

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**ENSAYO PRELIMINAR PARA LA OBTENCIÓN DE COLORANTES
NATURALES A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES COMESTIBLES**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
SILVIA ANABEL CASTILLO MEMBREÑO
IRIS ELIZABETH RAMÍREZ GONZÁLEZ**

**PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA**

MARZO DE 2006

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA.



©2004, DERECHOS RESERVADOS

**Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador**

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rectora

Dra. María Isabel Rodríguez

Secretaria General

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Decano

Lic. Salvador Castillo

Secretario

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

Comité de Trabajo de Graduación

Coordinadora General

Licda. María Concepción Odette Rauda

Asesor de Área Análisis de Alimentos Fisicoquímico

Ing. Rina Lavinia Hidalgo de Medrano

Asesor de Área Control de Calidad de Productos Farmacéuticos, Cosméticos y
Veterinarios

MSc. Rocío Ruano de Sandoval.

Docentes Directores

Lic. Arturo Alfonso García Mazzini.

Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, Jesucristo y Espíritu Santo.

A mis Padres y Hermanos por su apoyo y confianza.

A Lic. Arturo García Mazzini por su asesoría.

A Lic. Guillermo Antonio Castillo por su guía y apoyo.

A mis amigas y amigos Ana Yanci, Guadalupe, Fátima, Wendy, Esmeralda, Marina, Rafael, Vidal por su amistad y apoyo.

A Iris Ramírez por ser mi compañera en este trabajo, por su confianza, apoyo y amistad.

A Familia Ramírez González por su apoyo y amistad.

Silvia Anabel.

Dedicatoria.

A Dios Todopoderoso, Jesucristo y Espíritu Santo.

A mis Padres Vilma Rosa y Julio César por su apoyo, cariño, confianza y guía durante todos estos años, sin lo cual no llegaría a esta etapa importante en mi vida.

A mis hermanos Verónica, Jeannette y Moisés por darme apoyo, guía y estar conmigo en las buenas y malas.

A mis amigas por su apoyo.

Silvia Anabel.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a:

A Dios y a la Santísima Virgen María por guiar mis pasos en el Camino correcto.

A nuestro docente director Lic. Arturo García Mazzini por su guía, confianza, colaboración.

A nuestro docente director Lic. Guillermo Antonio Castillo por su colaboración, guía, confianza y motivación.

A mis amigas y amigos: Silvia, Guadalupe, Wendy, Ana Yanci, Fátima, Claudia, Vidal por estar siempre conmigo, por su amistad, cariño, confianza.

A la familia Castillo Membreño por su cariño, confianza y apoyo en todo este tiempo.

Iris.

Dedicatoria.

A Dios y la Santísima Virgen María.

A mis Padres Paulina y Mario.

Mis Hermanos René, Mario y Mirtala.

A mis sobrinos Isaac y Erick.

A toda mi familia y amigos por apoyarme y estar siempre a mi lado.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
Resumen	
Capítulo I. Introducción	
1.0 Introducción	xxiii
Capítulo II. Objetivos	
2.1 Objetivo General	26
2.2 Objetivos Específicos	26
Capítulo III. Marco Teórico	
3.1 Colorantes	28
3.1.1 Colorantes como Aditivos Alimentarios	28
3.1.2 Factores que afectan la Estabilidad de los Colorantes	29
3.2 Clasificación de los Colorantes	31
3.2.1 Colorantes Artificiales	31
3.2.2 Colorantes Naturales	32
3.3 Clasificación de Colorantes Naturales según Composición Química	33
3.4 Las Plantas como Colorantes	34
3.4.1 Botánica de la Uva	34
3.4.2 Botánica de la Fresa	36
3.4.3 Botánica de la Mora	38

3.5	Flavonoides	39
3.5.1	Concepto	39
3.5.2	Estructura Básica de los Flavonoides	40
3.5.3	Distribución, Localización y Funciones	42
3.5.4	Biogénesis	43
3.5.5	Propiedades	44
3.5.6	Ensayos y Valoraciones	44
3.5.7	Actividad Biológica	45
3.5.8	Función Biológica	46
3.5.9	Metabolismo	47
3.6	Antocianinas	47
3.6.1	Estructuras de las Antocianinas	49
3.6.2	Propiedades Físico Químicas	49
3.6.3	Extracción y Caracterización	50
3.6.4	Acción Farmacológica y Usos	51
3.7	Métodos de Extracción	52
3.7.1	Extracción	52
3.8	Métodos de Identificación	54
3.8.1	Cromatografía en Capa Fina	54
3.8.2	Reacciones de Coloración o Precipitación	55

3.9	Comercialización	56
3.9.1	Liofilización	56
3.9.1.1	Ventajas	57
3.9.1.2	Desventajas	58
3.9.2	Método de Secado al Vacío	58
3.10	Pruebas Microbiológicas	58
3.10.1	<i>Escherichia coli</i> y Coliformes Totales	59
3.10.2	Mohos y Levaduras	59
Capítulo IV. Diseño Metodológico		
4.1	Tipo de Estudio	62
4.2	Investigación Bibliográfica	62
4.3	Investigación de Campo	62
4.3.1	Universo y Muestra	62
4.3.2	Selección y Recolección de Muestra	63
4.3.3	Preparación de la Muestra	63
4.4	Investigación de Laboratorio	63
4.4.1	Extracción por Método Soxhlet (Obtención de Colorante Natural)	63
4.4.2	Extracción por Maceración (Obtención de Colorante Natural)	64
4.4.3	Identificación de Colorantes Naturales en los extractos de Uva, Fresa y Mora con los diferentes solventes obtenidos por Método Soxhlet y Maceración	65

