cada aumento de 1 día en el tiempo, el ángulo de tonalidad h^* aumente $0,78^\circ$. Para la concentración de calcio de 125 (mg/100mL) se espera que, por cada aumento de 1 día en el tiempo, el ángulo tonalidad h^* aumente $0,73^\circ$ y para la concentración de calcio de 200

(mg/100mL) se espera que, por cada aumento de 1 día en el tiempo, el parámetro de color tonalidad h^* aumente $0,72^\circ$, siendo este último el menor aumento en la variable h^* , o sea, la menor pérdida de tonalidad.

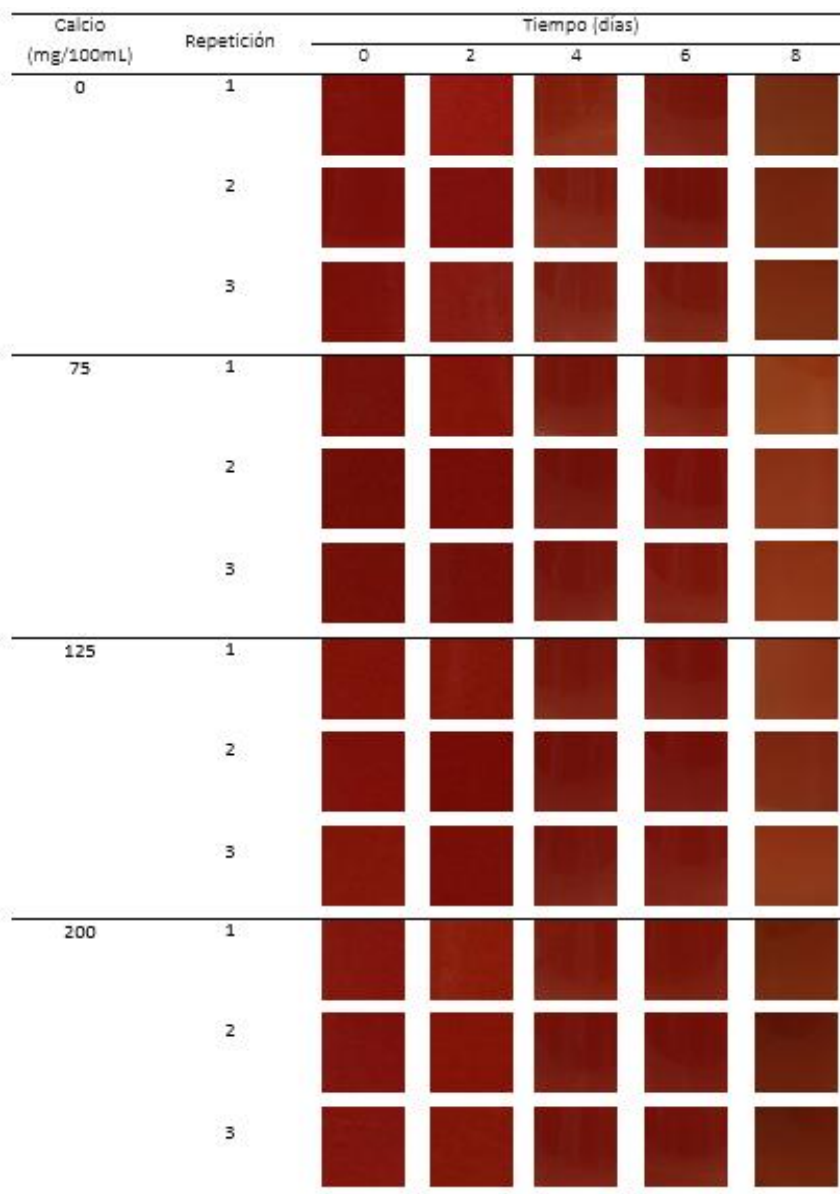


Figura 18. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, en la evaluación del efecto de iones calcio durante 8 días.

Al observar de manera general estos resultados, se puede deducir que hubo un efecto positivo en la estabilización de las antocianinas debido a la presencia de los iones calcio, y este efecto parecía ser mayor al ir aumentando esta concentración. Esto se corroboró al realizar un

análisis de varianza de las diferentes pendientes obtenidas con cada tratamiento, con su respectiva comparación de promedios por medio de una prueba de Tukey ($p < 0,05$), como se observa en el anexo 9.10, cuadro A.17.

Como se observa en la columna de la pendiente del cuadro IX, se encontraron diferencias significativas entre las pendientes de las concentraciones 0 y 200 (mg/100mL) de calcio. Por lo tanto, la pérdida de color rojo al aumentar el ángulo de tonalidad h^* , que se presentó con la concentración de calcio 0 fue significativamente mayor a la que se presentó con la concentración de 200 (mg/100mL).

Por otro lado, el contenido de antocianinas monoméricas totales también fue determinado para cada tratamiento y al realizar el análisis estadístico respectivo, se encontró que tanto la variable tiempo ($p < 0,0001$), como la variable concentración de calcio ($p = 0,0008$) fueron significativamente diferentes; sin embargo, su interacción ($p = 0,2581$) no lo fue.

La ecuación y gráfica para describir la relación estadística o ecuación de regresión, entre la concentración de antocianinas y el tiempo, se muestra a continuación:

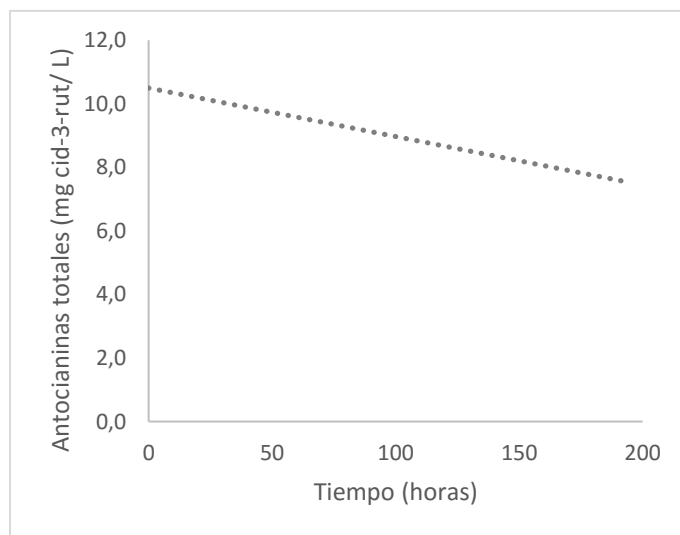
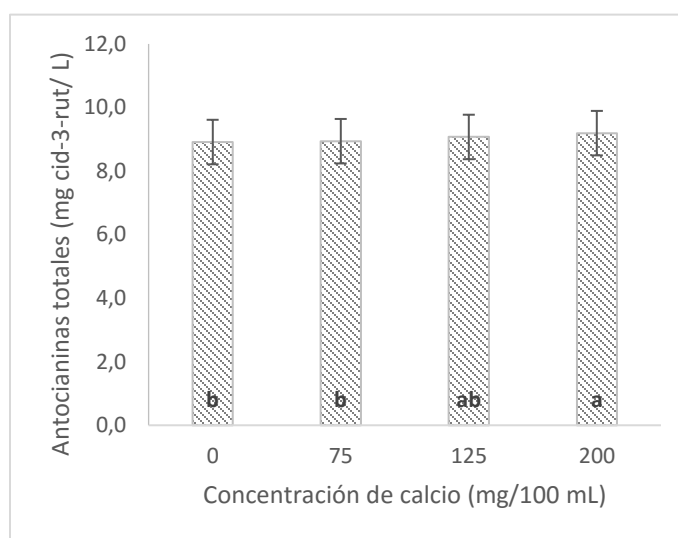


Figura 19. Recta de regresión para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenida en la evaluación del efecto de los iones calcio sobre la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.

$$\text{Contenido de Antocianinas} = 10,547963 - 0,37537 * \text{Tiempo} \quad [20]$$

Esto indica que en las mismas condiciones de análisis el contenido de antocianinas totales disminuyó en 0,37537 (mg cid-3-rut/ L) al paso de una hora, con cualquier concentración de calcio que se encontrara en el medio. En la figura anterior se puede observar gráficamente la regresión, con un coeficiente de correlación R^2 que nos indica que el 95,40% de la variación del contenido de antocianinas estaba relacionada con el tiempo.

Al realizar la comparación de promedios para la variable concentración de calcio que también presentó diferencias significativas, se obtuvo los resultados que se muestran a continuación:



*Letras diferentes en una misma fila representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$.

Figura 20. Comparación de medias para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas durante la evaluación del efecto de iones calcio en la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, durante 8 días.

En la figura anterior, se observa que las concentraciones 0, 75 y 125 (mg/100mL) no fueron significativamente diferentes entre sí; sin embargo, la concentración de calcio 0 y 75 (mg/100mL) si presentaron diferencias significativas con la concentración de calcio de 200 (mg/100mL) que fue mayor. Es decir, la pérdida de antocianinas fue significativamente menor al aumentar la concentración de iones a 200 (mg/100mL).

Estos resultados fueron validados al analizar el coeficiente cinético o constante de velocidad de reacción. Este valor nos permite conocer con que velocidad decrece la concentración

de reactivo en cuestión (en este caso las antocianinas). Como se mencionó en secciones anteriores, generalmente la velocidad de reacción es dependiente de la temperatura, de la composición del sistema (reactivos, productos, catalizadores, disolvente, entre otras) y de la presión. Por lo tanto, a temperatura constante, esta velocidad es función sólo de las concentraciones de las especies presentes en el sistema (Tojo, 1990; Izquierdo *et al.*, 2004).

A partir de la Figura 21 se observa como el valor k fue mayor cuando no había presencia de iones calcio, y el valor disminuyó al aumentar la concentración de iones calcio presentes, hasta alcanzar un valor de 0,00133 (1/hora) en el caso de la concentración de 200 (mg/100mL), es decir, quedó en evidencia que con esta concentración hubo una degradación, pero ocurre de forma más lenta.

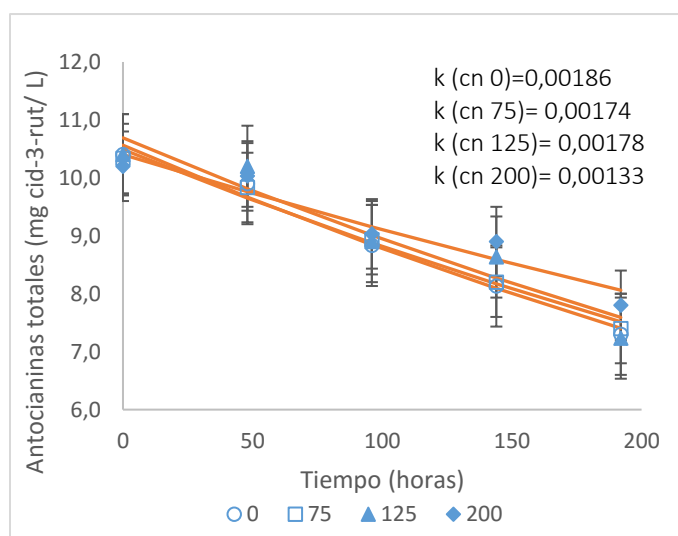


Figura 21. Cinéticas de degradación para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de diferentes concentraciones de iones calcio a lo largo de 8 días.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos al determinar el índice de pardeamiento no enzimático o índice de oscurecimiento. Este índice se utiliza para la medición de compuestos oscuros, y es un método indirecto para detectar y monitorear la degradación de antocianinas a lo largo del tiempo (Quirós, 2014; Del Pozo-Insfran *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2010).

En la Figura A3, del anexo 9.6 se observa que hubo una disminución del índice de oscurecimiento a través del tiempo con calcio o sin calcio, la cual fue debida a la reducción del contenido de antocianinas y/o al aumento en la cantidad de productos pardos.

Mediante el análisis estadístico se encontró que esta tendencia a disminuir en el tiempo fue significativa ($p=0,0008$) para todas las concentraciones de calcio, y la ecuación y gráfica del modelo que describe esta relación estadística, se muestra a continuación:

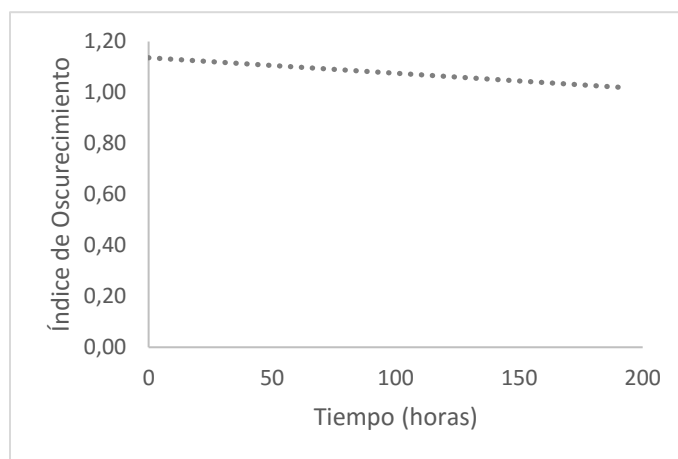


Figura 22. Recta de regresión del índice de oscurecimiento obtenida durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de los iones de calcio a lo largo de 8 días.

$$\text{Índice de oscurecimiento} = 1,1348148 - 0,012019 * \text{Tiempo} \quad [21]$$

Esto indica que bajo las mismas condiciones el índice de oscurecimiento disminuyó en 0,012 al paso de una hora, con cualquier concentración de calcio que se encontró en el medio. El coeficiente de correlación, R^2 , fue de 93,29%.

Al analizar estos resultados y los obtenidos con los parámetros de color, se pudo describir una disminución del contenido de antocianinas en el tiempo que conllevó a su vez una pérdida en la tonalidad roja de la disolución; y que esta depreciación fue significativamente menor para la concentración de iones calcio de 200 (mg/100mL).

El calcio parece proteger las antocianinas de la degradación y por lo tanto mantiene el color, pero el efecto fue leve, por lo que se considera que al utilizar concentraciones de calcio mayores a 200 mg/100mL podría dar mejores indicios de este efecto.

5.3 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz

El efecto de exposición a la luz fluorescente y oscuridad sobre el contenido de antocianinas, se hizo mediante la evaluación de los parámetros de color: luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*); y contenido de antocianinas monoméricas totales e índice de oscurecimiento.

Mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos (Ver anexo 9.11), se determinó que el parámetro de color luminosidad (L^*) no presentó diferencias significativas en la variable tiempo ($p=0,3325$), ni para la variable condición luz/oscuridad ($p=0,8544$) ni tampoco para su interacción tiempo*condición luz/oscuridad ($p=0,3022$). Es decir, no hubo cambios en el parámetro de color de claro-oscuro para las muestras expuestas a luz u oscuridad, a lo largo del tiempo.

Para los parámetros cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*), se encontró diferencias significativas en el tiempo ($p=0,0394$ y $p=0,0001$), pero no en la variable condición luz/oscuridad ($p=0,6698$ y $p=0,9444$), ni tampoco para la interacción ($p=0,7572$ y $p=0,1848$). Es decir, en cuanto a la medición de color no se obtuvo una diferencia significativa al comparar las condiciones de luz y de oscuridad, lo cual también se corrobora con las imágenes que se muestran en la Figura 23, donde no se observa gran diferencia en las fotografías entre una condición y otra.

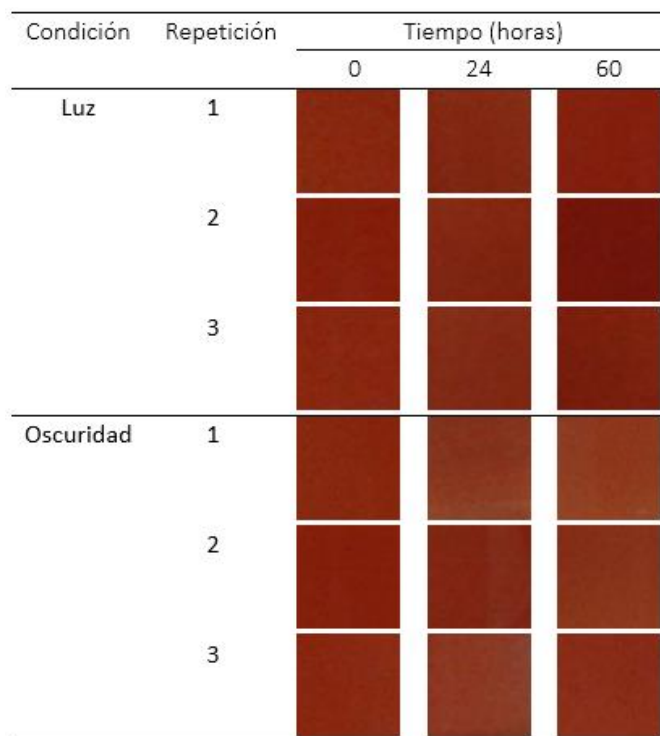


Figura 23. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4% para tres repeticiones, ante el efecto de la exposición a la luz durante 60 horas.

Al ser significativa la diferencia en cromaticidad y tonalidad a lo largo del tiempo en la evaluación de luz-oscuridad se presentan a continuación las regresiones a lo largo del tiempo de ambos parámetros.

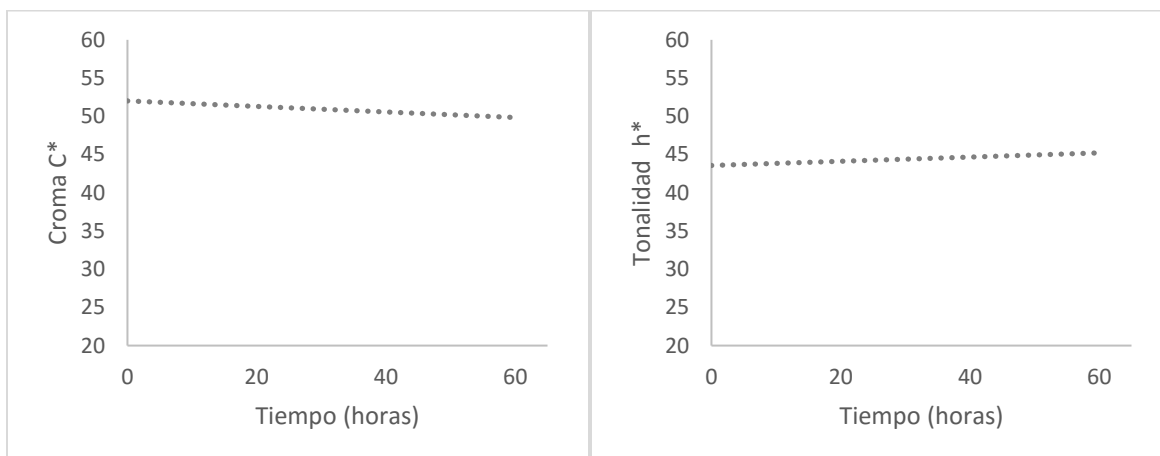


Figura 24. Rectas de regresión del parámetro de color cromía C* (lado izquierdo) y del parámetro tonalidad h* (lado derecho), obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4% ante el efecto de la exposición a la luz por 60 horas.

Las ecuaciones del modelo que describen la relación estadística para cada variable, se muestran a continuación:

$$\text{Cromaticidad, } C * = 51,666667 - 0,030556 * \text{Tiempo} \quad [22]$$

$$\text{Tonalidad, } h * = 43,29386 + 0,0335526 * \text{Tiempo} \quad [23]$$

Esto indica que manteniendo las mismas condiciones el parámetro de cromaticidad disminuyó en 0,031 al paso de una hora, y el ángulo de tonalidad aumentó 0,034° al paso de una hora; en cualquier condición luz-oscuridad en que se encuentre las muestras. Estos resultados con un coeficiente de correlación R² de 28,02% para cromaticidad y 68,14% para tonalidad; es decir la variación total de la cromaticidad es explicada por el modelo de regresión, únicamente en un 28,02%, y para la tonalidad en un 68,14%.

En cuanto al contenido de antocianinas monoméricas totales, en el análisis se obtuvo diferencias significativas en el tiempo (p<0,0001), en la condición luz-oscuridad (p= 0,0007) y en la interacción entre ambas variables (p=0,0160) (ver anexo 9.11, cuadro A 25). Por lo tanto, se realizó el análisis a partir de esta interacción, como se muestra a continuación.

Cuadro X. Regresiones lineales para el contenido de antocianinas monoméricas obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de la exposición a la luz a lo largo de 60 horas.

Tratamiento	Ecuación	Pendiente ¹	Intercepto	R ²	Valor P
Luz	A = 11,005263 – 0,0366959 * tiempo	-0,036696 ^a	11,005263	0,888251	<0,0001*
Oscuridad	A = 11,184211 – 0,0204678 * tiempo	-0,0204678 ^b	11,184211	0,84625	0,0004*

*Efecto significativo (p<0,05);¹Letras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas con α = 0,05

Como se puede observar en este caso, ambas condiciones fueron significativamente diferentes en el tiempo, es decir, tanto en luz como en oscuridad las muestras con el extracto rojo de broza de café sufrieron una disminución significativa del contenido de antocianinas a lo largo del tiempo.

De esta forma y en igualdad de condiciones, se espera que, por cada aumento de 1 hora en el tiempo el contenido de antocianinas disminuya en $-0,037$ (mg cid-3-rut/ L) en condiciones de luz. Y para cada aumento de 1 hora en el tiempo el contenido de antocianinas disminuya en $-0,021$ (mg cid-3-rut/ L) en condiciones de oscuridad.

Sin embargo, para saber si las degradaciones eran diferentes para cada concentración se realizó un análisis de varianza de las diferentes pendientes obtenidas y una comparación de promedios por medio de una prueba t-student ($p < 0,05$). Los resultados muestran que hubo diferencias significativas entre cada condición; es decir, la pérdida de antocianinas que se presentó cuando las muestras estuvieron expuestas a la luz fue significativamente mayor a la que se presentó con las muestras en la oscuridad. Esto concuerda con lo observado en algunos estudios donde el contenido de antocianinas se redujo significativamente, hasta más de un 50% en la presencia de luz (De Rosso & Mercadante, 2007; Gris *et al.*, 2007; Janna *et al.*, 2007). Aunque esta pérdida de antocianinas no cambió la tonalidad del extracto cuando se encontraba en condiciones de luz, suficientemente como para percibirse.

Además de los modelos de regresión, se determinó, al igual que para la prueba de calcio, el coeficiente cinético o constante de velocidad de reacción, con el fin de conocer la velocidad con la que degradan las antocianinas en cada caso. Con este análisis se obtuvo una constante de velocidad k de $0,00369$ (1/hora) para las muestras expuestas a luz, y un valor de k de $0,00192$ (1/hora) para las muestras que se encontraban en oscuridad.

Estos resultados se pueden interpretar como si la velocidad de degradación de las antocianinas fue más rápida en condiciones de luz que en condiciones de oscuridad. La gráfica y los resultados se muestran a continuación:

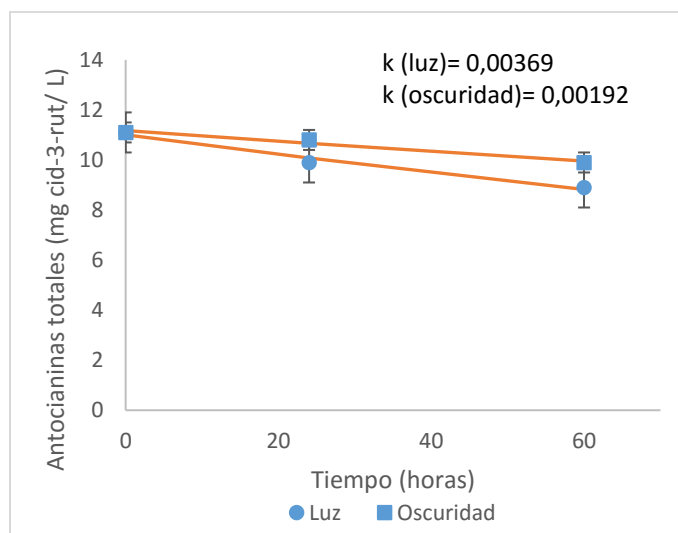


Figura 25. Cinéticas de degradación para el contenido de antocianinas monoméricas totales obtenidas en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución al 4%, ante el efecto de la exposición a la luz a lo largo de 60 horas.

Por otro lado, el índice de oscurecimiento, otro parámetro que evidencia la degradación de antocianinas en el tiempo, no presentó efecto significativo para la variable tiempo ($p=0,7352$), no fue dependiente de la condición de luz-oscuridad ($p=0,6900$), y no presentó interacción entre estas dos variables ($p=0,2299$). De manera que se puede confirmar que la mayor pérdida de antocianinas en condiciones de luz sigue siendo baja y no afectó el color, ya que no se formaron tampoco compuestos oscuros en mayor grado.

5.4 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes temperaturas y su cinética de reacción

Esta prueba tenía como objetivo evidenciar el comportamiento del extracto rojo de broza de café ante el efecto de la temperatura y determinar su cinética de reacción. Para ello se analizaron cinco temperaturas diferentes, cada una por separado como se muestra a continuación.

Temperatura 80 °C

Para evaluar el comportamiento a la temperatura de 80 °C, se determinaron los parámetros de color: luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) como se observa en la figura A 5, anexo 9.7; además del contenido de antocianinas (figura 34) e índice de oscurecimiento (figura A 10., anexo 9.7).

Con el análisis de varianza se observó que no se obtuvo efecto significativo en el tiempo para la variable luminosidad L* (p=0,2811) ni para el parámetro cromaticidad C* (p=0,0538). Sin embargo, para la variable tonalidad h* se obtuvo significancia para la variable tiempo (p<0,0001).

Por lo tanto, se realizaron regresiones lineales, cuya ecuación y gráficas que describen la relación entre el ángulo de tonalidad h* y el tiempo se muestra a continuación.

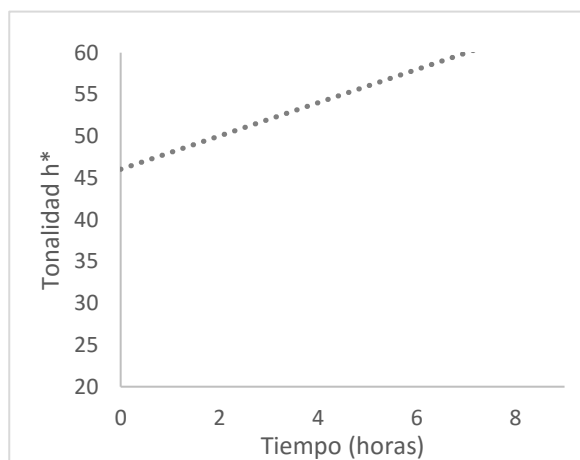


Figura 26. Recta de regresión del parámetro de color tonalidad (h*), obtenida durante la evaluación del efecto de la temperatura 80 °C sobre la estabilidad del extracto rojo de broza de café al 4% a lo largo de 8 horas.

$$\text{Tonalidad } h^* = 45,875817 + 2,0310458 * \text{Tiempo} \quad [24]$$

Esto indica que, en las mismas condiciones de análisis, al aumentar el tiempo en 1 hora el ángulo de tonalidad h^* aumentará $2,03^\circ$, con un coeficiente de correlación R^2 de 89,15%. Al observar las imágenes que se presentan en la Figura 32, se hizo evidente el cambio de coloración rojo, que iba tornándose en naranja y terminando en color café.

La degradación por aumento de la temperatura fue evidenciada en múltiples estudios. Las antocianinas se presentan inestables ya que con el incremento de la temperatura se acelera esta degradación de antocianinas como cianidina-3-o-glocósido y cianidina-3-o-rutinósido (Gris *et al.*, 2007; Janna *et al.*, 2007; Tonon *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Sui *et al.*, 2014).

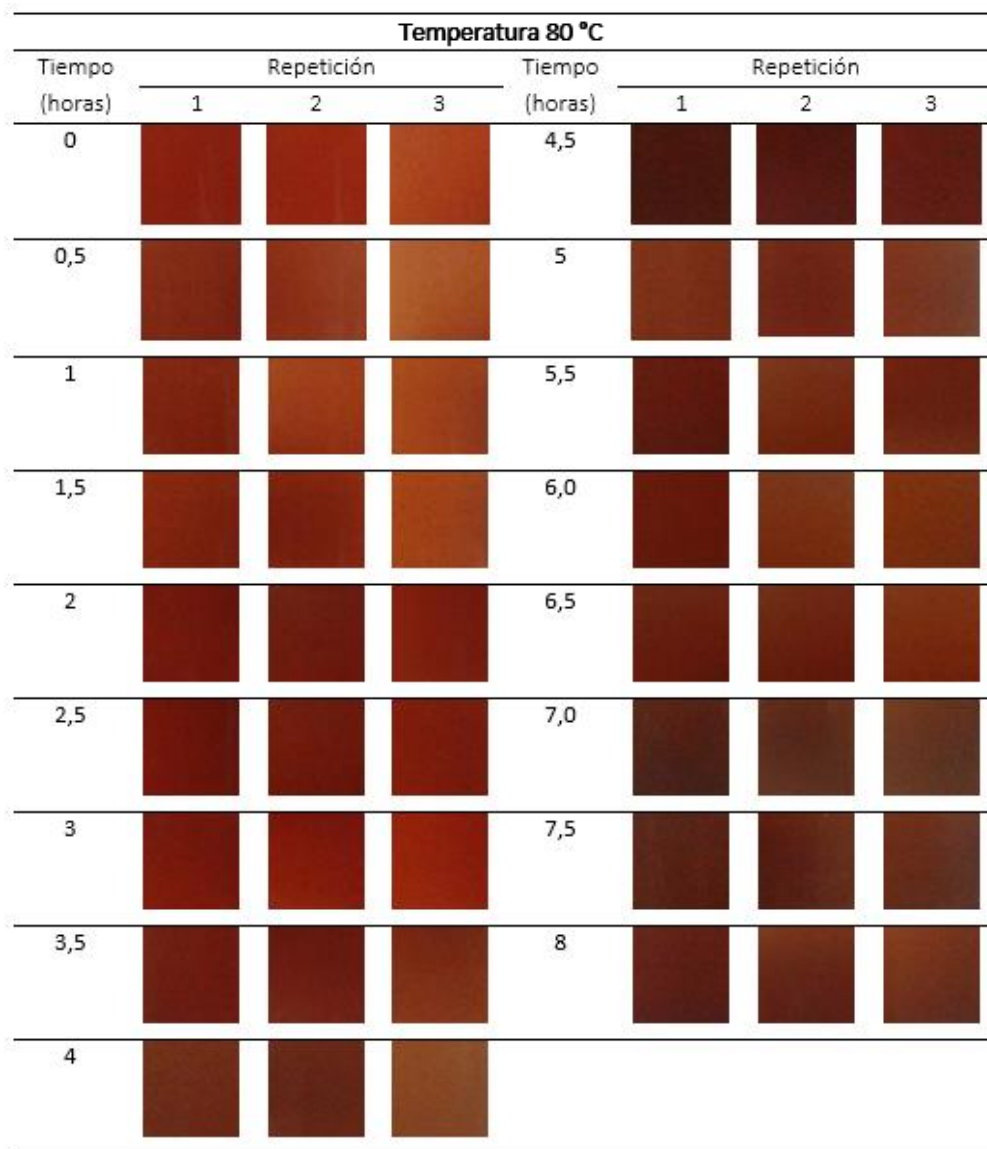


Figura 27. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 80 °C a lo largo de 8 horas.

Temperatura 55 °C

En la evaluación de la temperatura de 55 °C, se determinaron los parámetros de color: luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) como se observa en la figura A 6, anexo 9.7; y el contenido de antocianinas monoméricas totales (figura 34) e índice de oscurecimiento (figura A 10., anexo 9.7).

Con estos resultados se realizó un análisis de varianza al igual que se hizo con la temperatura de 80 °C. En este caso todos los parámetros de color: L*, C* y h* presentaron efectos significativos en el tiempo ($p < 0,0001$), por lo que se calculó la regresión lineal como se observa a continuación.

Cuadro XI. Regresiones lineales de los parámetros de color obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 55 °C a lo largo de 8 horas.

Parámetro	Ecuación	Pendiente	Intercepto	R ²	Valor P
L*	$L^* = 48,254902 - 0,960784 * \text{tiempo}$	-0,960784	48,254902	0,344328	<0,0001*
C*	$C^* = 46,545752 + 0,7802288 * \text{tiempo}$	0,7802288	46,545752	0,468071	<0,0001*
h*	$h^* = 44,266667 + 0,7436275 * \text{tiempo}$	0,7436275	44,266667	0,878188	<0,0001*

*Efecto significativo ($p < 0,05$)

A partir de estos resultados, se puede observar la ecuación que describe la relación entre los parámetros de color y el tiempo, cuando la disolución se encontraba a la temperatura de 55 °C.

Esto indica que, en las mismas condiciones de análisis, al aumentar el tiempo en 1 hora, la luminosidad L* del extracto en disolución disminuyó -0,96, la cromaticidad C* del extracto en disolución aumentó 0,78, y el ángulo de tonalidad h* del extracto en disolución aumentó 0,74°.

Al observar las imágenes que se presentan en la Figura 28, se hizo evidente el cambio de coloración que se dio a partir del tiempo 0, donde la muestra iba transformando su coloración de rojo a naranja. El aumento de la temperatura dio lugar a una degradación de antocianinas. Esta influencia negativa de la temperatura en la estabilidad del compuesto se ha observado por muchos investigadores, como se mencionó para la temperatura de 80 °C.

La degradación de las antocianinas a temperaturas altas como la de 80 °C y 55 °C, también puede estar relacionado con la presencia de azúcares y proteínas, lo cual puede resultar en la reacción de Maillard (pardeamiento no enzimático). Específicamente la presencia de azúcares o de productos resultantes de su degradación puede acelerar la pérdida de antocianinas, ya que esta velocidad de reacción sigue la tasa de conversión de azúcares a furfural. Este último compuesto, que es un derivado de aldopentosas, así como hidroximetilfurfural, que es un derivado de ceto-hexosas, ambos son productos resultantes de la reacción de Maillard que se condensan junto con las antocianinas; estas reacciones conducen a la formación de compuestos con coloración marrón como se observó en ambas temperaturas (Tonon *et al.*, 2010; Sui *et al.*, 2014).

Temperatura 55 °C							
Tiempo (horas)	Repetición			Tiempo (horas)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				4,5			
0,5				5			
1				5,5			
1,5				6,0			
2				6,5			
2,5				7,0			
3				7,5			
3,5				8			
4							

Figura 28. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café a 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 55 °C a lo largo de 8 horas.

Temperatura 25 °C

Para la temperatura de 25 °C, de igual forma se determinaron las gráficas de los parámetros de color: luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) (figura A 7, anexo 9.7), el contenido de antocianinas monoméricas totales (ver figura 34) e índice de oscurecimiento en función del tiempo (figura A 10., anexo 9.7).

A partir de estos resultados se realizó un análisis de varianza al igual que se hizo con las temperaturas anteriores. Para este caso todos los parámetros de color: L*, C* y h* presentaron efectos significativos en el tiempo ($p < 0,0283$), por lo que se calculó las regresiones lineales como se observa a continuación.

Cuadro XII. Regresiones lineales de los parámetros de color, obtenidas en la evaluación del efecto de la temperatura 25 °C sobre la estabilidad del extracto rojo de la broza de café en disolución a lo largo de 216 horas.

Parámetro	Ecuación	Pendiente	Intercepto	R ²	Valor P
L*	$L^* = 42,43543 - 0,002789 * \text{tiempo}$	-0,002789	42,43543	0,09626	0,0283*
C*	$C^* = 49,438794 + 0,0073205 * \text{tiempo}$	0,0073205	49,438794	0,135771	0,0085*
h*	$h^* = 43,654569 + 0,0355923 * \text{tiempo}$	0,0355923	43,654569	0,814071	<0,0001*

*Efecto significativo ($p < 0,05$)

Estos resultados indicaron que, en las mismas condiciones de análisis, al aumentar el tiempo en 1 hora, la luminosidad L* del extracto en disolución disminuyó 0,0028, la cromaticidad C* del extracto en disolución aumentó 0,0073 y el ángulo de tonalidad h* del extracto en disolución aumentó 0,036°.

Aunque no se trata de temperaturas tan altas como las dos temperaturas descritas anteriormente, con estos resultados se dejó evidencia de que a temperatura de 25 °C se presentó

degradación de antocianinas y por ende cambios en la coloración del extracto rojo de broza de café como se observa en la Figura 29.

Generalmente, se ha observado que a altas temperaturas se da una rápida disminución del pigmento, lo cual se ha estudiado por diferentes investigadores, debido a su gran importancia. Sin embargo, Janna *et al.* (2007) exponen como diferentes investigaciones han encontrado que extractos de antocianinas se mantienen por mayor tiempo a temperatura de 25 °C, mostrando un porcentaje de 7-20% de menor degradación con respecto a otras temperaturas cercanas. Este resultado es consistente con los hallazgos de otros investigadores que informaron que las temperaturas elevadas provocan un aumento de la degradación del pigmento y que es más lento a 25 °C.




















































Temperatura 25 °C							
Tiempo (horas)	Repetición			Tiempo (horas)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				48			
2				72			
4				96			
6				120			
8				144			
16				168			
24				192			
32				216			
40							

Figura 29. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura a 25 °C a lo largo de 216 horas.

Temperatura 4 °C

Al igual que con las temperaturas anteriores para la temperatura de 4 °C, se determinaron los parámetros de color (observas figura A 8., anexo 9.7), el contenido de antocianinas monoméricas totales (ver figura 34) e índice de oscurecimiento (figura A 10., anexo 9.7).

Con el análisis de varianza se observó que no se demostró efecto significativo en el tiempo para la variable luminosidad L* (p=0,1209) ni para la variable tonalidad h* (p=0,7974). Sin embargo, para el parámetro cromaticidad C* se obtuvo diferencias significativas para la variable tiempo (p<0,0001). Por lo tanto, se realizaron regresiones lineales, la ecuación y la gráfica que describen la relación entre el parámetro de cromaticidad C* y el tiempo se muestra a continuación.

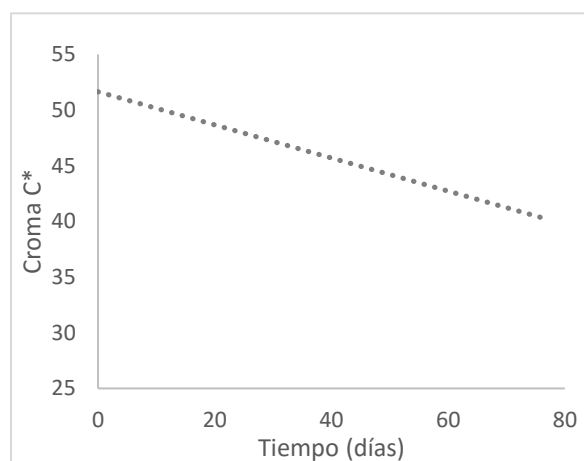


Figura 30. Recta de regresión para el parámetro de cromaticidad C* obtenida durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo de broza de café ante el efecto de la temperatura 4 °C por un período de 76 días.

$$\text{Cromaticidad, } C^* = 51,634903 - 0,006181 * \text{Tiempo} \quad [25]$$

A partir de estos resultados, se puede observar que, al aumentar el tiempo en 1 día, la cromaticidad C* del extracto en disolución disminuyó 0,0062, con un coeficiente de correlación R² de 45,74%.