4.4.3.1	Pruebas de Identificación para Flavonoides	65
4.4.3.1.1	Prueba de Shinoda	65
4.4.3.1.2	Prueba con Zn/HCl	65
4.4.3.1.3	Prueba con NaOH 1N	65
4.4.3.1.4	Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido	66
4.4.3.1.5	Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino	66
4.4.4	Procedimiento para concentrar los extractos seleccionados	66
4.4.4.1	Concentración de una porción del extracto sin preservante	67
4.4.4.2	Concentración de una porción del extracto con preservante	67
4.4.5	Método de Secado al Vacío	67
4.4.6	Pruebas Microbiológicas	68
4.4.6.1	Prueba para verificar la ausencia de Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	68
4.4.6.1.1	Preparación de la Muestra	68
4.4.6.1.2	Inoculación	68
4.4.6.2	Prueba para verificar la ausencia de Mohos y Levaduras	69

4.4.6.2.1	Preparación de la Muestra	69
4.4.6.2.2	Inoculación	70
4.4.7	Elaboración de Pan Casero	71
Capítulo V. Resultados e Interpretación		
5.1	Extractos obtenidos por Método Soxhlet y Maceración	73
5.2	Prueba de Identificación para Flavonoides	74
5.2.1	Prueba de Shinoda	74
5.2.2	Prueba con Zn/HCl	76
5.2.3	Prueba con NaOH 1N	77
5.2.4	Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido	79
5.2.5	Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino	80
5.3	Método de Secado al Vacío	81
5.4	Pruebas Microbiológicas	82
5.4.1	Prueba Microbiológica para Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	82
5.4.2	Prueba Microbiológica para Mohos y Levaduras	84
5.5	Elaboración de Pan	85
Capítulo VI. Conclusiones		
Capítulo VII. Recomendaciones		
Bibliografía		
Glosario		
Anexos		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
No. 1. Clasificación de Colorantes Naturales	33
No. 2. Coloración de los Extractos obtenidos por Soxhlet y Maceración en los diferentes solventes	73
No. 3. Prueba de Identificación para Flavonoides Prueba de Shinoda	74
No. 4. Prueba de Identificación para Flavonoides Prueba con Zn/HCl	76
No. 5. Prueba de Identificación para Flavonoides Prueba con NaOH 1N	77
No. 6. Identificación de Antocianinas con un pH Ácido	79
No. 7. Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino	80
No. 8. Pruebas Microbiológicas que verifican la ausencia de Coliformes Totales y <i>Escherichia coli</i>	82
No. 9. Pruebas Microbiológicas que verifican la ausencia de Mohos y Levaduras	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Pág.
No. 1. Fruto de la Uva	34
No. 2. Fruto de la Fresa	36
No. 3. Fruto de la Mora	38
No. 4. Estructura Básica de los Flavonoides	40
No. 5. Principales grupos estructurales de Flavonoides	41
No. 6. Estructura básica de las antocianinas	48
No. 7. Extractor tipo Soxhlet	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Pág.
1. Tablas de Identificación para Flavonoides	102
2. Listado de Reactivos de Reactivos, Cristalería y Equipo	105
3. Preparación de Reactivos	109
4. Recomendaciones de uso de Placas Petrifilm para el Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes Totales	110
5. Guía de Interpretación para el Recuento de <i>E. coli</i> y Coliformes Totales	113
6. Fotografías de Pruebas Microbiológicas Realizadas en Placas Petrifilm para Coliformes Totales y <i>E. coli</i> en las muestras seleccionadas	120
7. Recomendaciones de uso de Placas Petrifilm para el Recuento de Mohos y Levaduras	123
8. Guía de Interpretación para el Recuento de Mohos y Levaduras	126
9. Fotografías de Pruebas Microbiológicas realizadas en placa Petrifilm para Mohos y Levaduras en las muestras seleccionadas	132
10. Trabajo desarrollado en el Laboratorio	136
11. Fotografías de los Extractos obtenidos por los Métodos Soxhlet y Maceración en los diferentes solventes	142
12. Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides Prueba de Shinoda	146

13. Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides	
Prueba con Zn/HCl	152
14. Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides	
Prueba con Hidróxido de Sodio 1N (NaOH 1N)	158
15. Fotografías de Identificación de Antocianinas con un pH ácido	164
16. Fotografías de Identificación de Antocianinas con un pH alcalino	170
17. Fotografías de los panecillos elaborados a nivel casero	175

ABREVIATURAS ^(12,13).

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de Carbono
E. coli	Escherichia coli
Fig	Figura
g	Gramo
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HCl	Ácido Clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de alta Presión
hrs	Horas
lb	Libra
M	Molar
m	Metro
Mg°	Magnesio Metálico
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N	Normal

NaOH

Hidróxido de Sodio

nm

Nanómetro

No

Número

Pág.

Página

UV

Ultra Violeta

Zn°

Zinc Metálico

RESUMEN

RESUMEN

La presente investigación titulada “Ensayo Preliminar para la Obtención de Colorantes Naturales a partir de Especies Vegetales Comestibles” se desarrolló en los meses de enero a diciembre del año 2005, realizando la parte experimental en el laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, en donde se llevo a cabo la extracción de compuestos o sustancias llamadas Flavonoides los cuales son los responsables de la coloración de muchas flores y frutos, utilizando como muestra el hollejo de la Uva (*Vitis vinifera*), los frutos de la Fresa (*Fragaria vesca*) y de la Mora (*Morus nigra*), mediante los métodos de extracción Soxhlet y Maceración con diferentes solventes, llegando a la conclusión de que el mejor método y solvente para extraer este tipo de colorantes es el Soxhlet con solventes alcohol etílico y alcohol etílico acidificado, ya que en estos se observaba una mayor extracción del colorante y mejor estabilidad, seleccionándose estos extractos para realizar el método de secado al vacío y pruebas microbiológicas.

También se realizaron Pruebas de Identificación Colorimétricas para Flavonoides los cuales presentaron resultado positivo, es decir que en los extractos obtenidos si estaban presentes los colorantes en investigación.