En la Figura 31, se presentan las imágenes para cada tratamiento y no fue perceptible visualmente un cambio de coloración del extracto, debido a que la saturación o cromaticidad (C*) es el atributo que permite diferenciar entre un estímulo más o menos cromático. Es decir, la

sensación visual débil-fuerte, pálido-intenso, llamativo-apagado de un color lo define la cromaticidad, por lo tanto, lo que ocurre es que se da una transformación del color a más pálido y menos llamativo, a lo largo del tiempo.

Con las temperaturas que fueron analizadas anteriormente se evidencia como al aumentar la temperatura se dio una degradación acelerada de las antocianinas lo cual se esperaba ya que estos pigmentos son muy termo sensibles; por lo tanto, a menor temperatura se esperaba de igual forma una menor degradación (Tonon *et al.*, 2010).

Este comportamiento de las antocianinas ante la temperatura ha sido corroborado en diferentes investigaciones; por ejemplo, al evaluar la estabilidad de la malvidina-3-glucósido de vinos de uva roja *V. Vinifera* se observó una aceleración de la degradación al incrementar la temperatura de 4 ± 1 °C a 29 ± 3 °C. También se encontró una tasa de degradación 3,5 veces mayor en muestras de pulpa de açai que se almacenaron a temperatura ambiente, con respecto a las muestras almacenadas a temperatura de refrigeración a 4 °C. De igual forma, se estudió la estabilidad de las antocianinas presentes en la zanahoria negra y se verificó una pérdida de 11% después de 64 días de almacenamiento a 4 °C, mientras que a 25 °C la pérdida fue de 33% (Gris *et al.*, 2007; Tonon *et al.*, 2010).








































Temperatura 4 °C							
Tiempo (días)	Repetición			Tiempo (días)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				30			
3				35			
6				40			
9				45			
15				55			
20				76			
25							

Figura 31. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura 4 °C por un período de 76 días.

Temperatura -20 °C

Para observar el comportamiento a la temperatura de -20 °C, también se determinaron los mismos parámetros de color de las temperaturas anteriores (ver figura A 9., anexo 9.7) el contenido de antocianinas monoméricas totales (ver figura 34) e índice de oscurecimiento (figura A 10, anexo 9.7).

Con el análisis de varianza se observó que se presentó efecto significativo en el tiempo para la variable luminosidad L^* ($p=0,0025$) y para el parámetro cromaticidad C^* ($p=0,0417$); mientras que para la variable tonalidad h^* no se evidenció diferencias significativas en el tiempo ($p=0,3388$).

Por lo tanto, se realizaron las regresiones lineales, la ecuación y las gráficas que describen la relación entre estos parámetros de color y el tiempo, como se muestra a continuación

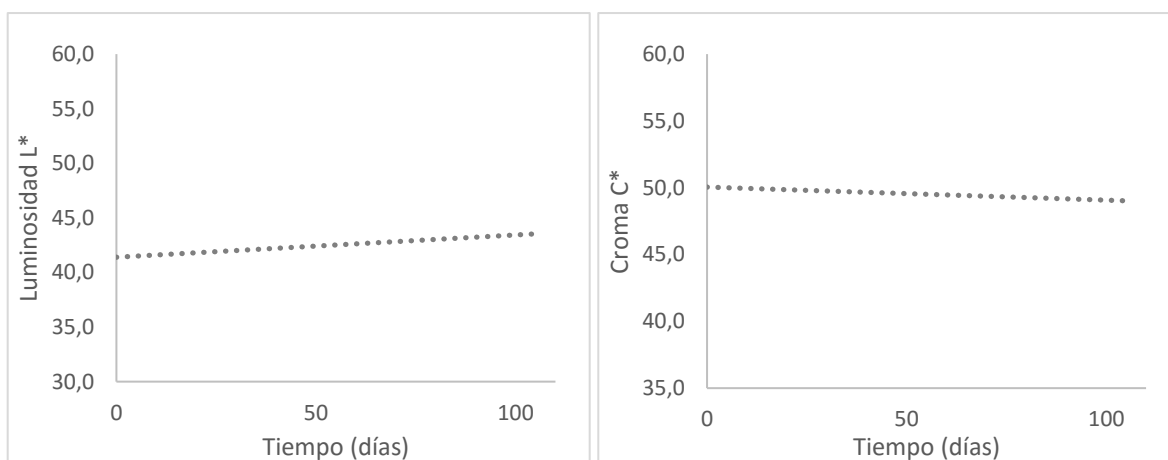


Figura 32. Rectas de regresión de los parámetros de color luminosidad y cromaticidad, obtenidas durante la evaluación del efecto de la temperatura -20 °C en la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución a lo largo de 106 días.

Las ecuaciones del modelo que describen la relación estadística para cada variable, se muestran a continuación:

$$\text{Luminosidad, } L^* = 41,397968 + 0,0008486 * \text{Tiempo} \quad [26]$$

$$\text{Cromaticidad, } C^* = 50,04943 - 0,000408 * \text{Tiempo} \quad [27]$$

Las regresiones indicaron que manteniendo las mismas condiciones el parámetro de luminosidad va a aumentar 0,00085 al paso de un día, y el parámetro cromaticidad va a disminuir 0,00041 al paso de un día; cuando las muestras se encontraron en congelación a -20 °C. Estos resultados con un coeficiente de correlación R² de 28,24% para luminosidad L* y 13,99% para cromaticidad C*.

A estas condiciones de congelación la energía cinética de las moléculas es menor por lo que disminuye el número de choques efectivos ocasionando que la reacción de degradación se dé muy lentamente, por ello el análisis se realizó a lo largo de tres meses y medio. Aunque los resultados obtenidos fueron cambios significativos en el tiempo, estos cambios son tan pequeños que son casi imperceptibles, como se puede observar en la Figura 42 donde se presentan las imágenes para cada muestra de extracto rojo de broza de café a diferentes tiempos (Alcañiz, 1995; Díaz, 2010).


































Temperatura -20 °C							
Tiempo (días)	Repetición			Tiempo (días)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				41			
6				48			
13				61			
20				76			
27				106			
34							

Figura 33. Fotografías de las disoluciones del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura -20 °C, por un período de 106 días.

Cinética Química

El estudio de cinética química fue realizado a partir de los resultados de antocianinas totales obtenidos durante la evaluación de las diferentes temperaturas, en todos los casos el contenido de antocianinas totales presentó diferencias significativas en el tiempo ($p=0,0001$) exceptuando la temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (observar anexos 9.12, 9.13, 9.14, 9.15, 9.16). Estos resultados fueron ajustados a un modelo de degradación de primer orden como se observa en las gráficas de la figura 34.

La descomposición térmica de las antocianinas y específicamente la cianidina 3-o-glucósido y la cianidina-3-o-rutinósido, ha sido reportada en estudios previos de diferentes autores, como una reacción cinética de primer orden (Kirca & Cemeroğlu, 2003; Wang & Xu, 2007; Tonon et al., 2010; Jing et al., 2012; Li et al., 2013; Sui *et al.*, 2014). Por lo tanto, el modelo de degradación y la ecuación se ajustaban como se señaló en la sección 3.5 del marco teórico, y se utilizó de forma logarítmica como se presenta en la ecuación (5).

$$[A]_t = [A]_o \exp(-kt) \quad [5]$$

O en forma logarítmica,

$$\text{Ln}[A] = \text{Ln}[A]_o - kt \quad [6]$$

La principal finalidad de la cinética química es establecer el mecanismo de las reacciones, para lo cual es necesario determinar la ecuación de cinética, los órdenes de reacción con respecto a las distintas especies, la constante de velocidad “ k ” y la dependencia de esta última con la temperatura, los tiempos de vida media “ $t_{1/2}$ ”; y a partir de estos resultados podemos además determinar la energía de activación “ E_a ”, que es la energía que deben absorber los reactivos para alcanzar el estado activado (barrera de activación) (Díaz, 2010). Algunos de estos parámetros fueron establecidos a partir de las gráficas que se muestra a continuación y los datos se reportan en el cuadro XIII.

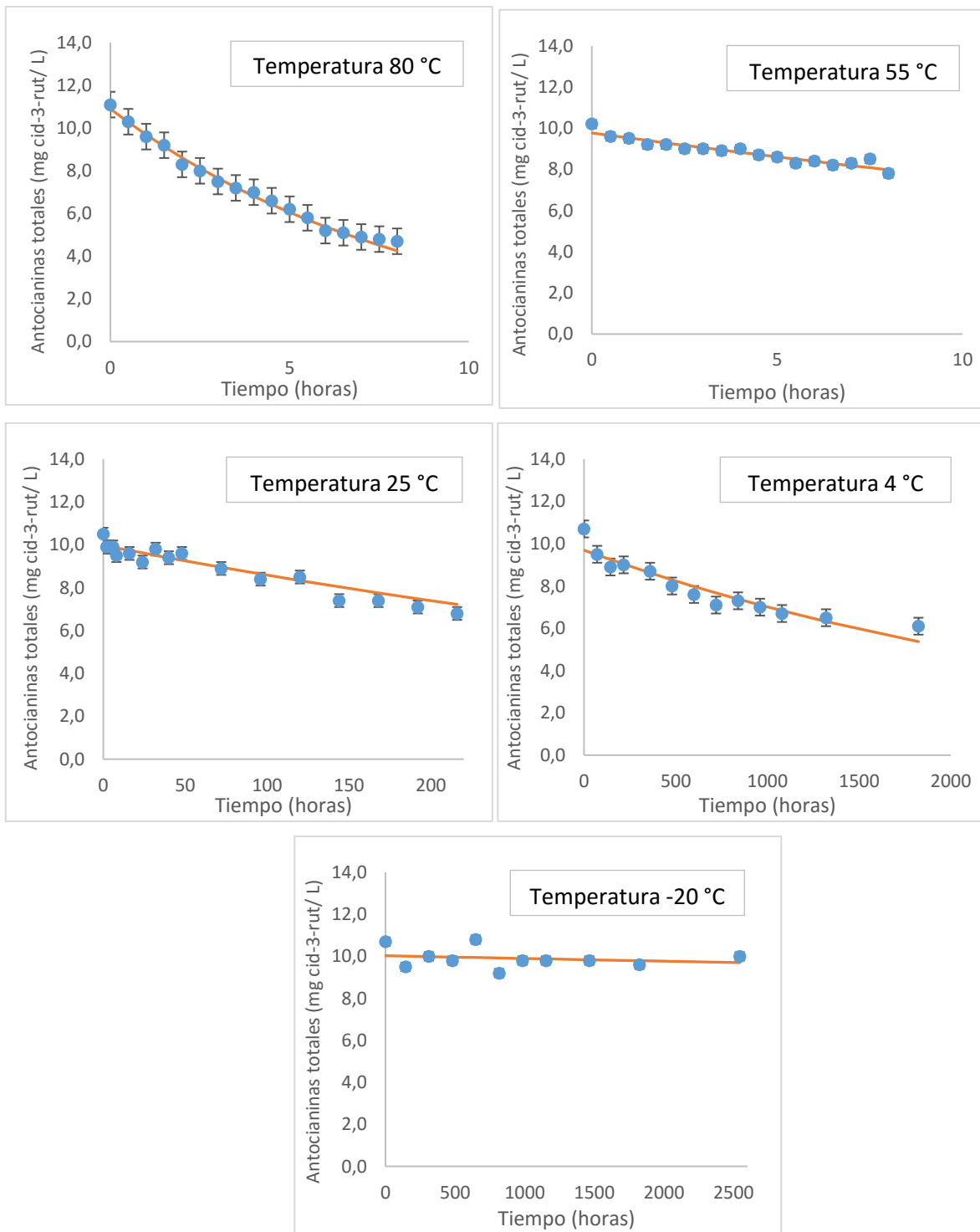


Figura 34. Cinéticas de degradación a diferentes temperaturas de las antocianinas presentes en un extracto rojo de broza de café en disolución al 4%.

Cuadro XIII. Parámetros cinéticos de degradación de antocianinas presentes en disolución del extracto rojo de broza de café al 4%, durante la evaluación del efecto de la temperatura.

Temperatura		Ecuación de cinética	k (1/h)	t ½ (h)	E _a (KJ/mol)
°C	K				
80	353,15	[A]= 10,8986 *exp (-0,117616*tiempo)	0,117616	6	67,29
55	328,15	[A]= 9,7723*exp (-0,025354*tiempo)	0,025354	27	
25	298,15	[A]= 9,9782*exp (-0,001496*tiempo)	0,001496	463	
4	277,15	[A]= 9,6935*exp (-0,000324*tiempo)	0,000324	2140	
-20	253,15	[A]= 10,0280*exp (-0,000013*tiempo)	0,000013	53171	

Como se observa la constante de velocidad k fue en aumento conforme aumentó la temperatura, con valores de 0,000013 (1/h) para la temperatura de -20 °C, de 0,00032 (1/h) para la temperatura de 4 °C, de 0,0014 (1/h) para la temperatura de 25 °C, de 0,025 (1/h) para la temperatura de 55 °C y de 0,12 (1/h) para la temperatura de 80 °C; es decir, el aumento de la temperatura dio lugar a una degradación más rápida de antocianinas, lo cual se esperaba puesto que estos pigmentos son muy termo sensibles como se mencionó anteriormente (Tonon *et al.*, 2010).

La explicación radica además en que un aumento en la temperatura implica una mayor energía cinética de las moléculas. Por lo que al aumentar la velocidad a la que se mueven las partículas, aumentará el número de colisiones y la violencia de éstas y, por tanto, el número de moléculas con una energía que es igual o mayor que la energía de activación, haciendo también que se eleve el número de choques o colisiones efectivos (Alcañiz, 1995; Díaz, 2010).

Asimismo, se determinó, el tiempo de reducción a la mitad o vida media, el cual indica el tiempo transcurrido al que se ha reducido la concentración de reactivo (antocianinas) a la mitad, que como se observa fue dependiente de la temperatura, a mayor temperatura menor vida media (Van Boekel, 2009).

Li *et al.* (2013), reportaron que las antocianinas de pulpa de camote morada eran más estables térmicamente con $t_{1/2}$ de 96,3 ,25,6 y 12,6 h a pH 3 a 80, 90 y 100 °C. Kirca *et al.* (2007) reportaron que los valores de $t_{1/2}$ de las antocianinas de la zanahoria negra a 70, 80 y 90 °C fueron 25,1, 10,0, y 6,3 h, respectivamente, tanto a pH 3 y pH 4. Wang & Xu (2007), encontró que los valores de $t_{1/2}$ de las antocianinas de jugo de mora a los 60, 70, 80 y 90 °C fueron, respectivamente,

16,7, 8,8, 4,7 y 2,9 a pH 2,86. Son resultados similares, en comparación con los obtenidos para las antocianinas del extracto rojo de broza de café, que fueron de 6, 27 y 463 horas, para las temperaturas de 80, 55 y 25 °C, respectivamente. Por lo tanto, las antocianinas del extracto de broza de café fueron menos estables a altas temperaturas que las presentes en la pulpa de camote morada; sin embargo, fueron bastante estables a temperatura ambiente.

Por otro lado, de igual manera se determinó la energía de activación la cual corresponde a la energía necesaria para activar o iniciar una reacción que es dependiente de las condiciones del medio en que se encuentre. Una energía de activación alta corresponde a una velocidad de reacción muy sensible a la temperatura (la representación de Arrhenius tiene una pendiente grande) y, una energía de activación pequeña corresponde a una velocidad de reacción relativamente insensible a cambios de temperatura, pues al tener una energía de activación baja con o sin temperatura de igual forma se da la reacción (Li et al., 2013).

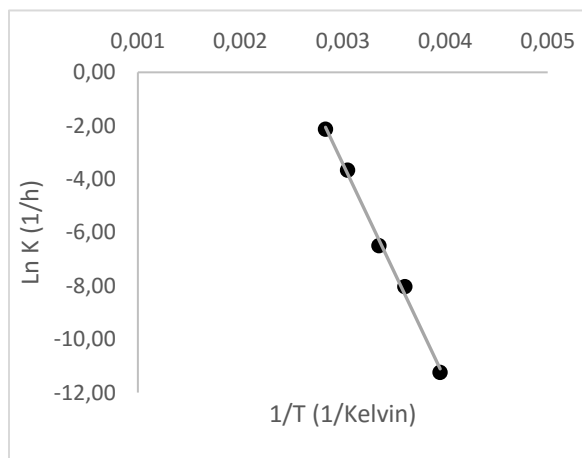


Figura 35. Determinación de la energía de activación (E_a) de la degradación de las antocianinas presentes en el extracto rojo en polvo de la broza de café al 4%.

Al comparar el resultado obtenido con otros resultados reportados en diferentes investigaciones (cuadro XIV), se observa que la mayoría de los valores de E_a reportados están en el rango de 20-200 KJ/mol. El valor de E_a en este caso fue de 67,29 KJ/mol, es decir, la energía necesaria para que se inicie las reacciones de degradación de las antocianinas cianidina-3-glucósido y para cianidina-3-rutinósido del extracto rojo en polvo de la broza de café, está en acuerdo con los valores reportados (Sui et al., 2014).

Cuadro XIV. Energías de activación determinadas durante el estudio cinético de degradación de antocianinas de frutas y vegetales obtenidos en diferentes investigaciones siguiendo un procesamiento térmico.

N°	Fuente	Antocianinas	E_a (KJ/mol)	Referencia
1	Flor de Jamaica	Delfinidina-3-xylosylglucósido Cianidina-3- xylosylglucósido	$E_a= 66,22$	Aurelio <i>et al.</i> , 2008
2	Uva (Grape pomace)	Delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina, malvidina	$E_a= 65,32$	Mishra <i>et al.</i> , 2008
3	Camote morado	Extracto de antocianinas	$E_a=72,49$	Reyes & Cisneros-Zevallos, 2007
4	Camote rojo	Extracto de antocianinas	$E_a= 74,24$	Reyes & Cisneros-Zevallos, 2007
5	Uva	Extracto de antocianinas	$E_a=76,61$	Reyes & Cisneros-Zevallos, 2007
6	Zanahoria púrpura	Extracto de antocianinas	$E_a=88,79$	Reyes & Cisneros-Zevallos, 2007
7	Zanahoria negra	Antocianinas monoméricas	$E_a=78,1$	Kirca <i>et al.</i> , 2007
8	Maíz morado	Extracto de antocianinas	$E_a= 18,3$	Yang <i>et al.</i> , 2008
9	Puré de ciruela	Antocianinas totales	$E_a= 37,48$	Ahmed <i>et al.</i> , 2004
10	Piel de uva	Extracto de antocianinas	$E_a= 50,0$	Dyrby <i>et al.</i> , 2001
11	Zarzaparrilla	Extracto de antocianinas	$E_a= 77,0$	Dyrby <i>et al.</i> , 2001
12	Saúco	Extracto de antocianinas	$E_a= 56,0$	Dyrby <i>et al.</i> , 2001
13	Camote morado	Extracto de antocianinas	$E_a= 111,57$	Li <i>et al.</i> , 2013
14	Jugo de naranja con antocianinas de zanahoria negra	Extracto de antocianinas	$E_a=72,0$	Kirca & Cemeroğlu, 2003
15	Frambuesa	Antocianinas monoméricas	$E_a=97,1$	Kirca & Cemeroğlu, 2003
16	Sistema modelo	Cianidina-3-rutinósido y peonidina-3-rutinósido	$E_a=99,2-118$	Kirca & Cemeroğlu, 2003
17	Sistemas modelo	Cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido	$E_a=92,5-96,3$ $E_a=91,5-93,0$	Sui <i>et al.</i> , 2014

Por otro lado, al observar los índices de oscurecimiento (ver anexo 9.7, Figura A 10.), se ratifica la degradación de las antocianianinas en el tiempo, pues para cada temperatura se presentó efecto significativo para la variable tiempo con excepción de la temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p=0,1464$) (ver anexos de 9.12 a 9.16).

Las gráficas de regresión y sus correspondientes ecuaciones se muestran a continuación.

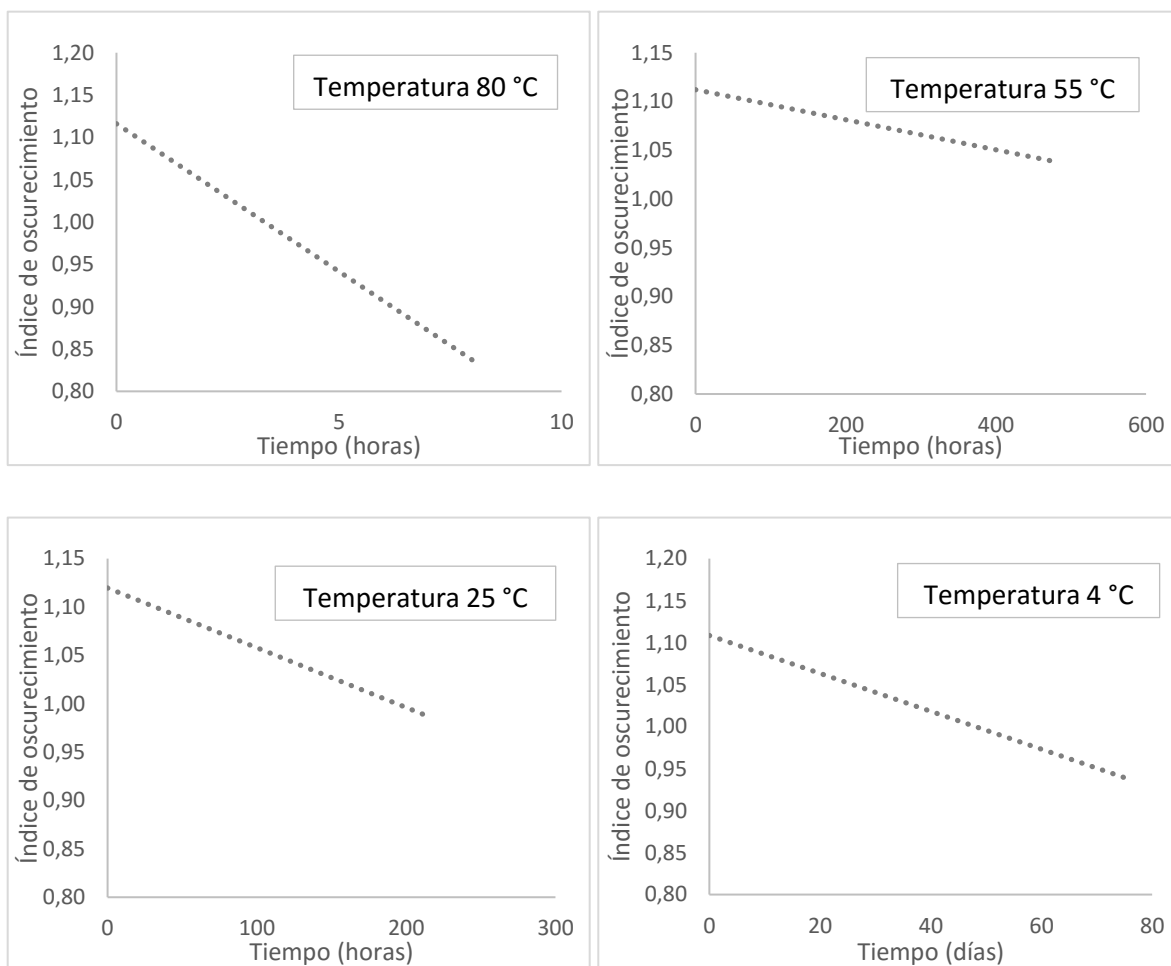


Figura 36. Rectas de regresión para el índice de oscurecimiento obtenidas durante la evaluación del efecto de la temperatura en la estabilidad del extracto rojo de broza de café en disolución al 4%.

$$\text{Índice de oscurecimiento (80 °C)} = 1,1142484 - 0,034493 * \text{Tiempo} \quad [28]$$

$$\text{Índice de oscurecimiento (55 °C)} = 1,1121503 - 0,009268 * \text{Tiempo} \quad [29]$$

$$\text{Índice de oscurecimiento (25 °C)} = 1,1257457 - 0,000635 * \text{Tiempo} \quad [30]$$

$$\text{Índice de oscurecimiento (4 °C)} = 1,1073564 - 0,0000942 * \text{Tiempo} \quad [31]$$

Esto indica que bajo las mismas condiciones el índice de oscurecimiento disminuyó en 0,034 al paso de una hora, a la temperatura de 80 °C. El coeficiente de correlación, R^2 , fue de

96,67%. Mientras que, a la temperatura de 55 °C, bajo las mismas condiciones el índice de oscurecimiento disminuyó en 0,0093 al paso de una hora, con un coeficiente de correlación, R^2 de 91,06%. A la temperatura de 25 °C, el índice de oscurecimiento disminuyó en 0,000635 al paso de una hora, y el coeficiente de correlación, R^2 , fue de 90,85%. Y por último para la temperatura de 4 °C, el índice de oscurecimiento disminuyó en 0,000094 al paso de un día, con un coeficiente de correlación, R^2 , fue de 92,56%. Es decir, la disminución de la temperatura disminuye la velocidad de la reacción de pardeamiento no enzimático también.

5.5 Evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria

5.5.1 Yogur

Adicionalmente a las evaluaciones en sistema modelo, se evaluó el extracto sobre matrices alimentarias. Se aplicó en yogur natural (ver anexo 9.3) y se determinaron los parámetros de color: luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*), comparando con el colorante artificial FD&C Rojo 40.

Mediante el análisis estadístico de los resultados que se muestran anteriormente se determinó que el parámetro de color luminosidad (L^*) y ángulo de tonalidad (h^*) obtuvieron diferencias significativas para la variable tiempo ($p < 0,0006$), respectivamente. Para la variable tipo de colorante también se obtuvieron diferentes significativas ($p < 0,0001$) en ambos casos; y no se obtuvo diferencias significativas para la interacción tiempo*tipo de colorante ($p = 0,1072$) (Ver anexo 9.17).

Por lo tanto, para estas diferencias encontradas en los parámetros de color L^* y h^* a lo largo del tiempo, se realizaron regresiones lineales, como se muestra a continuación.

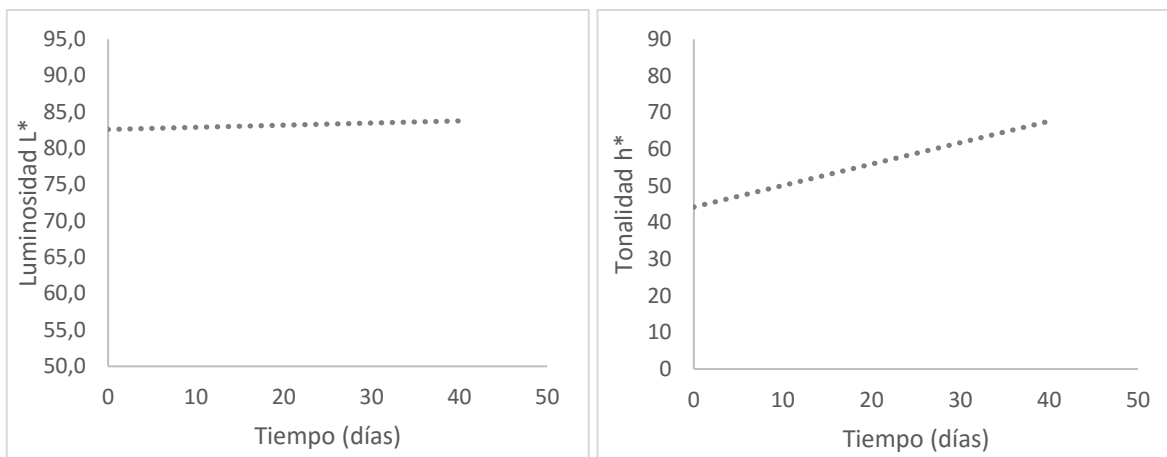


Figura 37. Rectas de regresión del parámetro de color luminosidad L* (lado izquierdo) y del parámetro tonalidad h* (lado derecho), obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 en yogur al 0,0006%, a lo largo de 40 días.

Las ecuaciones del modelo que describen la relación estadística para cada variable, se muestran a continuación:

$$\text{Luminosidad, } L^* = 82,5867 + 0,0298 * \text{Tiempo} \quad [32]$$

$$\text{Tonalidad, } h^* = 44,0495 + 0,5907 * \text{Tiempo} \quad [33]$$

Esto indica que manteniendo las mismas condiciones el parámetro de luminosidad ésta va a aumentar 0,0298, al paso de un día, y el ángulo de tonalidad va a aumentar 0,5907° al paso de un día; en una muestra de yogur natural. Estos resultados con un coeficiente de correlación R² de 97,40% para luminosidad L* y 82,45% para tonalidad h*.

Además, se realizó una comparación a través de una t-student (p<0,05), para evidenciar la diferencia significativa entre ambos tipos de colorantes

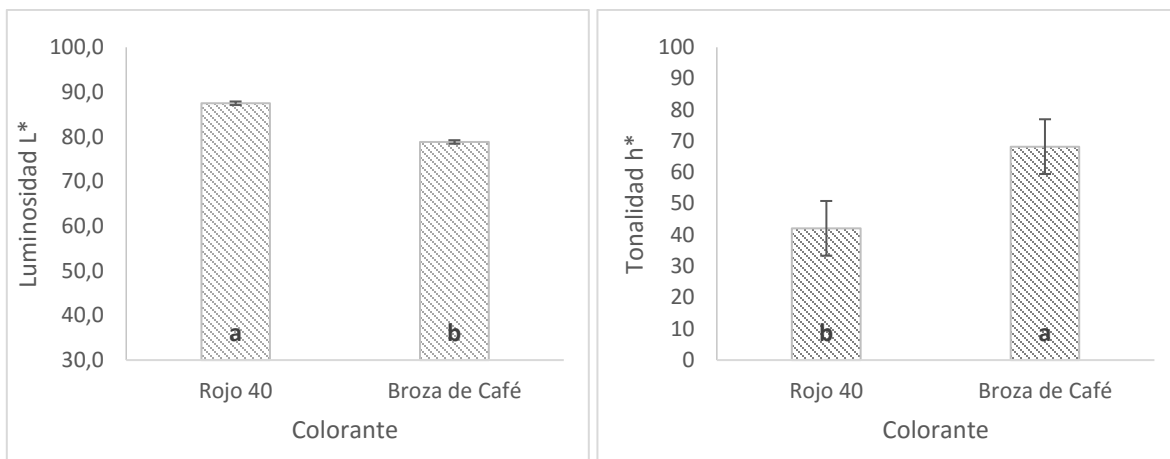


Figura 38. Comparación de medias para los parámetros de color luminosidad L* (lado izquierdo) y tonalidad h* (lado derecho), obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006% en yogur, por un período de 40 días.

Como se puede observar a través de la figura 38, el parámetro luminosidad fue significativamente mayor para el FD&C Rojo No. 40, mientras que fue significativamente menor en el ángulo de tonalidad (h*); es decir se acercó más a tonos claros, pero conservando el tono ligeramente rosado del producto, como se puede observar en la figura 39, mientras que las muestras de yogur que contenían el extracto rojo de broza de café se tornaron color café y tonos más oscuros.

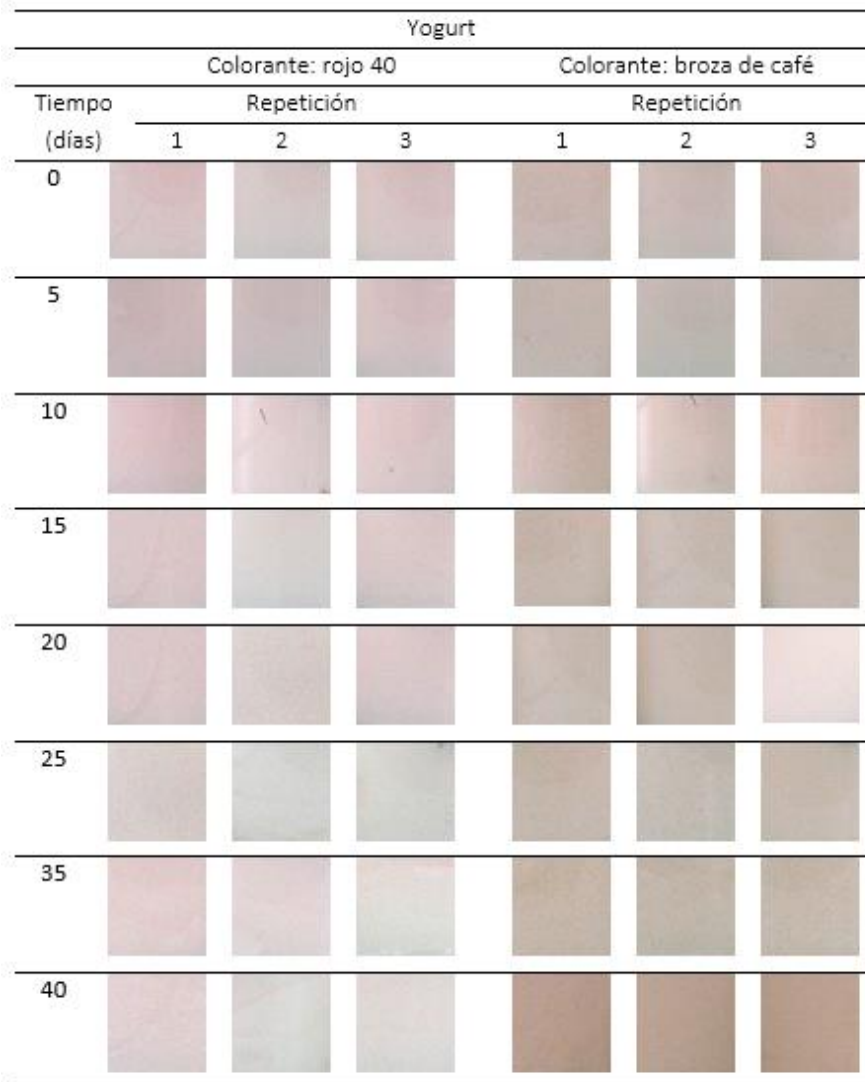


Figura 39. Fotografías de las muestras de yogurt durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006%, por un período de 40 días.

Por otro parte, para el parámetro cromaticidad (C^*), se encontró diferencias significativas en el tiempo ($p=0,0001$), para la variable tipo de colorante ($p<0,0001$) y para la interacción ($p=0,0009$). Es decir, en cuanto a la medición de color se obtuvo diferencia significativa en el tiempo de forma dependiente al tipo de colorante, por lo que su análisis se realiza a partir de la interacción.

Cuadro XV. Regresión lineal del parámetro de color cromaticidad (C*), obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 6% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,0006% en yogur, a lo largo de 40 días.

Tratamiento	Ecuación	Pendiente	Intercepto	R ²	Valor P
Rojo 40	C* = 16,274775- 0,1213213*Tiempo	-0,1213213	16,274775	0,443966	0,0004*
Broza de café	C* = 17,077027- 0,0103303*Tiempo	-0,0103303	17,077027	0,037923	0,3618

*Efecto significativo (p<0,05)

Para la variable cromaticidad (C*), se obtuvo efecto significativo solo para el colorante artificial FD&C Rojo No. 40; es decir hubo una reducción en la sensación visual pálido-intenso acercándose a tonos más pálidos a lo largo del tiempo. Manteniendo las mismas condiciones el parámetro de cromaticidad disminuyó 0,1213 al paso de un día, mientras que para el extracto rojo en polvo de broza de café este cambio no fue significativo en el tiempo.

En diversas investigaciones se han reportado resultados que demuestran que las antocianinas cumplen con los requisitos para ser utilizados como colorantes en sistemas de alimentos como el yogur. Por ejemplo, Giusti y Wrolstad (2003) reportaron que las antocianinas de col roja y de rábano presentan alta intensidad de tonalidad roja en los yogures y cremas ácidas con un pH que oscila entre 4,2 y 4,5 (Gris *et al.*, 2007).

En muestras como los helados y yogur que no eran sometidas bajo un proceso de calentamiento, se observó que mantenían mayor enrojecimiento del color que aquellas muestras que se habían sometido a un proceso de calentamiento (Gris *et al.*, 2007; Prudencio *et al.*, 2008; Jing & Giusti, 2015).

Además, se observó que las antocianinas en sistemas lácteos podrían formar complejos con macromoléculas que protegen las antocianinas de la degradación. Algunos investigadores sugieren que la grasa en la leche y otros componentes tales como proteínas podrían proteger a las antocianinas de la degradación durante el tratamiento térmico, aunado a que las antocianinas pueden aumentar la estabilidad al formar complejos de copigmentación intermolecular con

polifenoles (Jing & Giusti, 2015). En el caso de esta última investigación, también se observó que los iones calcio estabilizaron las antocianinas, que pudo ser el caso en el yogur analizado.

5.5.2 Sirope de fresa

Se evaluó el pigmento en sirope de fresa (ver ficha técnica en anexo 9.4) y se determinaron los parámetros de color: luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y tonalidad (h^*), comparando de igual forma con el colorante artificial FD&C Rojo 40.

Mediante análisis de varianza se determinó que para los parámetros luminosidad (L^*) existían diferencias significativas en la variable tiempo ($p=0,0011$), en la variable tipo de colorante ($p<0,0001$) y en la interacción tiempo x tipo de colorante ($p=0,0167$). El parámetro cromaticidad (C^*), obtuvo diferencias significativas para tiempo ($p=0,0035$), para tipo de colorante ($p<0,0001$) y para su interacción ($p=0,0044$). De igual forma, para el ángulo de tonalidad (h^*), se observaron diferencias significativas para la variable tiempo ($p<0,0001$), para la variable tipo de colorante ($p<0,0001$) y para la interacción tiempo*tipo de colorante ($p<0,0001$) (Ver anexo 9.18). Por lo tanto, se realiza análisis de regresiones lineales a partir de la interacción significativa en los tres parámetros de color, como se observa en el cuadro XVI.

Cuadro XVI. Regresiones lineales de los parámetros de color, obtenidas durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café al 4% y del FD&C Rojo No. 40 al 0,004% en sirope de fresa, por un período de 90 días.