Uno de los objetivos planteados en esta investigación era el de obtener el colorante en polvo, utilizando un método alternativo de secado al vacío, pero como no se obtuvo el resultado esperado se optó por dejar el colorante en

solución concentrada, a los cuales se les realizaron pruebas microbiológicas para verificar la ausencia de Coliformes Totales y *Escherichia coli* obteniéndose un resultado negativo, es decir que no estaban presentes en los extractos, mientras que en la prueba para Hongos y Levaduras se obtuvieron algunos resultados positivos; todo esto nos lleva a concluir que pudo haber contaminación por el ambiente debido a que no se contaba con las condiciones adecuadas para realizar estas pruebas en el laboratorio.

Una vez finalizada esta parte se procedió a verificar el poder tintóreo de los colorantes en la elaboración de pan casero (procedimiento que no fue planteado como objetivo en el trabajo) observándose que el que presentaba mayor poder tintóreo era el extracto de la Mora en los solventes seleccionados.



CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

La utilización de colorantes en alimentos se remonta a muchos años. Las razones de su uso obedecen en buena medida al potencial de tinción observado en productos naturales que se han ido añadiendo a los alimentos, con el fin de proporcionar una apariencia más apetecible, sin causar daños a la salud ⁽³¹⁾. En la antigüedad los colorantes naturales eran muy utilizados, por ejemplo, en las civilizaciones precolombinas, en América Latina, o los antiguos egipcios, por citar algunas, los cuales sentaron bases de sus usos desde la tinción textil hasta la de los alimentos, pasando también por aplicaciones cosméticas ⁽³¹⁾. Mucho tiempo después sus propiedades se ampliaron a la tinción de productos farmacéuticos ⁽³¹⁾. Luego con la aparición de los colorantes de origen químico, los colorantes naturales fueron perdiendo campo, pero en la actualidad mediante investigaciones científicas se ha podido comprobar los efectos nocivos de dichos colorantes, por tal razón los colorantes naturales han tenido mucho auge debido a su biodegradabilidad y su baja toxicidad; esto ha permitido que su uso en el ámbito mundial se incremente, debido a las exigencias en las industrias alimenticias, farmacéuticas y cosméticas establecidas por las legislaciones de los diferentes países ⁽³²⁾.

En la presente investigación se obtuvieron colorantes naturales llamados Flavonoides a partir de especies vegetales comestibles, utilizando los Métodos de Extracción Soxhlet y Maceración, con diferentes solventes determinando en

cual de ellos se obtiene una mejor extracción y verificando a la vez mediante pruebas de identificación la presencia de dichos colorantes.

Como uno de los objetivos en este trabajo era obtener el colorante en polvo utilizando un método de Secado al Vacío el cual no dió el resultado esperado, se optó por utilizar el colorante en solución concentrada. También se procedió a realizar pruebas microbiológicas para verificar la ausencia de ***Escherichia coli***, coliformes totales, hongos, levaduras y así poder utilizar estos colorantes en la elaboración de pan para verificar el poder tintóreo de éstos, aunque no es un objetivo planteado en este trabajo. Todos estos procedimientos se realizaron en el Laboratorio de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Esta investigación se llevó a cabo con el objetivo de dar a conocer un recurso valioso a explotar aquí en el país utilizando un método sencillo, a demás de que sería una buena fuente de ingreso económico, ya que es posible exportar a otros países y de esta manera abrir paso a una nueva industria en donde estos colorantes puedan ser utilizados en diversas áreas.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Realizar un Ensayo Preliminar para la Obtención de Colorantes Naturales a partir de Especies Vegetales Comestibles.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Obtener los Extractos Vegetales a partir del hollejo de la Uva (*Vitis vinifera*), de los frutos de la Fresa (*Fragaria vesca*) y Mora (*Morus nigra*), utilizando los métodos de extracción Soxhlet y Maceración.

2.2.2 Identificar los Flavonoides presentes en los extractos obtenidos por Método Colorimétrico.

2.2.3 Obtener los colorantes en polvo seco aplicando un método de secado al vacío.

2.2.4 Realizar pruebas microbiológicas para verificar la ausencia de *Escherichia coli*, coliformes totales, hongos y levaduras en los colorantes seleccionados.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 COLORANTES

No hay duda de que un color ejerce gran influencia en la vida cotidiana, siendo este el primer contacto que tiene el consumidor con los productos. Cuando el color de un alimento cambia, se obtiene una respuesta de rechazo por parte del consumidor.

El ojo humano solo puede percibir el color cuando su energía corresponde a una longitud de onda que oscila entre 380 y 780 nm (espectro visible). El color es, por lo tanto, la parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo (27).

Entre las principales características que deben presentar los alimentos tenemos: sabor, textura y color, siendo este último, el atributo sensorial más marcado. Es a través del color que los consumidores son diariamente estimulados para el consumo en la Industria de los Alimentos; ya que es un parámetro importante que se asocia a la calidad del alimento (29).

3.1.1 Colorantes como Aditivos Alimentarios.

Una de las principales metas de la Industria de Alimentos es la producción de varios tipos de alimentos, con apariencia cada vez más atractiva. Para cumplir con dicha finalidad, es necesario el empleo de aditivos.

Los Aditivos son usados para:

- Reponer el valor nutritivo y las características sensoriales perdidas durante el procesamiento.
- Garantizar las características de los alimentos durante la fase de almacenamiento.

En los últimos años, los hábitos alimenticios de las personas se van modificando de tal modo, que casi el 70% de los alimentos que llegan a los consumidores actualmente sufren algún tipo de procesamiento. Por tal razón, la adición de colorantes tiene tres finalidades:

- Reconstituir la pérdida de color durante la fase de procesamiento.
- Uniformizar los alimentos, cuyas materias primas presentan variación de color.
- Mantener el color durante la fase de almacenamiento y su comercialización (29).

3.1.2 Factores que afectan la Estabilidad de los Colorantes.

- Trazas de Metales.
- Altas Temperaturas.
- Agentes oxido-reductores.
- Luz.
- pH.
- Microorganismos.
- Precipitaciones (turbidez).

Generalmente, la luz es la principal causa de degradación de los colorantes. Algunos sufren alteración del color por la presencia de trazas de metales, ya sea, en el producto o en el envase. Otros se degradan cuando son expuestos a ciertos azúcares, aldehídos, peróxidos y ácidos.

También hay que resaltar el hecho, de que no todos los colorantes son estables a todos los valores de pH. Algunos fenómenos están relacionados con este agente, como puede ser la vida media, los cambios de solubilidad y la pérdida del poder tintóreo del colorante ⁽¹⁸⁾.

Para evitar descomposiciones de carácter microbiológico se suele recurrir a la pasteurización, a la adición de sal o sustancias conservantes ⁽²⁷⁾.

Todos los colorantes para ser utilizados en la Industria de Alimentos, deben satisfacer las pruebas de toxicidad que requieren las autoridades de salud, para demostrar su inocuidad.

Así tenemos que dentro de los requisitos exigidos para su utilización están:

- Ser inocuo.
- Constituir una especie química definida y pura.
- Tener gran poder tintóreo, con objeto de utilizar la mínima cantidad posible y ser fácilmente incorporables al producto.
- Ser lo más estable posible a la luz y al calor.
- Poseer compatibilidad con los productos que deben teñir.
- No poseer olor ni sabor desagradable.
- Ser indiferente al pH, agentes oxidantes y reductores.
- Ser lo más económico posible ⁽²⁷⁾.

3.2 CLASIFICACIÓN DE COLORANTES.

Los colorantes se dividen en dos grandes grupos:

- Colorantes Artificiales.
- Colorantes Naturales.

3.2.1 Colorantes Artificiales.

El origen de estos colorantes es de síntesis química, su composición es menos compleja que la de los colorantes naturales, son hidrosolubles, se presentan generalmente en forma de polvo y tienen normas específicas de pureza.

La preocupación por la seguridad de los alimentos y la presión del público, obligó a que los colorantes artificiales sean estudiados en forma exhaustiva, en lo que respecta a su efecto en la salud, mucho más que la mayoría de los colorantes naturales; esto a llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir, cuando es tecnológicamente posible, los colorantes artificiales por los naturales.

Dentro de los efectos nocivos a la salud tenemos: alergias tipo asma, posible efecto cancerígeno, enfermedad de la tiroides, lesiones en el hígado, hiperacidez, rinitis, urticaria, etc.

3.2.2 Colorantes Naturales.

El término colorantes naturales se aplica a aquellos productos alimenticios de origen animal, vegetal o incluso mineral en los cuales se encuentra de forma también natural. A la vez se consideran naturales los colorantes obtenidos de materiales biológicos, como algunos insectos e incluso los que se forman al calentar o someter a tratamiento térmico un alimento, como el caramelo. En este sentido y aunque pudieran tener composición y potencial de tinción idénticos, se contraponen a los artificiales que son los obtenidos por síntesis química.

Por tanto, un colorante natural son pigmentos coloreados obtenidos de materia prima principalmente de origen animal y vegetal, aunque también puede ser de origen mineral.

3.3 CLASIFICACIÓN DE COLORANTES NATURALES SEGÚN COMPOSICIÓN QUÍMICA ⁽²⁴⁾.

Tabla No. 1. Clasificación de Colorantes Naturales.

Naturaleza Química	Ejemplos	Color Predominante
Tetrapirroleo	Ficobilinas	Azul-Verde
	Clorofila	Verde
Carotenoides	Carotenoides	Amarillo-Anaranjado
Flavonoides	Flavonas	Blanco-Crema
	Flavonoles	Amarillo-Blanco
	Chalconas	Amarillo
	Auronas	Amarillo
	Antocianinas	Rojo-Azul
Xantonas	Xantonas	Amarillo
Quinonas	Naftoquinonas	Rojo-Azul-Verde
Derivados Indigoides e Indoles	Indigo	Azul-Rosado
	Betalaínas	Amarillo-Rojo
Pirimidinas Sustituidas	Pterinas	Blanco-Amarillo
	Flavinas	Amarillo
	Fenoxanizinas	Amarillo-Rojo
	Fenazinas	Amarillo-Púrpura

3.4 LAS PLANTAS COMO COLORANTES.

Según estudios realizados, los flavonoides presentan una gran importancia para la utilización de las plantas como Colorantes Naturales.

Algunas de las plantas que contienen en su composición química flavonoides son: uva, fresa, limón criollo, maíz morado, frijol negro, cebolla morada, mora, rábano, etc.

3.4.1 Botánica de la Uva.

Familia: Vitaceae (Vitácea)

Nombre Científico: *Vitis vinifera* .



Fig. No. 1 Fruto de la Uva

Nombres Comunes: videira, uva (Brasil), uva, mata de uva, vid, parra.

Descripción Botánica: enredadera, leñosa. Tallo sarmentoso, voluble, trepador, con zarcillos. Hojas caducas, alternas, palmatilobuladas en cinco segmentos

profundos, acorazonadas en la base. Flores verdosas, reunidas en panículas axilares, cónicas. Fruto baya, carnosos, globuloso, de varios colores (azul violáceo, verde amarilloso, amarillo claro) según la variedad.

Origen: Originaria del Mediterráneo y de la región comprendida entre los mares Caspio y Negro. Es una de las frutas más agradables y nutritivas. Es la materia prima para la elaboración de los vinos.

Usos Medicinales: fruta alimenticia por excelencia. Se usa como astringente, diurético y laxante. Es usada por personas débiles, con raquitismo, convalecientes y niños. Disminuye las inflamaciones, desarreglos de la nutrición, trastornos del tubo digestivo, hígado y bazo, cálculos, dispepsia, dureza del vientre, hemorroides, afecciones crónicas del hígado, cólicos biliares, cálculos hepáticos, hipertrofia del bazo, escorbuto, bronquitis, tisis, litiasis biliar, gota, reumatismo, artritis y afecciones de las vías respiratorias y circulatorias. En ayunas se usa como laxante suave para limpiar y purificar el organismo. La savia que sale al podar las ramas viejas se utiliza para borrar las manchas de la piel y curar las inflamaciones de los ojos. La uva pasa (uva seca) se utiliza como tónico cerebral, reconstituyente, expectorante, emoliente y para combatir resfriados, tos y catarros. El fruto maduro es considerado como diurético, refrescante y depurativo.