Parámetro	Tratamiento	Ecuación	Pendiente ¹	Intercepto	R ²	Valor P
L*	Rojo 40	L* = 33,409061 + 0,0379316*Tiempo	0,0379316	33,409061	0,087805	0,0046*
	Broza de café	L* = 32,957604 + 0,0105944*Tiempo	0,0105944	32,957604	0,00854	0,5460
C*	Rojo 40	C* = 71,563934 + 0,0007358*Tiempo	0,0007358	71,563934	0,000308	0,9089
	Broza de café	C* = 56,820792 + 0,0541903*Tiempo	0,0541903	56,820792	0,188977	0,0028*
h*	Rojo 40	h* = 44,533318 - 0,0421777*Tiempo	0,0421777 ^b	44,533318	0,284001	0,0002*
	Broza de café	h* = 47,760838 + 0,1358377*Tiempo	0,1358377 ^a	47,760838	0,661414	<0.0001*

*Efecto significativo (p<0,05);¹Letras diferentes en una misma columna representan diferencias significativas con $\alpha = 0,05$

En cuanto a la variable luminosidad (L*) que corresponde a la sensación claro-oscuro presentó diferencia significativa en el tiempo únicamente para el colorante FD&C Rojo No.40; es decir, manteniendo las mismas condiciones el parámetro de luminosidad aumentó 0,03793 al paso de un día, mientras que para el extracto rojo de broza de café este cambio no fue significativo en el tiempo. Aunque al observar las Figuras 40 y 41, las muestras con extracto rojo en polvo de broza de café aparentaban tonalidades más oscuras a lo largo del tiempo, que el cambio que se observó en el caso del colorante artificial.

La variable cromaticidad (C*) que hace referencia a la sensación pálido-intenso, mostró diferencia significativa para las muestras con extracto rojo de broza de café; caso contrario al anterior; se concluyó que manteniendo las mismas condiciones de análisis el parámetro cromaticidad aumentó 0,05419 al paso de un día, mientras que para el FD&C Rojo No.40 no hubo un cambio significativo en el tiempo, para evidenciar este efecto se puede observar las Figuras 40 y 41 antes mencionadas.

En cuanto al ángulo de tonalidad (h^*) que en este caso fue la referencia para el color rojo se observó diferencias significativas en el tiempo para ambos casos; por lo que se procedió a realizar un análisis de varianza de las pendientes donde se obtuvo diferencias significativas entre tipos de colorantes comparados por una t-student ($p < 0,05$). Bajo las mismas condiciones el ángulo de tonalidad en las muestras que contienen colorante FD&C Rojo No.40 disminuyó $0,042^\circ$ al paso de un día, es decir, se volvió más rojo (ver figura 40); mientras que las muestras con extracto rojo de broza de café aumentó el ángulo de tonalidad en $0,1358^\circ$ al paso de un día, es decir, la tonalidad se transformó de rojo a amarillo (ver figura 41).

Este último cambio, puede ser debido a la pérdida de antocianinas que evidencian un color rojo y la presencia de productos pardos formados durante las reacciones de degradación de Maillard que se evidencian en tonos cafés, y otras sustancias producidas a partir de la destrucción de calentamiento de antocianina-3-glucósido como: chalconas, α -dicetona, ácido protochoique, quercitina y aldehído de floroglucinol; estas sustancias producen combinaciones de color marrón que reducen la calidad y claridad de color, como se observa en las últimas imágenes de la figura 52 (Tonon *et al.*, 2010; Hassani & Sharifi, 2012).

La degradación gradual del color rojo en antocianinas de acerola y açai también se observó visualmente en diferentes sistemas de alimentos como bebidas suaves isotónicas. La intensidad de color rojo disminuyó durante el almacenamiento de todos los sistemas, y fueron acompañadas de los cambios de tonalidad desde rojo a color amarillo, aumentando los valores de h^* durante el tiempo de experimento. Además, se corroboró que la degradación de antocianinas puede ser fácilmente percibido por el ojo humano y que los cambios visuales del color se dieron en 5 y 300 h de almacenamiento (Mercadante, 2007).

Sirope de fresa con rojo 40							
Tiempo (días)	Repetición			Tiempo (días)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				40			
5				45			
10				50			
15				55			
20				60			
25				74			
30				90			
35							

Figura 40. Fotografías de las muestras de sirope de fresa durante la evaluación de la estabilidad del FD&C Rojo No. 40 al 0,004%, por un período de 90 días.

Sirope de fresa con broza de café							
Tiempo (días)	Repetición			Tiempo (días)	Repetición		
	1	2	3		1	2	3
0				40			
5				45			
10				50			
15				55			
20				60			
25				74			
30				90			
35							

Figura 41. Fotografías de las muestras de sirope de fresa durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de broza de café al 4%, por un período de 90 días.

CONCLUSIONES

Se comprueba que hay un efecto del pH sobre la estabilidad de las antocianinas presentes en el extracto rojo en polvo de la broza de café, al observar cómo varía el color al cambiar el pH del medio.

Se concluye que a valores mayores de pH 2, el cambio de color y el contenido de antocianinas es significativamente diferente a otros pH, sin embargo, no es significativamente diferente al pH 3 en la variable tonalidad (h^*), por lo que se seleccionó este último como pH de trabajo a lo largo del estudio.

Se observa un efecto positivo en la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café ante la presencia de iones calcio, pues se encuentran diferencias significativas entre la presencia o ausencia total de calcio. Este efecto es más evidente al alcanzar la concentración máxima de estudio, concentración de 200mg/ 100 mL de calcio donde la pérdida en el contenido de antocianinas fue menor.

El efecto de luz no es perceptible visualmente en los parámetros de color L^* , C^* y h^* . Pero si existen diferencias significativas entre la degradación del contenido de antocianinas expuestas a la luz en comparación con las que se encontraban en oscuridad, aunque en muy baja velocidad.

Para todas las temperaturas evaluadas, exceptuando la de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observó una degradación significativa del contenido de antocianinas en el tiempo. Además, en todas las temperaturas se observó cambios de coloración durante el tiempo de almacenamiento, sin embargo la velocidad de degradación fue menor a menor temperatura.

La cinética de la reacción de degradación de las antocianinas totales presentes en el extracto ante el efecto de la temperatura, mostró vidas medias desde 6 horas a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 53171 horas a la temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, un equivalente a 6 años; y una alta energía de activación de la reacción de $67,29\text{ KJ/mol}$.

En cuanto a las matrices alimentarias que contenían el extracto, el yogur presentó variación del color en el tiempo para el parámetro L^* y h^* , y el sirope de fresa para los parámetros C^* y h^* , ambos casos con diferencias significativas al ser comparado con FD&C Rojo No. 40. Ambos productos, se volvían menos rojos y variaban su luminosidad o intensidad de color a lo largo del tiempo.

RECOMENDACIONES

Analizar la composición y cantidad de azúcares presentes en la broza de café capaces de formar otros compuestos que presenten coloración roja-marrón.

Optimizar el proceso de secado por aspersión “Spray Dryer”, para encontrar las mejores condiciones para obtener el extracto.

Evaluar otro método para la estabilización de las antocianinas como la copigmentación ya sea por autoasociación, copigmentación intramolecular, complejo con metal, o copigmentación intermolecular.

Aplicar el extracto en nuevas matrices alimentarias para observar su comportamiento en un período de almacenamiento; como por ejemplo: en bebidas “ready to drink”, productos de confitería y rellenos o coberturas de panadería.

REFERENCIAS

- Aguilera, M., Reza, M. d., Chew, R. G. & Meza, J. A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIII (2), 16-22.
- Ahmed, J., Shivhare, U. S., & Raghavan, G. S. V. (2004). Thermal degradation kinetics of anthocyanin and visual colour of plum puree. *European Food Research and Technology*, 218(6), 525-528.
- Alcañiz, E.J. (1995). Química General. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá (UAH). Madrid, España.
- Alfaro, M. & Rodríguez, J. (1994). Impacto Ambiental del Procesamiento del Café en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 18(2), 217–225.
- Andersen, Ø. M., & Jordheim, M. (2013). Basic Anthocyanin Chemistry and Dietary Sources. En T.C. Wallace y M.M. Giusti, *Anthocyanins in Health and Disease*. CRC, Press, 13–90.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis: Official method 981.12 pH of acidified foods. 18va ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland.
- Ariza, N. (2011). Extracción de pigmentos con capacidad antioxidante a partir de la broza de café. Tesis. Maestría profesional en Química Industrial. Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.
- Aurelio, D.L., Edgardo, R.G. & Navarro-Galindo, S. (2008). Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 322-325.
- Avery, H.E. (1982). Cinética química básica y mecanismos de reacción. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Bobbio, F. O. & Mercadante, A. Z. (2008). Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, 241–276.

- Bordignon-Luiz, M.T., Gauche, C., Gris, E.F., & Falcão, L.D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594–599.
- Brat, P., Tourniaire, F. & Amiot-carlin, M. J. (2007). Chapter 2. Stability and analysis of phenolic pigments. En C.Socaciu, *Food Colorants*, CRC Press, 25-49, 71-83.
- Brenes, C. H., Del Pozo-Insfran, D., & Talcott, S. T. (2005). Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 49–56.
- Bridle, P. & Timberlake, C. (1997). Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103-109.
- Buglione, M. & Lozano, J. (2002). Nonenzymatic Browning and Chemical Changes During Grape Juice Storage. *Journal of Food Science*, 67, 1538–1543.
- Castañeda Ovando, A., Pacheco Hernández, M. L., Páez Hernández, M. E., Rodríguez, J. A. & Galán Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871.
- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509.
- Cuevas, E., Silke, M., & Peter, H. (2011). Anthocyanins in Purple Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Varieties. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 5(2), 19-24.
- De Rosso, V. V., & Mercadante, A. Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 347–352.
- Del Pozo-Insfran, D., Del Follo-Martinez, A., Talcott, S. & Brenes, C. (2007). Stability of Copigmented Anthocyanins and Ascorbic Acid in Muscadine Grape Juice Processed by High Hydrostatic Pressure. *Journal of Food Science*, 72(4), S247-S253.

- Del Pozo-Insfran, D., Brenes, C. H., & Talcott, S. T. (2004). Phytochemical Composition and Pigment Stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1539–1545.
- Delgado-Vargas, F., & Paredes-López, O. (2003). Anthocyanins and Betalains. *Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses*, 167–220.
- Díaz, C. (2010). Velocidad de reacción. Química Física I. Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Madrid, España.
- Dyrby, M., Westergaard, N., & Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72(4), 431-437.
- Eder, R. (2004). Chapter 23. Pigments. En L. Nollet, *Handbook of Food Analysis, Second Edition*. Marcel Dekker, New York, 805-877.
- Ersus, S. & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805–812.
- Esquivel, P. & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2), 488–495.
- Fischer, U. A., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1800–1809.
- Francis, F. J. & Markakis, P. C. (2009). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition Food colorants: Anthocyanins*. *Food Science and Nutrition*, 28(4), 273-314.
- Giusti, M.M. & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.F.1.2.1-F.1.2.13.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2003). Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*, 14(3), 217–225.
- Giusti, M. M. & Jing, P. (2007). Chapter 6.3: Analysis of Anthocyanins. En C. Socaciu, *Food Colorants*. CRC Press, Florida, Boca Raton, 429-547.

- Good, H. (2004). Measure to Ensure the Color Stays Right. *Food Quality magazine*, 1, 90-92.
- Gould, K., Davies, K. M., & Winefield, C. (2009). *Anthocyanins Biosynthesis, Functions and Applications*. Springer Science+Business Media, LLC. NY, USA.
- Gris, E. F., Ferreira, E. A., Falcão, L. D., & Bordignon-Luiz, M. T. (2007). Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*, 100(3), 1289–1296.
- Hassani, B., & Sharifi, A. (2012). Application of Anthocyanin extracted from barberry in food processing. *International Journal of AgriScience*, 2(6), 522–528.
- Hellstrom, J., Mattila, P. & Karjalainen, R. (2013). Stability of anthocyanins in berry juices stored at different temperatures. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 12-19.
- Holzwarth, M., Korhummel, S., Siekmann, T., Carle, R., & Kammerer, D. R. (2013). Influence of different pectins, process and storage conditions on anthocyanin and colour retention in strawberry jams and spreads. *LWT - Food Science and Technology*, 52(2), 131–138.
- International Coffee Organization (ICO). (2016). The state of the global Coffee Trade. International Coffee Organization. <http://www.ico.org/proddoc.htm>
- Izquierdo, J.F., Cunill, F., Tejero, J., Iborra, M. & Fité, C. (2004). Cinética de las reacciones químicas. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
- Janna, O., Khairul, A. & Maziah, M. (2007). Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. *Food Chemistry*, 101, 1640-1646.
- Jiménez, N., Bohuon, P., Lima, J., Dornier, M., Vaillant, F. & Pérez, A. (2010). Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100-180 °C). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2314–2322.
- Jing, P. & Giusti, M.M. (2005). Characterization of Anthocyanin-Rich Waste from Purple Corncobs (*Zea mays* L.) and Its Application to Color Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8775–8781.

- Jing, P. & Giusti, M.M. (2015). Characterization of Anthocyanin-Rich Waste from Purple Corncobs (*Zea mays L.*) and Its Application to Color Milk. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 53, 8775–8781.
- Jing, P., Zhao, S., Ruan, S., Xie, Z., Dong, Y., & Lucy, L. (2012). Anthocyanin and glucosinolate occurrences in the roots of Chinese red radish (*Raphanus sativus L.*), and their stability to heat and pH. *Food Chemistry*, 133(4), 1569–1576.
- Kheng, L. W. (2002). Color Spaces and Color-Difference Equations. *Color Research and Application*, 24, 186–198.
- Kirca, A., & Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry*, 81(4), 583–587.
- Kirca, A., Özkan, M. & Cemeroglu, B. (2007). Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*, 101(1), 212-218.
- Konczak, I. & Zhang, W. (2004). Anthocyanins, more than nature's colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 239-240.
- Lauro, G. J., Inami, O. & Johnson, C. (2005). Color Measurement and Colorants for Surimi Seafood. En J.W. Park, *Surimi and Surimi Seafood*. Second Edition .749-798
- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269–1278.
- Li, J., Li, X. D., Zhang, Y., Zheng, Z. D., Qu, Z. Y., Liu, M., Zhu, S.H., Liu, S., Wang M. & Qu, L. (2013). Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1429–1434.
- López Altunar, T., Reyes Vega, M. d., Rodríguez Herrera, R., Aguilar González, C. N. & Prado Barragán, L. A. (2011). La pulpa de café, un residuo fuente de antioxidantes polifenólicos. *Revista Cienciaviva*, 25, 1-5.
- Master Color Control. (2002). Entender la Comunicación del Color. *Master Color Control S.A.* 12–18.

- Melgar, A., Pérez, J. F., & Borge, D. (2008). Kynetic study of the biomass devolatilization process in particles sizes between 2-19 mm by means of thermogravimetric analysis. *Revista DYNA Ingeniería e Industria*, 75 (155), 123–131.
- Mercadante, A. & Bobbio, F. (2007). Chapter 4: Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicochemical Properties. En C. Socaciu, Food Colorants. CRC Press, Florida, Boca Raton, 195–299.
- Mishra, D. K., Dolan, K. D., & Yang, L. (2008). Confidence intervals for modeling anthocyanin retention in grape pomace during non-isothermal heating. *Journal of Food Science*, 73, E9-E15.
- Montesinos, R. (2013). Especificación cromática de gamas de colores usadas en la industria del calzado. Tesis. Universidad de Alicante. San Vicente del Raspeig, Alicante, España. 1–120.
- Mukhopadhyay, M. (2000). Natural food colors. En M. Mukhopadhyay, *Natural Extracts Using Supercritical Carbon Dioxide*. CRC Press, Florida, 249-264.
- Mulinacciand, N. & Innocenti, M. (2012). Chapter 22. Anthocyanins and Betalains. En L.M.L. Nollet, & F. Toldra, *Food Analysis by HPLC*, CRC Press, 757-776.
- Muriel, P., & Arauz, J. (2010). Coffee and liver diseases. *Fitoterapia*, 81(5), 297–305.
- Murthy, P. S., Manjunatha, M. R., Sulochannama, G., & Naidu, M. M. (2012). Extraction, Characterization and Bioactivity of Coffee Anthocyanins. *European Journal of Biological Sciences*, 4(1), 13–19.
- Murugan, K. & Al-Sohaibani, S. (2012). Coffee, Tea and Cocoa. En M.Chandrasekaran, *Valorization of Food Processing By-Products*. CRC Press, Florida, 455-488.
- Mussatto, S. I. & Teixeira, J.A. (2013). Coffee. *Engineering Aspects of Food Biotechnology*, 413 -428.
- Nielsen, I.L., Haren G.R., Magnussen, E., Dragsted, L.O. & Rasmussen S.E. (2003). Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography: investigation of their pH stability and antioxidative potency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (20), 5861–5866

- Oliveira J., Fernandes, V., Miranda, C., Santos-Buelga, C., Silva, A., De Freitas, V. & Mateus, N. (2006). Color Properties of Four Cyanidin – Pyruvic Acid Adducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6894–6903.
- Ortíz, M. A., Reza, M.C., Chew, R.G., Meza, J.A. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Biotecnia*, 13, 16–22.
- Pagani, M.M., Rocha-leão, M.H.M., Pontes, S. M., Gomes, F.S., Nogueira, R. I., Tonon, R. V, & Cabral, L.M.C. (2012). Comparative study on the quality of products obtained by spray drying at laboratory and pilot scale. *Embrapa Agroindústria de Alimentos*, 1, 0–4.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6(2), 153–162.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C. & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, 21(1), 3–11.
- Polyphenols AS. (s.f.). Cyanidin 3-glucoside and cyaniding 3-rutinoside products. INTERNET, extraído desde: <http://polyphenols.com/cyanidin-products/category186.html>
- Prata, E. R. B. A., & Oliveira, L. S. (2007). Fresh coffee husks as potential sources of anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 40(9), 1555–1560.
- PROCOMER. (2015). Estadísticas del comercio exterior 2015. Promotora del comercio exterior. Costa Rica.
- Prudencio, I. D., Prudêncio, E. S., Gris, E. F., Tomazi, T., & Bordignon-Luiz, M. T. (2008). Petit Suisse manufactured with cheese whey retentate and application of betalains and anthocyanins. *LWT - Food Science and Technology*, 41(5), 905–910.
- Quintero, C.M. (2004). Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad del pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Tesis. Licenciatura en Quimicofarmacología. Universidad de las Américas Puebla. Cholula, Puebla, México.

- Quirós, M. (2014). Condiciones de extracción de un pigmento rojo a partir de la broza de café. Tesis. Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.
- Reyes, L.F. & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*, 100(3), 885-894.
- Salinas M. Y., Soria R. J. & Espinosa T. E. 2010. Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Coatlichan, México.
- Shipp, J. & Abdel-Aal, E.-S. M. (2010). Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 4, 7-22.
- Socaciu, C. (2007). Chapter 7. Natural pigments as food colorants. En C. Socaciu, *Food Colorants*. CRC Press, Florida, Boca Raton, 551-616.
- Socaciu, C., & Diehl, H. A. (2008). Instruments to Analyze Food Colors. En S. Otles, *Handbook of Food Analysis Instruments*. CRC Press. 229-243
- Strack D. & Wray V. (1989). Anthocyanins. En P. Dey y H. B. Harbone, *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I., Academic Press, 325-356.
- Sui, X., Dong, X., & Zhou, W. (2014). Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution. *Food Chemistry*, 163, 163–170.
- Tojo, G. (1990). Ingeniería de las reacciones químicas. Editorial Reverté. Barcelona, España.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. *Food Research International*, 43(3), 907–914.
- Van Boekel, M.A. (2009). *Kinetic Modeling of reactions in food*. Food science and technology. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton. USA.