Composición Química: antocianinas, leucoantocianinas, flavonoides y otras sustancias (30).

3.4.2 Botánica de la Fresa.

Familia: Rosaceae

Nombre Científico: ***Fragaria vesca***.



Fig. No. 2 Fruto de la Fresa

Nombres Comunes: frutilla.

Descripción Botánica: tallo peludo de 15 a 30 cm. de alto. Hojas de largo pecíolo, tres folíolos finos, 2-10 cm. de largo, seríceas en ambas superficies cuando jóvenes, pero glabras con la edad. Flores de 10-15 mm de ancho, axilares, blancas; sépalos y bracteolas ovadas, agudas, 6 mm de largo. Frutos subglobosos u ovoides, de rojo a blanco, brillante, 1-1.5 cm de diámetro, aquenios superficiales.

Origen: nativa de Europa Central, ampliamente cultivada en climas templados y regiones subtropicales. Naturalizada en Guatemala, se cultiva en Alta Verapaz, Chimaltenango, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sololá, San Marcos y Suchitepéquez.

Usos Medicinales: fines comestibles o medicinales. La decocción o infusión de las hojas frescas se usa para el tratamiento de afecciones renales (cistitis, hematuria, retención urinaria, urolitiasis), diarrea, disentería, gota e hipertensión. Tópicamente se aplica la decocción en el tratamiento de eczema, los emplastos en heridas, llagas y úlceras. La pomada y ungüento en cáncer, inflamaciones y tumores. La tintura de hojas, frutos y raíces se usa para afecciones renales, digestivas, para lavados vaginales, oculares y en gargarismos para úlceras de la boca, además fortalece encías y dientes flojos. El jarabe del cocimiento del fruto u hojas y raíces se usa para aliviar catarro crónico y bronquitis. Se le atribuye propiedad astringente, diurética, emoliente, laxante y tónica.

Otros usos populares: el jugo del fruto es un buen refrigerante para pacientes con fiebre y es útil para la limpieza de los dientes. El fruto es de sabor agradable y muy apetecido para comer fresco o en jalea y como saborizantes de caramelos y gomas de mascar.

Composición Química:

- Hojas: taninos condensados, flavonoides (flavonas), leucoantocianósidos, trazas de aceite esencial, pequeñas cantidades de ácido ascórbico, alcohol triterpénico (fraganol), sales potásicas.

- Raíces: taninos catéquicos y pirogálicos, alcohol triterpénico (fraganol), sales potásicas.

- Frutos: abundantes derivados antociánicos, aceite esencial, pectina, heterósido (fragarósido) (2).

3.4.3 Botánica de la Mora.

Familia: Moraceae.

Nombre Científico: ***Morus nigra***.



Fig. No. 3 Fruto de la Mora

Nombres Comunes: Mora Negra, Moral.

Descripción Botánica: árbol de porte medio que puede medir de 4 a 5 metros de altura, posee corteza ligeramente rugosa, oscura y copa amplia. Hojas de coloración verde clara. Flores pequeñas de coloración blanco-amarillo. La fruta es de color rojo oscuro, casi negro ya maduro, con pulpa rojo oscura comestible. Presenta crecimiento rápido, se adapta a cualquier tipo de suelo, prefiriendo los húmedos y profundos. Fructifican de Septiembre a Noviembre.

Origen: originaria de Asia, introducidas en Europa durante el siglo XVII.

Usos Medicinales:

- Frutos: laxante suave, protector capilar. Indicado para el tratamiento del estreñimiento, varices, hemorroides, flebitis, fragilidad capilar.
- Hojas: hipoglucemiante, antidiarreico, cicatrizante. Indicado para el tratamiento de la hiperglucemia, diarreas, heridas, úlceras dérmicas.
- Corteza: antiinflamatorio, analgésico. Indicado para el tratamiento de la odontalgia, faringitis, estomatitis.

Composición Química: los frutos contienen antocianósidos, glúcidos, ácidos orgánicos, asparagina (21, 25).

3.5 FLAVONOIDES.

Las plantas superiores sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos durante su crecimiento y desarrollo, entre ellos, los flavonoides.

3.5.1 Concepto.

Se denominan como flavonoide a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos $C_6C_3C_6$), que presentan en su mayoría una cadena de azúcar, estos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, ya que son los pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos, los cuales son biosintetizados a partir del ácido shikímico y de la acetilcoenzima A vía malonilcoenzima A (1, 17).

3.5.2 Estructura Básica de los Flavonoides.

Desde el punto de vista químico, los flavonoides son fenoles del tipo diarilpropano, unidos la mayoría a una cadena de azúcar (L-ramnosa, D-glucosa, D-galactosa, L-arabinosa), están constituidos por un anillo bencénico condensado a una γ -pirona (o sus derivados) sustituidas en posición 2 (3) por un radical fenilo (6).

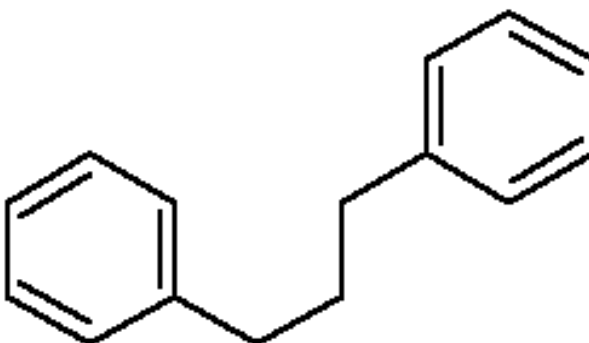
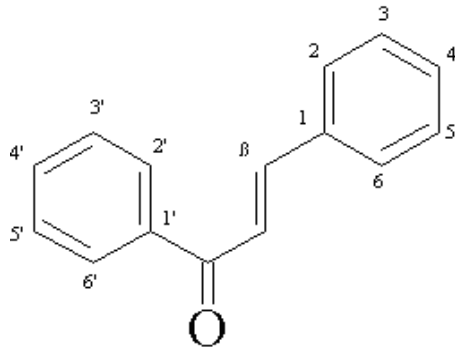


Fig. No. 4 Estructura Básica de los Flavonoides

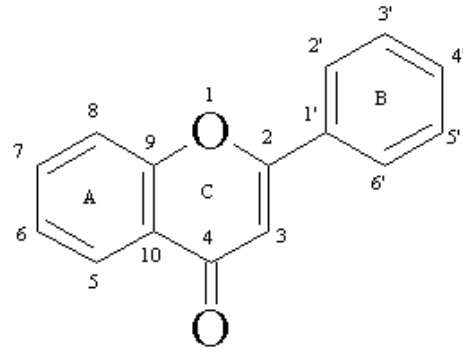
Dependiendo del grado de oxidación del anillo piránico central, pueden diferenciarse varios tipos (Fig. No.5):

- 2(3)-fenilbenzopirona: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas (isómeros de flavonas con anillo piránico abierto) y auronas (homólogos de flavonas con heterociclo pentagonal).

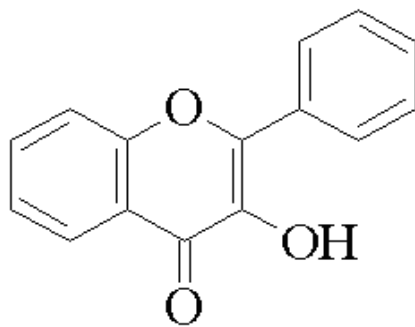
- 2-fenilbenzopirano: 3-flavanoles (catequinas), 3,4-flavanodiolos (leucoantocianos).
- 2-fenilbenzopirilo (flavilio): antocianinas (6).



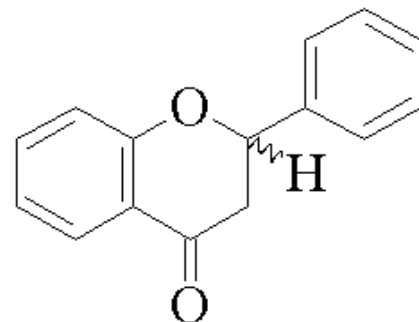
CHALCONAS



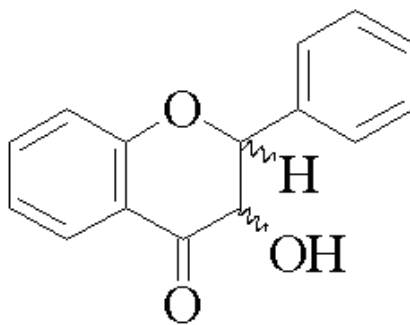
FLAVONAS



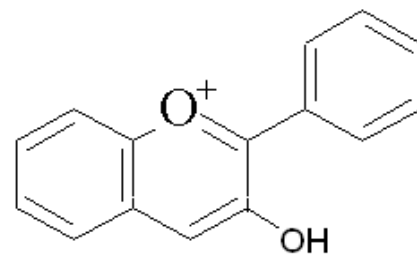
FLAVONOLES



FLAVANONAS



FLAVANONOLES



ANTOCIANIDINAS

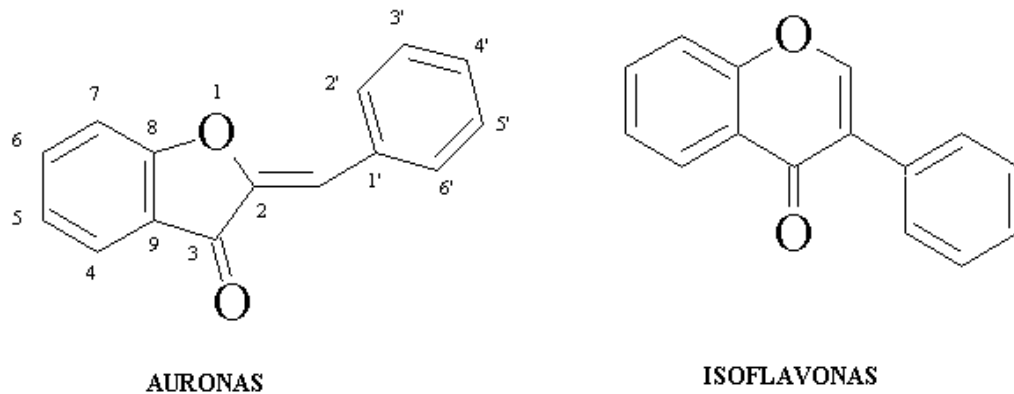


Fig. No. 5 Principales grupos estructurales de Flavonoides (14).

3.5.3 Distribución, Localización y Funciones.

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, generalmente en forma soluble de heterósidos. Ausentes prácticamente en las algas, aparecen en las Briofitas. Se encuentran en helechos y gimnospermas; pero su variedad estructural es pequeña, por el contrario están ampliamente representados en las Angiospermas, donde su diversidad estructural es máxima. Probablemente sintetizados a partir de los plastidios citoplasmáticos, los flavonoides se acumulan en el jugo vacuolar. Se encuentran en el mesófilo y la epidermis de las hojas, en la cutícula epidérmica de los frutos y se pueden encontrar también en otros órganos. En general abundan con preferencia en órganos jóvenes.

Algunos flavonoides son antioxidantes (por quelación de los metales), otros son inhibidores enzimáticos o bien pantalla frente a las radiaciones nocivas.

La función ecológica de estos pigmentos es más evidente: responsables del color de las flores por lo tanto “guías de néctar”, motivos visibles solo para los insectos, atraen y guían a los polinizadores, favoreciendo así la reproducción de la especie (1).

3.5.4 Biogénesis.

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto, los anillos aromáticos de estos compuestos pueden derivar, tanto de la secuencia del ácido Shikímico como de la secuencia del ácido acético (acetilCoA).