- Vásquez, R. (1997). El manejo de efluentes en el beneficiado del café en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 21(1), 69-76.
- Wang, W.D. & Xu, S.Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82, 271–275.
- Wrolstad, R., Durst, R. & Lee, J. (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 423-428.
- Yang, Z., Han, Y., Gu, Z., Fan, G. & Chen, Z. (2008). Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(3), 341-347.

ANEXOS

9.1 Pruebas realizadas para la definición de la concentración y tipo de aditivo con función preservante a utilizar a lo largo del estudio

Cuadro A 1. Observaciones realizadas durante la evaluación del aditivo con función preservante en disoluciones con extracto rojo de broza de café al 4%.

Tipo de preservante	Concentración	Observaciones
Sorbato de potasio	1%	No se disuelve por completo y cambian el color
Sorbato de potasio	0,1%	Formación de turbidez
Benzoato de sodio	1%	No se disuelve por completo y cambian el color
Benzoato de sodio	0,1%	Después de una semana de almacenamiento no cambio el color, no presenta olor, ni formación de turbidez o gas.
Propionato de calcio	1%	No se disuelve por completo, cambian el color y aporta iones calcio
Propionato de calcio	0,1%	Cambio ligeramente el color, aporta iones calcio

9.2 Resultados de color al evaluar la concentración de broza de café sirope 4 y 8%, yogur 6 y 10%

Cuadro A 2. Evaluación de color de diferentes concentraciones de extracto rojo de broza de café en muestras de yogur y sirope de fresa.

Yogur	Color			Sirope de fresa	Color		
	L*	C*	h*		L*	C*	h*
Concentración Extracto de broza 6%	80±4	15±4	46±2	Concentración Extracto de broza 4%	35±7	60±7	46±2
Concentración Extracto de broza 10%	62±4	25±4	40±2	Concentración Extracto de broza 8%	48±7	53±7	37±2

*Promedios reportados con L.C = $x \pm \frac{t*s}{\sqrt{n}}$, con n = 3 y un 95 % de confianza.


9.3 Ficha técnica del yogur.

Cuadro A 3. Ficha técnica con datos teóricos para un yogur natural, marca “La Rueda”.

Ficha Técnica Producto: Yogur Natural

INFORMACIÓN GENERAL			
Elaborada a partir de:	Leche descremada y pasteurizada	Ingredientes	
Peso neto:	1000 gramos	Leche descremada y pasteurizada, sólidos lácteos no grasos, cultivo láctico y gelatina	
Lote:	-		
Fecha vencimiento:	20-09-15		
Hecho en Costa Rica por:	Larry Monteslegre, Cartago		

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO			
Indicaciones de almacenamiento	Mantener en refrigeración, después de abierta se recomienda refrigerar.	Tipo de consumidor	Público en general
Empaque	Envase plástico, galón de 1 litro.	Forma de consumo	El producto está listo para consumir, no requiere ninguna preparación previa.
Información en etiqueta	Información nutricional, formas y recomendaciones de uso, ingredientes, registro sanitario, lote y fecha de vencimiento, condiciones de almacenamiento.		

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES	
	pH: 4,42 Textura: viscosa Color: Blanco Olor: agradable ligero a leche Sabor: ácido, lácteo, sin azúcar.

INFORMACIÓN NUTRICIONAL (INCAP, 2012; RTCA, 2010)			
Tamaño de porción		100 g	
Porciones por envase		10	
Componente	Cantidad por cada 100g	Componente	Cantidad por cada 100g
Valor energético	50,00 kcal	Proteína	5,73 g
Grasa Total	0,18 g	Fibra Dietética Total	0,00 g
Ácidos grasos saturados	0,12 g	Ceniza	1,18 g
Ácidos grasos insaturados	0,05 g	Calcio	199 mg
Carbohidratos	7,68 g	Potasio	255 mg
Azúcares	0,00 g	Sodio	77 mg


9.4 Ficha técnica del sirope de fresa

Cuadro A 4. Ficha técnica con resultados teóricos para un sirope de fresa.

Ficha Técnica Producto: Sirope de Fresa

INFORMACIÓN GENERAL		
Elaborada a partir de:	Azúcar, agua, almidón y sabor	Ingredientes Agua, azúcar, almidón modificado, sabor, ácido cítrico y benzoato de sodio
Peso neto:	300 gramos	
Lote:	-	
Fecha vencimiento:	-	
Hecho en Costa Rica por:	Laboratorio Universidad de Costa Rica	

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO			
Indicaciones de almacenamiento	Mantener a temperatura ambiente, después de abierta se recomienda refrigerar.	Tipo de consumidor	Público en general
Empaque	Envase plástico tipo cremera con capacidad de 300 gramos.	Forma de consumo	El producto está listo para consumir, no requiere ninguna preparación previa.
Información en etiqueta deseable*	Información nutricional, formas y recomendaciones de uso, ingredientes, registro sanitario, lote y fecha de vencimiento, condiciones de almacenamiento.	Formulación	Agua 62,5%, Azúcar 35%, almidón modificado 1,5%, sabor a fresa 0,5%, ácido cítrico 0,4% y benzoato de sodio 0,1%

CARACTERÍSTICAS FÍSICAS, QUÍMICAS Y SENSORIALES	
	*Brix: 35 °Brix pH: 3,2 Textura: viscosa Color: transparente Olor: agradable ligero a fresa Sabor: a fresa

INFORMACIÓN NUTRICIONAL (INCAP, 2012; RTCA, 2010)			
Tamaño de porción		100 g	
Porciones por envase		3	
Componente	Cantidad por cada 100g	Componente	Cantidad por cada 100g
Valor energético	134,4 kJ	Ceniza	0,07 g
Grasa Total	0,00 g	Potasio	0,00 mg
Ácidos grasos saturados	0,00 g	Sodio	0,20 mg
Carbohidratos	34,69 g	Calcio	1,75 g
Azúcares	0,00 g	Fósforo	0,35 mg
Proteína	0,00 g	Hierro	0,035 mg
Fibra Dietética Total	0,00 g	Colesterol	0,00 mg

9.5 Resultados de análisis microbiológicos

Cuadro A 5. Reporte de análisis microbiológico Laboratorio de Análisis de Microbiología del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos.



1 de 1
M-24-2015
R-SA-032 Emisión 4. 26/06/12

REPORTE DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

TIPO DE SOLICITUD:	PIN	SOLICITANTE:	Elva Cuebro/Krissia Villalta
OFERTA N°:	12-15	EMPRESA O PROYECTO:	B3-507
FECHA ENTRADA:	16/03/2015	DIRECCIÓN:	ETA
FECHA ANÁLISIS:	18/03/2015	TELÉFONO:	8742 5342
FECHA EMISIÓN:	29/05/2015	FAX:	

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS POR NÚMERO DE MUESTRA

MUESTRA #	DESCRIPCIÓN	ANÁLISIS REALIZADOS	
		Recuento de mesófilos aerobios (UFC/g)	Recuento de mohos y levaduras (UFC/g)
24	Extracto de broza de café	1,4 x 10 ²	<10
	MÉTODO EMPLEADO	P-SA-MM-001 Bacteriological Analytical Manual online. 2001. Chapter 3. Aerobic Plate Count Pouch, F. Ito, K. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association.	P-SA-MM-007 Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (Modificada).

NOTAS:

1. Este informe de análisis se refiere únicamente a las muestras ensayadas que fueron recibidas en las instalaciones del CITA. El proceso de muestreo ha sido responsabilidad del cliente.
2. Este reporte no debe ser reproducido parcialmente, sin autorización expresa del responsable del laboratorio.
3. Para cualquier consulta sobre los resultados de estos análisis, por favor comuníquese con el responsable de este reporte al (506) 2511-7214
4. Envíenos sus comentarios sobre nuestros servicios al correo: suopinion.cita@ucr.ac.cr o comuníquese al teléfono: (506) 2511-8849.

OBSERVACIONES

Emitido por: Bach. Vanny Mora V.
GERENTE TÉCNICO
LABORATORIO DE ANÁLISIS
MICROBIOLOGÍA

9.6 Gráficas de los resultados crudos obtenidos para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café, ante los efectos de pH, concentración de iones calcio y exposición a la luz

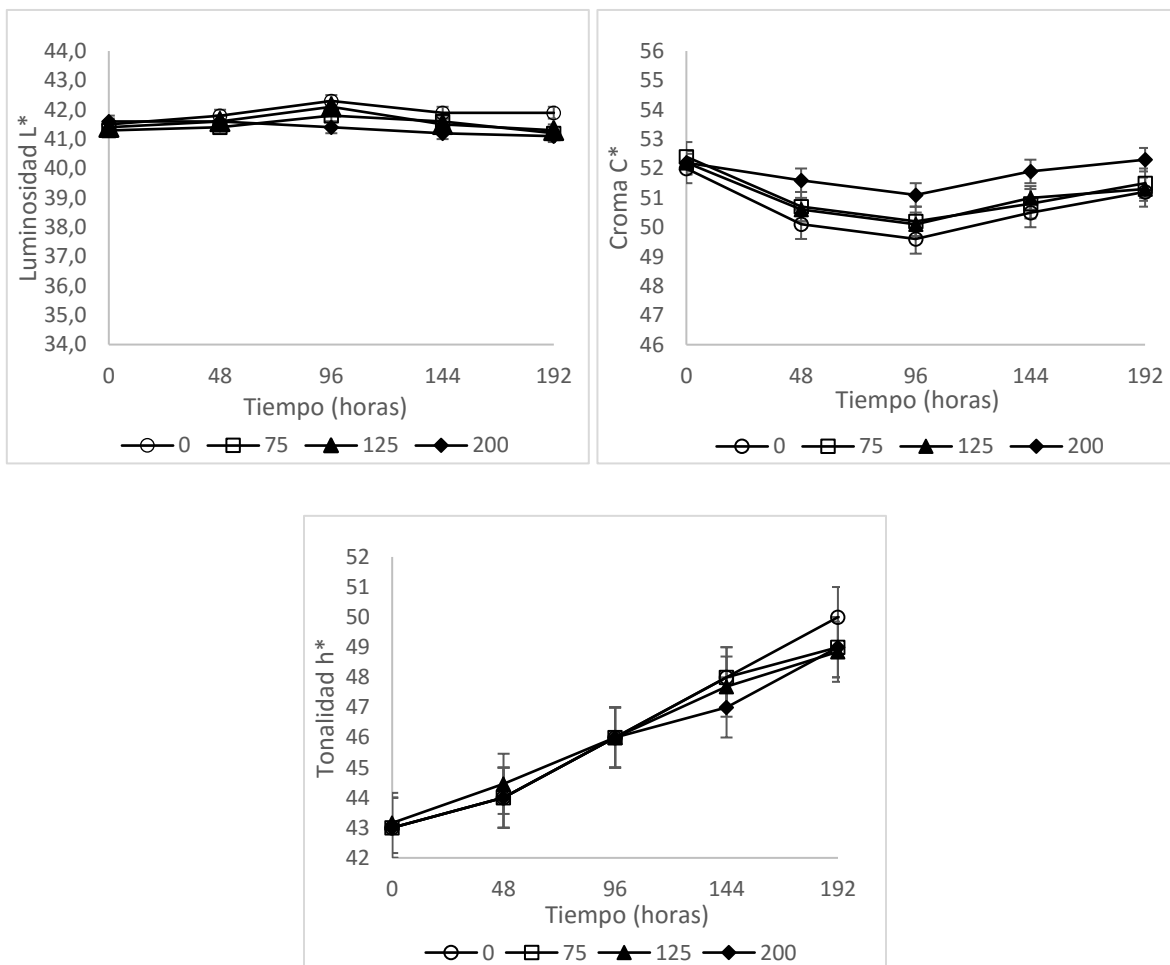


Figura A 1. Resultados de luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes concentraciones de iones Ca: 0, 75, 125 y 200 (mg/100 mL).

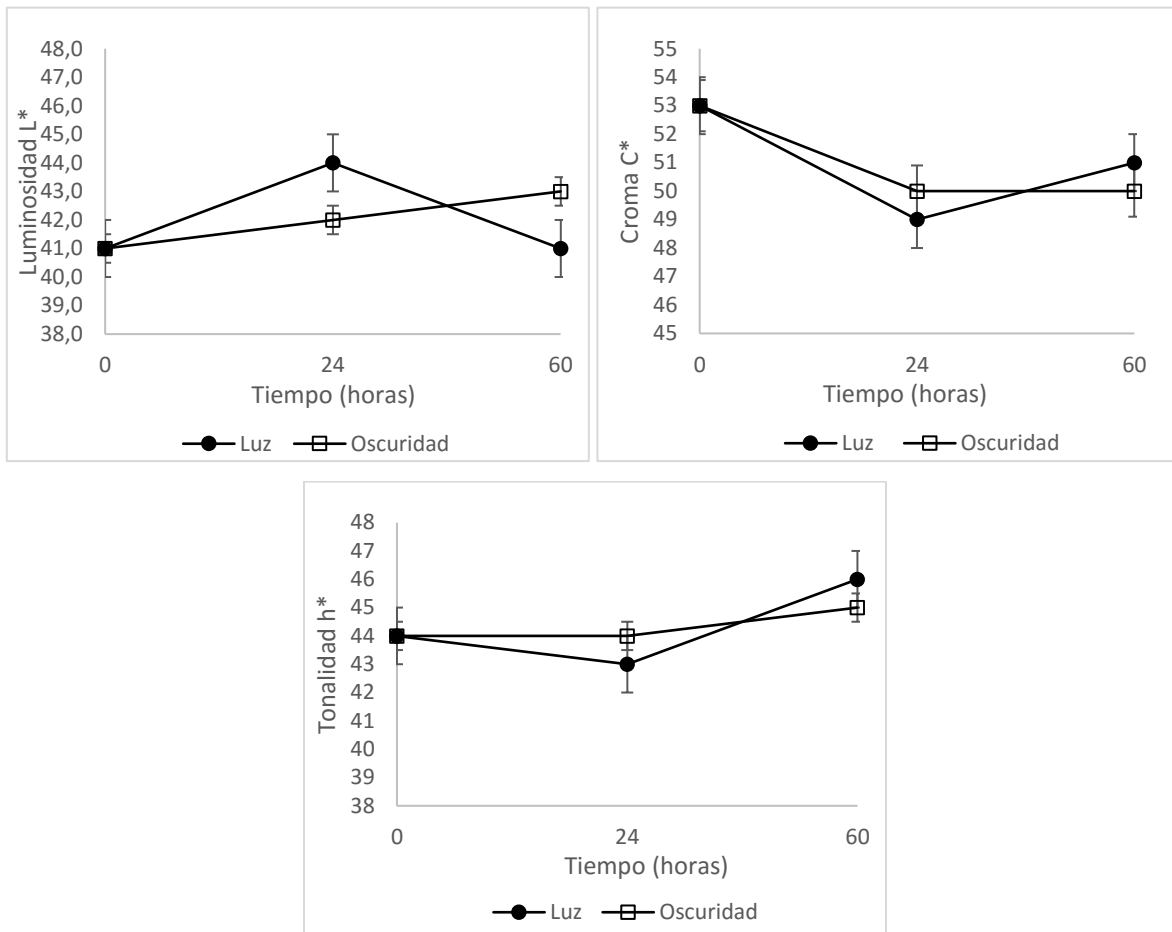


Figura A 2. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.

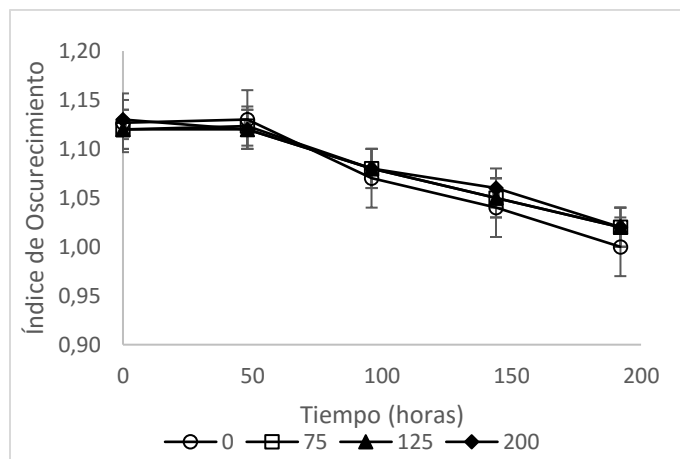


Figura A 3. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de diferentes concentraciones de iones Ca: 0, 75, 125 y 200 (mg/100mL).

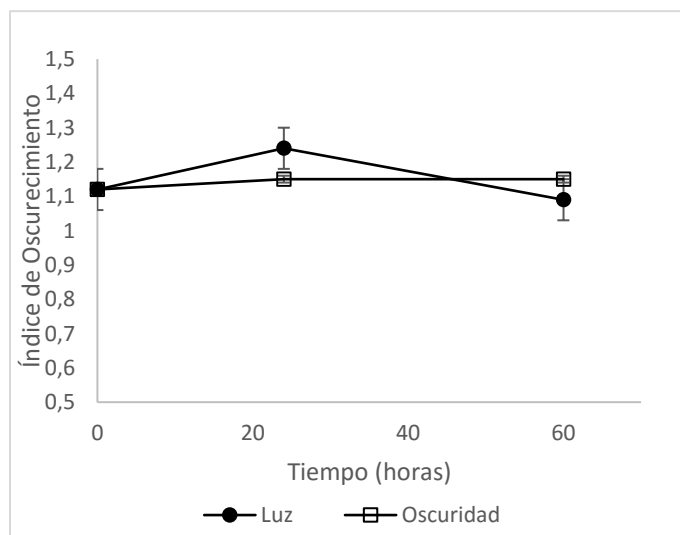


Figura A 4. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.