El anillo A inicia su biogénesis por la vía del acetato y el anillo B por la vía del ácido Shikímico. Así un fenilpropano formado por la segunda vía puede sufrir un alargamiento de la cadena por la adición de unidades de acetato (acetilCoA), para dar un poliquétido y a continuación por cierre del anillo un derivado flavonoide, siendo la Chalcona, el flavonoide inicialmente formado y a partir del cual se derivan los otros tipos de flavonoides por modificaciones que ocurren en varias etapas (4).

3.5.5 Propiedades.

Los Flavonoides se pueden encontrar en la naturaleza en forma libre (Genina) y en combinación azúcares-geninas llamadas heterósidos. Por regla general, los heterósidos son hidrosolubles y solubles en los alcoholes, algunos presentan solubilidad poco marcada en agua. Las geninas son solubles en disolventes orgánicos apolares. Por su carácter fenólico son solubles en soluciones alcalinas ⁽¹⁷⁾.

Los disolventes utilizados para su extracción son seleccionados de acuerdo con la polaridad de los flavonoides.

Los heterósidos y geninas más polares, tales como flavonas hidroxiladas, flavonoles, auronas y chalconas son generalmente aislados a partir del material vegetal por extracción con acetona, alcohol, agua o mezcla de estos. Las geninas menos polares son extraídas usualmente con disolventes como cloroformo, éter o acetato de etilo ⁽⁶⁾.

3.5.6 Ensayos y Valoraciones.

Las técnicas cromatográficas, de modo particular la cromatografía en capa fina, es muy utilizada para la caracterización de los compuestos flavonoides.

El revelado de los cromatogramas se realiza por observación de fluorescencia al UV (366nm) y con diversos reactivos:

- El examen de luz ultravioleta antes y después de pulverizar con tricloruro de aluminio, produce cambios en la fluorescencia de flavonas y flavonoles.

- Flavonas y flavonoles expuestos a vapores de amoníaco se colorean de amarillo; chalconas y auronas de naranja a rojo.
- Reactivo de Neu (solución metanólica al 1% de difenilborato de 2-aminoetilo), detecta la mayoría de flavonoides.
- Con ácido sulfúrico concentrado, los flavonoides dan solución intensamente amarilla.

Los espectros ultravioleta de los flavonoides son muy característicos y precisos para su identificación.

Actualmente se utilizan otras técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (^{13}C -RMN) y espectrometría de masas (MS).

Los métodos de valoración son preferentemente colorimétricos. La cuantificación por HPLC se lleva a cabo por medio de la curva de calibración con patrón externo ⁽⁶⁾.

3.5.7 Actividad Biológica.

Los flavonoides se han aislado de muchas drogas vegetales debido a que son productos naturales muy comunes, su presencia en una droga vegetal no necesariamente explica sus propiedades farmacológicas.

Las propiedades que se les atribuyen son:

- Actividades inhibitoras de enzimas.
- Antiinflamatoria.
- Anticancerígeno.

- Antibacterial.
- Antiviral.
- La vitamina P (Rutina) es utilizada para el tratamiento de la hipertensión y en geriatría.
- Baja mortalidad por enfermedad coronaria por consumo de vino rojo y tinto que contienen flavonoides.
- También se han reportado flavonoides que inhiben la agregación plaquetaria con acción vasodilatadora, con acción antiarrítmica.
- Chalconas con acción antimicótica, etc. (6, 17).

3.5.8 Función Biológica.

Algunas evidencias experimentales sugieren que cumplen una o varias de las siguientes funciones:

- Capacidad de absorber ciertas radiaciones ultravioletas, actuando como filtros solares protegiendo los tejidos vegetales de radiaciones dañinas. Así como participar en el proceso de fotosíntesis.
- Por su variedad de colores en tejidos como en las flores sugieren que participan en el proceso de reproducción atrayendo a insectos polinizadores.
- Por su actividad antimicrobiana, antimicótica, etc. algunas pueden aumentar la resistencia de ciertas plantas contra diferentes infecciones y enfermedades vegetales.
- La capacidad inhibidora de ciertas hormonas vegetales sugieren que actúa como reguladores del crecimiento vegetal (17).

3.5.9 Metabolismo.

La mayoría de flavonoides son degradados en condiciones alcalinas fuertes, rompiéndose el anillo C, por esta razón resultan no tóxicos para el hombre y los mamíferos pues son degradados en las condiciones alcalinas a nivel del intestino (17).

3.6 ANTOCIANINAS.

Las antocianinas son flavonoides estructuralmente relacionados con las flavonas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (excepto en las Centrospermas, donde se encuentran frecuentemente sustituidos por las betalaínas) estos pigmentos se encuentran siempre en forma de heterósidos (los antocianósidos); las geninas correspondientes (antocianidoles) son derivados del núcleo flavilio.

Sus heterósidos se conocen por el nombre de Antocianinas o Antocianósidos. Estos nombres derivan del griego **antho-** flor, y **kyanos-** azul. Son pigmentos hidrosolubles responsables de las coloraciones roja, rosa, azul o violeta de las flores y de los frutos; algunas veces de las hojas. Las antocianinas constituyen colorantes atóxicos, utilizables en la industria del medicamento y más generalmente en la industria alimenticia (1).

La estructura química de estos pigmentos se encuadra dentro de los pigmentos fenólicos. Su estructura tiene varios componentes:

- Cation flavilio: estructura básica de las antocianinas.

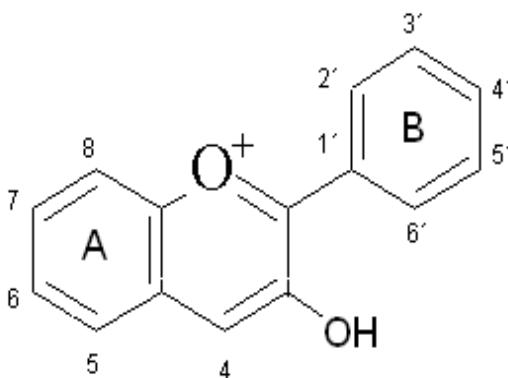


Fig. No. 6. Estructura básica de las antocianinas

- Azúcares: el cation flavilio puede llevar unido distintos azúcares, ya sea en posición 3 o raramente en posición 5, en los heterósidos flavónicos la unión es por lo general en posición 7. Pueden ser monosacáridos (glucosa, galactosa, ramnosa o arabinosa), disacáridos o trisacáridos. Son también comunes los diglucósidos, en los que se separan moléculas de glucosa que están unidas tanto en posición 3, como en la 5.
- Compuestos fenólicos: ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeíco que aumentan el carácter fenólico (19).