9.7 Gráficas de los resultados crudos obtenidos durante la evaluación de las diferentes temperaturas para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café

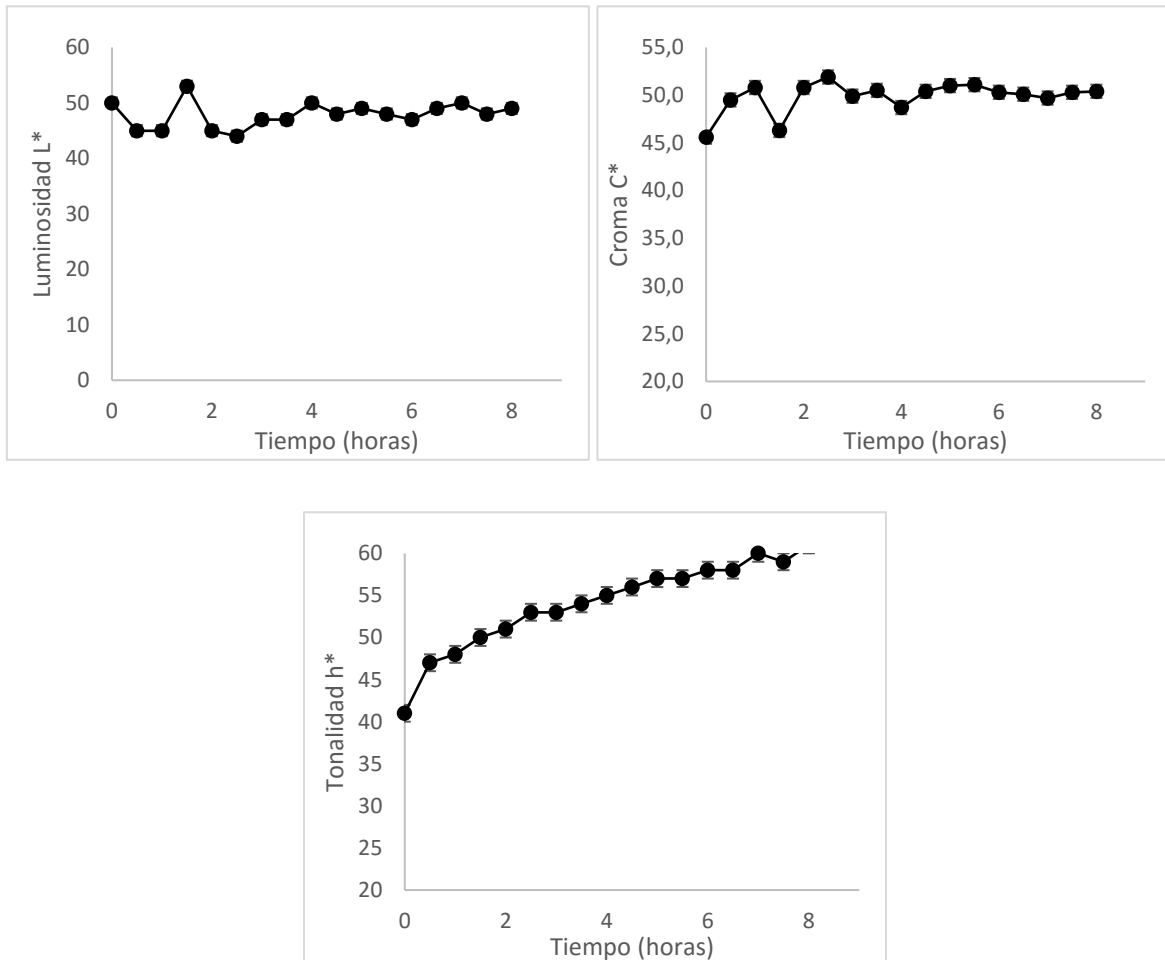


Figura A 5. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 80 °C.

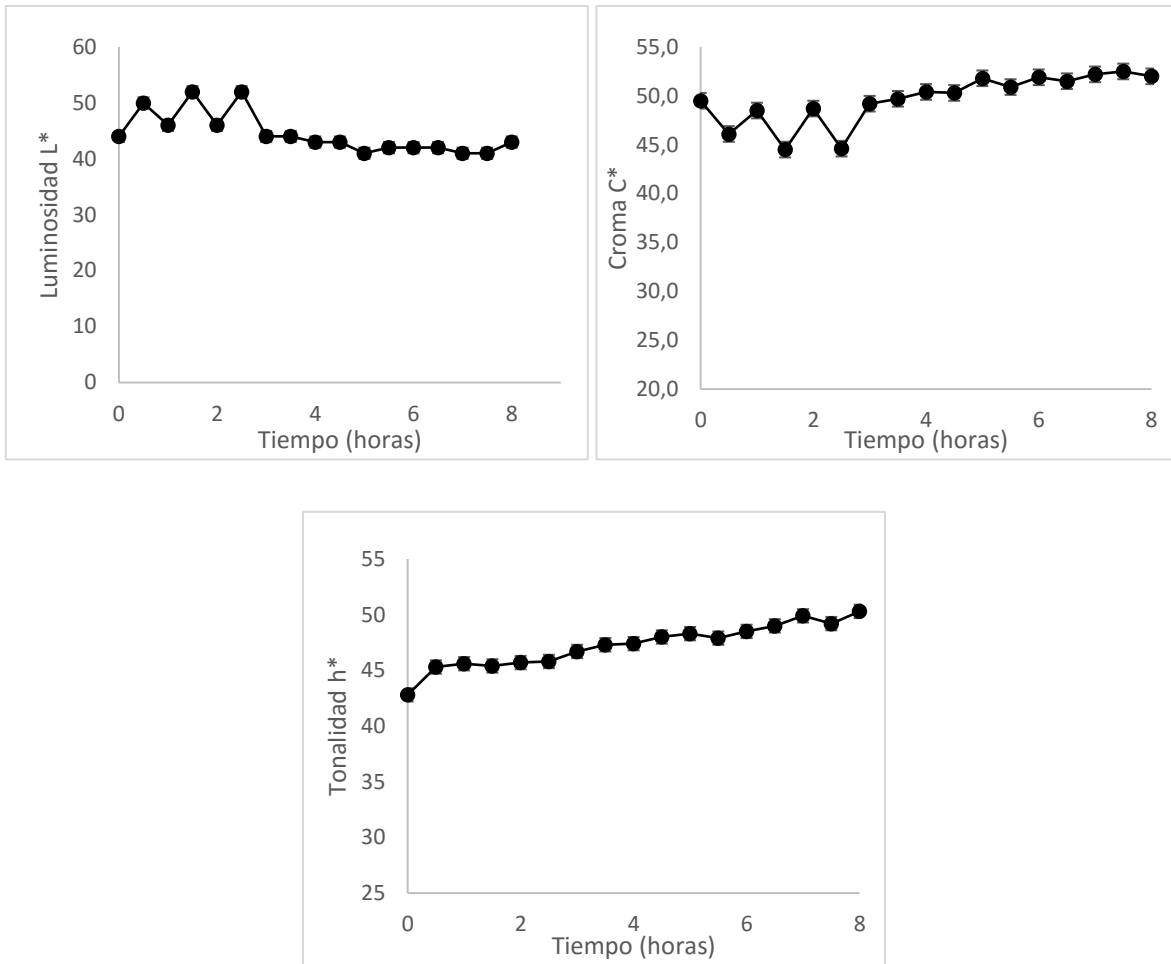


Figura A 6. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 55 °C.

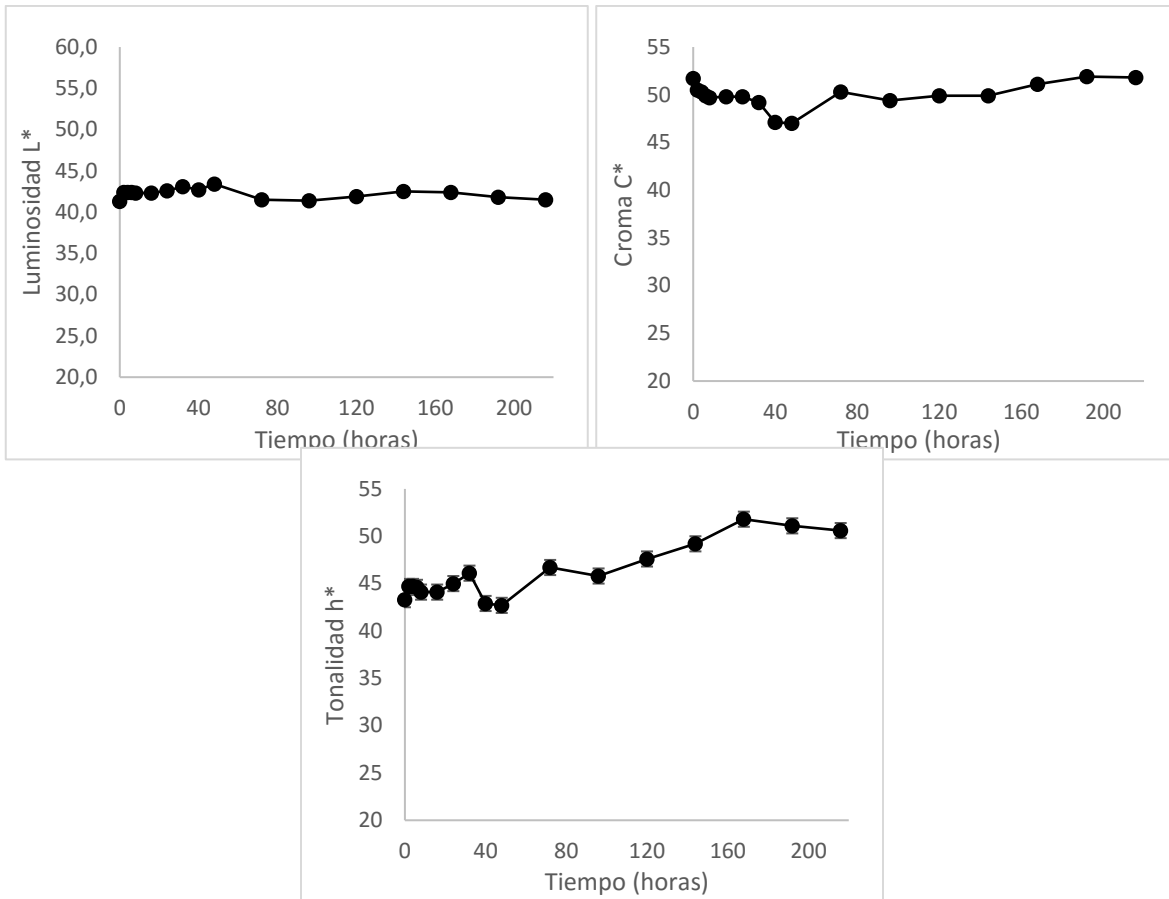


Figura A 7. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 25 °C.

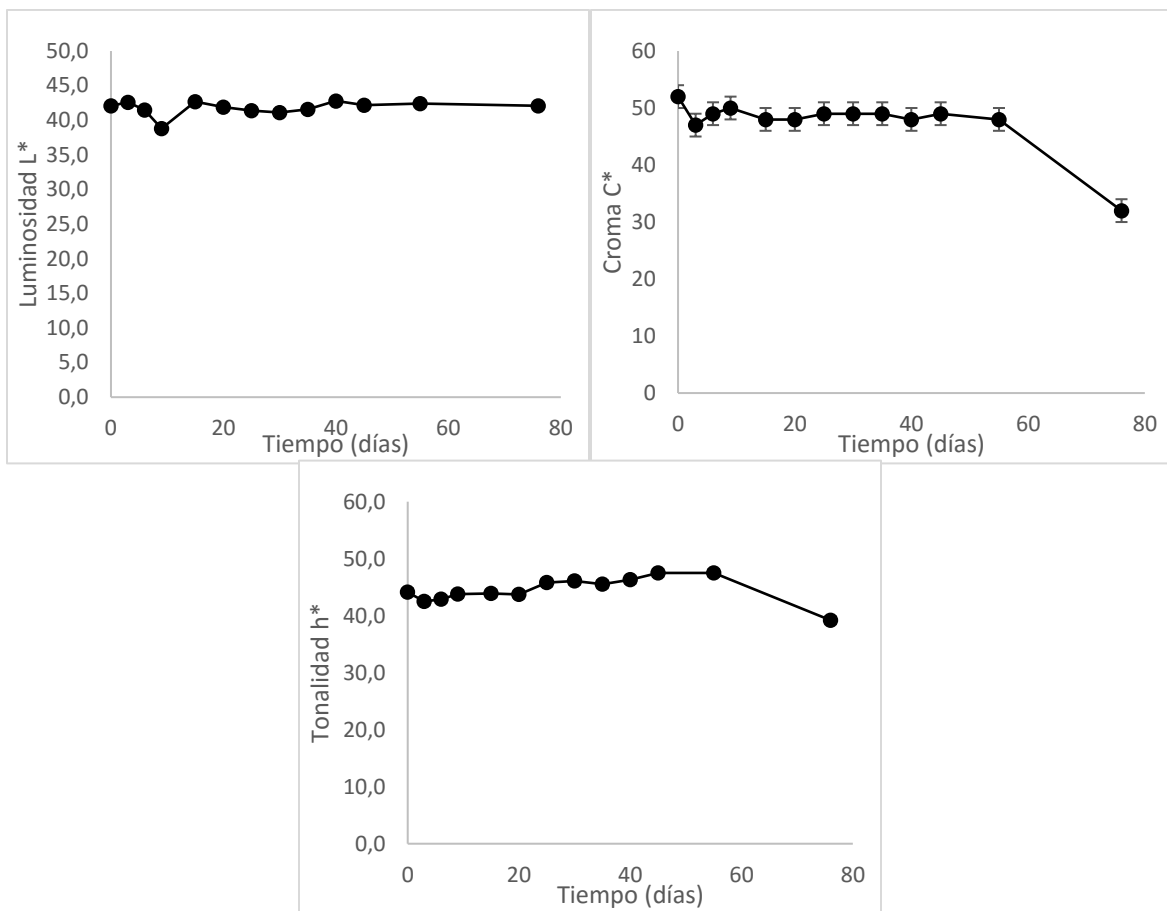


Figura A 8. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura 4 °C.

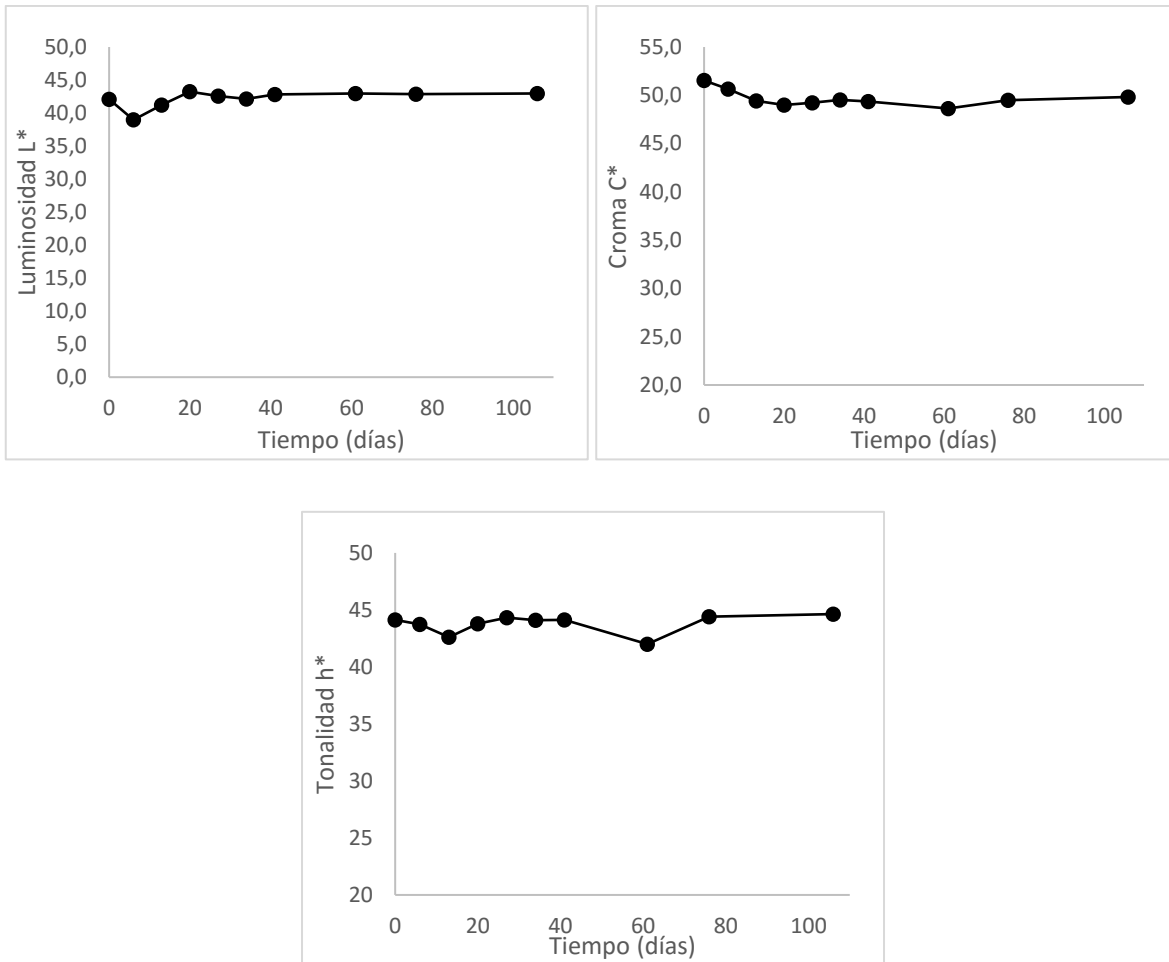


Figura A 9. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura -20 °C.

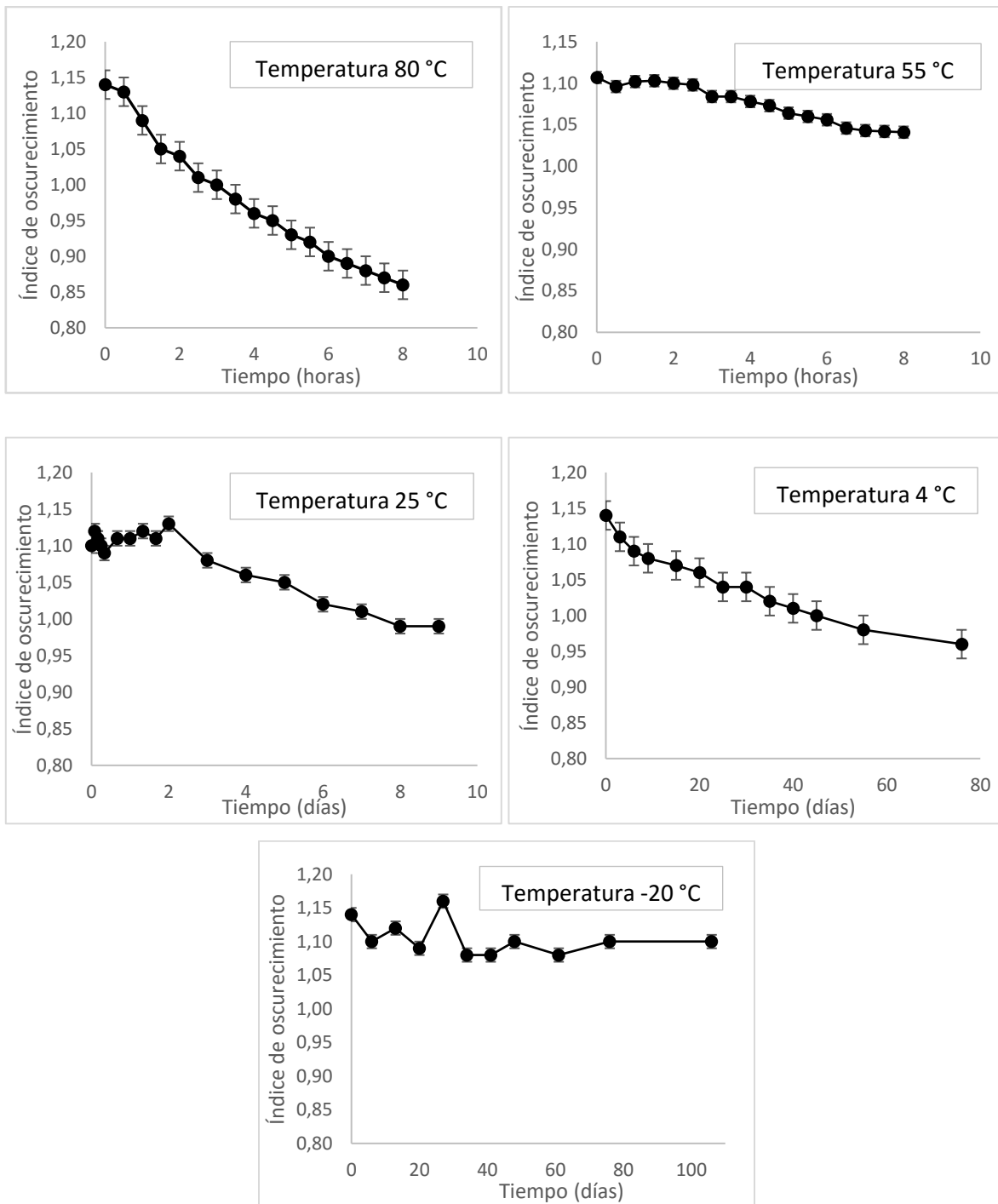


Figura A 10. Índices de oscurecimiento obtenidos en la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la temperatura.

9.8 Gráficas de los resultados crudos obtenidos durante de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café aplicado en dos matrices alimentarias

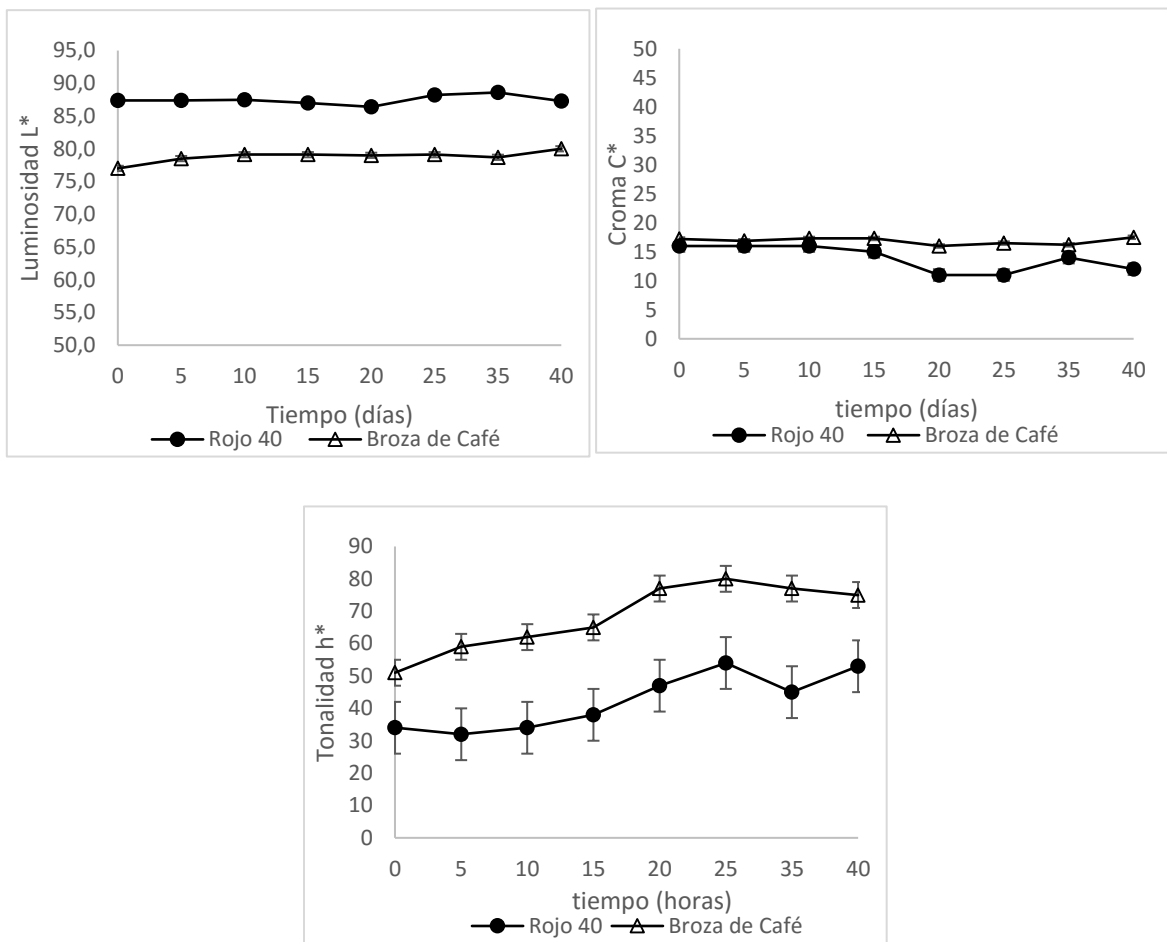


Figura A 11. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café y del FD&C Rojo No. 40 en yogur.

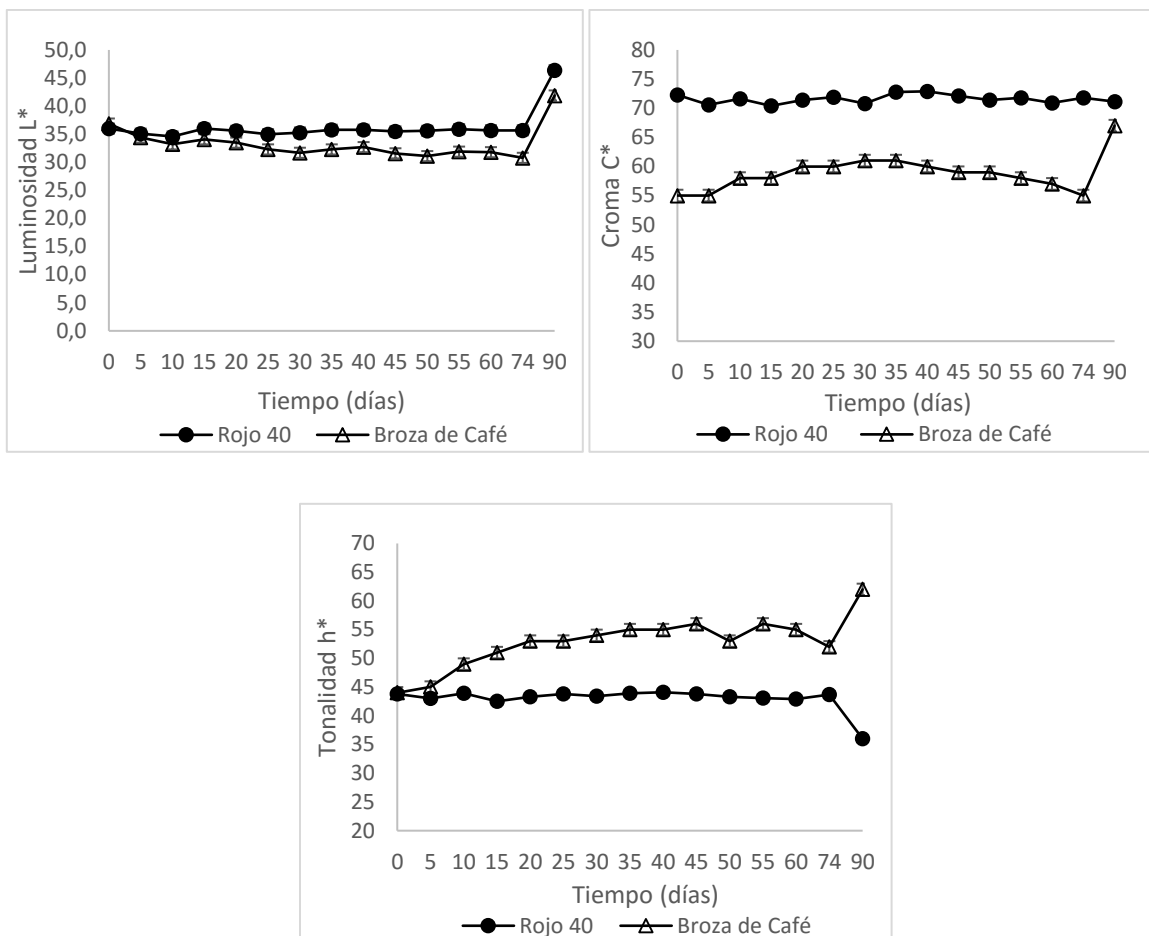


Figura A 12. Luminosidad (L*), cromaticidad (C*) y tonalidad (h*) obtenidos durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café y del FD&C Rojo No. 40 en sirope de fresa.

9.9 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante los efectos del pH

Cuadro A 6. Análisis de varianza del efecto del pH sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	5	745,19454	149,039	43,5517	<0,0001*
Error	12	41,06538	3,422		
Total	17	786,25992			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 7. Análisis de varianza del efecto del pH, sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	5	2083,3187	416,664	549,6677	<0,0001*
Error	12	9,0963	0,758		
Total	17	2092,4150			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 8. Análisis de varianza del efecto del pH, sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	5	4620,1652	924,033	2047,103	<0,0001*
Error	12	5,4166	0,451		
Total	17	4625,5818			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 9. Análisis de varianza del efecto del pH sobre el contenido de antocianinas totales, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	5	6,1197923	1,22396	22,3385	<0,0001*
Error	12	0,6574981	0,05479		
Total	17	6,7772904			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.10 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de iones Ca

Cuadro A 10. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	0,2167500	2,3350	0,1326
Concentración de calcio	3	3,6653333	13,1619	<0,0001*
Tiempo *Concentración de calcio	3	0,3482500	1,2505	0,3010

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 11. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	0,972000	1,4079	0,2408
Concentración de calcio	3	10,548500	5,0930	0,0036*
Tiempo *Concentración de calcio	3	0,748667	0,3615	0,7811

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 12. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	291,40833	2020,431	<0,0001*
Concentración de calcio	3	2,58333	5,9704	0,0014*
Tiempo *Concentración de calcio	3	1,49167	3,4474	0,0231*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 13. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 0 (mg/ 100mL).

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	90,133333	90,1333	516,9412	<0,0001*
Error	13	2,266667	0,1744		
Total	14	92,400000			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 14. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 75 (mg/ 100mL).

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	73,633333	73,6333	736,3333	<0,0001*
Error	13	1,300000	0,1000		
Total	14	74,933333			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 15. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 125 (mg/ 100mL).

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	64,035630	64,0356	1196,853	<0,0001*
Error	13	0,695543	0,0535		
Total	14	64,731173			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 16. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de concentración de calcio 200 (mg/ 100mL).

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	61,633333	61,6333	471,3137	<0,0001*
Error	13	1,700000	0,1308		
Total	14	63,333333			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 17. Análisis de varianza del efecto de la concentración de calcio sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión de la tonalidad h* contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Concentración	3	0,03729167	0,012431	4,9722	0,0310*
Error	8	0,02000000	0,002500		
Total	11	0,05729167			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 18. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	67,012909	1031,832	<0,0001*
Concentración de calcio	3	1,266405	6,4998	0,0008*
Tiempo *Concentración de calcio	3	0,269748	1,3845	0,2581

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 19. Análisis de varianza del efecto del tiempo, concentración de calcio y su interacción sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	0,06869741	12,7736	0,0008*
Concentración de calcio	3	0,02164883	1,3418	0,2711
Tiempo *Concentración de calcio	3	0,00904715	0,5607	0,6434

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.11 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz

Cuadro A 20. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	1,2983041	1,0075	0,3325
Condición luz/oscuridad	1	0,0450000	0,0349	0,8544
Tiempo * Condición luz/oscuridad	1	1,4784211	1,1473	0,3022

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 21. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	10,217778	5,1628	0,0394*
Condición luz/oscuridad	1	0,375556	0,1898	0,6698
Tiempo * Condición luz/oscuridad	1	0,196725	0,0994	0,7572

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 22. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	12,320526	27,9964	0,0001*
Condición luz/oscuridad	1	0,002222	0,0050	0,9444
Tiempo * Condición luz/oscuridad	1	0,856199	1,9456	0,1848

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 23. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	8,9404094	93,1633	<0,0001*
Condición luz/oscuridad	1	1,8050000	18,8090	0,0007*
Tiempo *Condición luz/oscuridad	1	0,7205263	7,5082	0,0160*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 24. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el contenido de antocianinas, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la luz.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	7,3685380	7,36854	55,6406	<0,0001*
Error	7	0,9270175	0,13243		
Total	8	8,2955556			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 25. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el contenido de antocianinas, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución ante el efecto de la exposición a la oscuridad.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	2,2923977	2,29240	38,5285	0,0004*
Error	7	0,4164912	0,05950		
Total	8	2,7088889			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 26. Análisis de varianza del efecto de la condición luz/oscuridad sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión del contenido de antocianinas contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Condición	1	0,00039502	0,000395	19,8725	0,0112*
Error	4	0,00007951	0,000020		
Total	5	0,00047454			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 27. Análisis de varianza del efecto del tiempo, condición luz/oscuridad y su interacción sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	0,00032295	0,1190	0,7352
Condición luz/oscuridad	1	0,00045000	0,1659	0,6900
Tiempo *Condición luz/oscuridad	1	0,00427500	1,5758	0,2299

*Efecto significativo ($P < 0,05$); ¹Grados de Libertad.

9.12 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 80 °C

Cuadro A 28. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	19,88235	19,8824	1,1880	0,2811
Error	49	820,03922	16,7355		
Total	50	839,92157			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 29. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	20,81059	20,8106	3,9058	0,0538
Error	49	261,07569	5,3281		
Total	50	281,88627			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 30. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	1262,2949	1262,29	402,4100	<0,0001*
Error	49	153,7051	3,14		
Total	50	1416,0000			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 31. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	192,33582	192,336	1118,062	<0,0001*
Error	49	8,42928	0,172		
Total	50	200,76510			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 32. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 80 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,36407851	0,364079	1425,632	<0,0001*
Error	49	0,01251364	0,000255		
Total	50	0,37659216			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.13 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 55 °C

Cuadro A 33. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	282,4759	282,471	25,7325	<0,0001*
Error	49	573,88235	10,977		
Total	50	820,35294			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 34. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	186,27962	186,280	43,1175	<0,0001*
Error	49	211,69372	4,320		
Total	50	397,97333			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 35. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	169,21243	169,212	353,2603	<0,0001*
Error	49	23,47110	0,479		
Total	50	192,68353			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 36. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	14,365000	14,3650	212,3836	<0,0001*
Error	49	3,314216	0,0676		
Total	50	17,679216			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 37. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,02628397	0,026284	499,6348	<0,0001*
Error	49	0,00257771	0,000059		
Total	50	0,02886169			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.14 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 25 °C

Cuadro A 38. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	1,887097	1,88710	5,1126	0,0283*
Error	48	17,717103	0,36911		
Total	49	19,604200			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 39. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	13,000747	13,0007	7,5408	0,0085*
Error	48	82,754453	1,7241		
Total	49	95,755200			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 40. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	307,32867	307,329	210,1628	<0,0001*
Error	48	70,19213	1,462		
Total	49	377,52080			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 41. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 25 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	55,997373	55,9974	499,0643	<0,0001*
Error	48	5,385827	0,1122		
Total	49	61,383200			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 42. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 55 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,09789695	0,097897	479,3335	<0,0001*
Error	48	0,00986505	0,000206		
Total	49	0,10776200			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.15 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura 4 °C

Cuadro A 43. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	2,542341	2,54234	2,5201	0,1209
Error	37	37,326890	1,00883		
Total	38	39,869231			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 44. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	396,94399	396,944	31,1991	<0,0001*
Error	37	470,74831	12,723		
Total	38	867,69231			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 45. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,35628	0,35628	0,0668	0,7974
Error	37	197,26115	5,33138		
Total	38	197,61744			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 46. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	59,488162	59,4882	211,1088	<0,0001*
Error	37	10,426197	0,2818		
Total	38	69,914359			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 47. Análisis de varianza del efecto de la temperatura 4 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,09235545	0,092355	460,6000	<0,0001*
Error	37	0,00741891	0,000201		
Total	38	0,09977436			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.16 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución a la temperatura -20 °C

Cuadro A 48. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	12,639589	12,6396	11,0154	0,0025*
Error	28	32,128411	1,1474		
Total	29	44,768000			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 49. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	2,923371	2,92337	4,5537	0,0417*
Error	28	17,975296	0,64197		
Total	29	20,898667			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 50. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,783877	0,783877	0,9473	0,3388
Error	28	23,170790	0,827528		
Total	29	23,954667			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 51. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el contenido de antocianinas totales durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,341794	0,341794	0,6463	0,4282
Error	28	14,807873	0,528853		
Total	29	15,149667			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 52. Análisis de varianza del efecto de la temperatura -20 °C sobre el índice de oscurecimiento durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en disolución.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,00291547	0,002915	2,2316	0,1464
Error	28	0,03658120	0,001306		
Total	29	0,03949667			

¹Grados de Libertad.

9.17 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria yogur

Cuadro A 53. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	7,40277	13,5856	0,0006*
Tipo de colorante	1	892,68750	1638,262	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	1,47334	2,7039	0,1072

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 54. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	36,072553	18,0359	0,0001*
Tipo de colorante	1	99,763333	49,8806	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	25,638919	12,8192	0,0009*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 55. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria yogur.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	61,26727	61,2673	17,5659	0,0004*
Error	22	76,73273	3,4879		
Total	23	138,0000			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 56. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria yogur.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,444204	0,444204	0,8672	0,3618
Error	22	11,269129	0,512233		
Total	23	11,713333			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 57. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en yogur.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	2904,7215	53,3384	<0,0001*
Tipo de colorante	1	8321,3333	152,8017	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	35,0270	0,6432	0,4269

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

9.18 Resultados de los análisis de varianza para determinar la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa

Cuadro A 58. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	80,84584	11,4776	0,0011*
Tipo de colorante	1	192,13611	27,2773	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	41,99177	5,9615	0,0167*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 59. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	80,84584	80,8458	8,4706	0,0046*
Error	88	839,89516	9,5443		
Total	89	920,74100			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 60. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color luminosidad L*, durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	3,15338	3,15338	0,3704	0,5460
Error	43	366,07907	8,51347		
Total	44	369,23244			

¹Grados de Libertad.

Cuadro A 61. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	42,3794	9,0326	0,0035*
Tipo de colorante	1	3668,5018	781,8841	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	40,1388	8,5551	0,0044*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 62. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	0,015212	0,01521	0,0132	0,9089
Error	43	49,421232	1,14933		
Total	44	49,436444			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 63. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color cromaticidad C*, durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	82,50298	82,5030	10,0194	0,0028*
Error	43	354,07480	8,2343		
Total	44	436,57778			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 64. Análisis de varianza del efecto del tiempo, tipo de colorante y su interacción sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del extracto rojo en polvo de la broza de café en sirope de fresa.

Efecto	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Valor F	Prob > F
Tiempo	1	123,2266	27,0773	<0,0001*
Tipo de colorante	1	2161,8801	475,0420	<0,0001*
Tiempo * Tipo de colorante	1	445,1548	97,8163	<0,0001*

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 65. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad del colorante FD&C Rojo No, 40 en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	49,97942	49,9794	17,0560	0,0002*
Error	43	126,00369	2,9303		
Total	44	175,98311			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 66. Análisis de varianza del efecto del tiempo sobre el parámetro de color tonalidad h*, durante la evaluación de la estabilidad extracto rojo de broza de café en una matriz alimentaria sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Modelo	1	518,40199	518,402	83,9989	<0,0001*
Error	43	265,37579	6,172		
Total	44	783,77778			

*Efecto significativo (P<0,05); ¹Grados de Libertad.

Cuadro A 67. Análisis de varianza del efecto de los tipos de colorantes sobre las pendientes obtenidas en el análisis de regresión de la tonalidad h* contra el tiempo, durante la evaluación de la estabilidad de los colorantes en sirope de fresa.

Fuente	g.L. ¹	Suma de cuadrados	Media de los cuadrados	Valor F	Prob > F
Concentración	1	0,01315831	0,013158	322,3701	<0,0001*
Error	4	0,00016327	0,000041		
Total	5	0,01332158			

*Efecto significativo ($P < 0,05$); ¹Grados de Libertad.