3.6.1 Estructura de las Antocianinas.

Todos los antocianidoles (genina en estado libre) llevan un hidróxilo en posición 3 y de ellos los más abundantes son los di o trisustituidos sobre el núcleo β (-OH, -OCH₃), generalmente las posiciones 4', 5, 7 están sustituidas por hidróxilos fenólicos libres.

Las antocianinas pueden tener estructuras complejas:

- Monósidos, el resto azucarado está unido por intermedio del hidróxilo en 3.
- Biósidos, los dos restos osídicos están unidos en 3 y 5.

La parte osídica de la antocianina puede ser mono, di o trisacarídica, la acilación de estas es muy frecuente, sobre todo, en la serie de los biósidos 3, 5.

Los antocianidoles, generalmente se escriben con una carga positiva localizada sobre el átomo de oxígeno intracíclico del núcleo piránico ⁽¹⁾.

La antocianina más común es el cianidinol que se encuentra en un 80% de las hojas permanentemente pigmentadas, en un 69% de los frutos y en un 50% de las flores. El cianidinol va seguido en orden de frecuencia por el delfinidol y el pelargonidol ⁽⁴⁾.

3.6.2 Propiedades Físico Químicas.

Las antocianinas son solubles en agua y alcoholes, insolubles en disolventes orgánicos apolares.

Se extraen con alcohol, en medio ligeramente ácido. Las geninas poco solubles en agua se aíslan en forma de sales; son muy inestables en solución, sobre todo en medio alcalino.

La inestabilidad de las soluciones se manifiesta por los cambios de coloración de las mismas, en función del pH (1).

Así en soluciones ácidas con pH entre 2.5 y 3.5 presentan coloración roja, pH entre 4.0 y 5.0 son incoloros, pH entre 6.0 y 8.0 presentan color violáceo, en pH igual a 12.0, son amarillas, donde ocurre una abertura del anillo A, dando origen a la estructura de Chalconas, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido (29).

Las antocianinas son sensibles a los metales (aparición de colores indeseables) y termolábiles. Se degradan cambiando el color, durante el almacenamiento, tanto más cuanto más elevada sea la temperatura. También les afecta la luz, la presencia de sulfitos y la presencia de enzimas (glicosidasas que rompen la unión con el azúcar produciendo la pérdida de color) (28).

Son inestables en presencia de ácido ascórbico el cual promueve su decoloración. Presentan diferentes niveles de estabilidad al dióxido de azufre y al oxígeno. Además sufren oxidación en presencia de peróxidos (1, 29).

3.6.3 Extracción y Caracterización.

Generalmente la extracción se realiza con alcohol acidificado; el ácido puede ser clorhídrico o para evitar la destrucción de los acil-antocianósidos, un ácido orgánico como el tartárico. Para la separación se recurre a las técnicas

cromatográficas con resinas cambiadoras de iones, poliamida o polivinilpirrolidona, así como a la filtración molecular sobre gel.

Igual que ocurre en los flavonoides, los espectros ultravioleta de estas moléculas son muy característicos y dependen estrechamente de la naturaleza y de la posición de los sustituyentes (1).

3.6.4 Acción Farmacológica y Usos.

Su labor fundamental es la protección de los capilares de la retina, desempeñando un papel fundamental en la conservación de una buena visión. Además, parecen tener propiedades antivirales, hemostáticas, por lo que pueden desempeñar un papel positivo en las infecciones y en la detención del sangrado.

Protegen el corazón de las enfermedades cardiovasculares y tienen, como el resto de los flavonoides, un valor antioxidante (22).

Otra aplicación de las antocianinas esta ligada a sus propiedades colorantes, son compuestos atóxicos y no presentan apenas incompatibilidades, se utilizan como colorantes en farmacia y alimentación.

Para poder utilizarse como aditivo alimentario, los pigmentos antociánicos (extractos brutos, nebulizados) deben ser extraídos de vegetales comestibles (1).

Se utilizan relativamente poco, solamente en algunos derivados lácteos, helados, caramelos, productos de pastelería y conservas vegetales (hasta 300mg/Kg) aunque están también autorizados en conserva de pescado (200mg/Kg), productos cárnicos, licores, sopas, bebidas refrescantes.

Cuando se ingieren, los antocianos son destruidos en parte por la flora intestinal. Los absorbidos se eliminan muy poco en la orina, y fundamentalmente en la bilis, previas ciertas transformaciones (28).

3.7 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

La extracción se basa en la separación de porciones biológicamente activas, utilizando un solvente y un proceso de extracción adecuado.

Los principios a extraer se encuentran disueltos en el citoplasma de la célula vegetal o formando sales que se encuentran “incrustadas” en la célula, para facilitar la extracción de los mismos, la droga es sometida a un proceso de molturación o troceado que destruye las estructuras que los contienen, mejorando así el rendimiento de la extracción (6).

3.7.1 Extracción.

El proceso extractivo se inicia con la interacción droga-disolvente. Se define como la separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, utilizando uno o varios disolventes, en donde se obtienen dos productos:

- Solución extraída en el disolvente (Extracto).
- Residuo.

Dependiendo del tipo de principio a aislar se elegirá un método u otro. Dentro de estos métodos tenemos:

- Maceración o Extracción Simple.

El material vegetal está en contacto con un volumen dado de disolvente durante un período de tiempo determinado. El principal inconveniente es la incompleta extracción de los principios de la droga ⁽⁶⁾.

- Extracción por Soxhlet.

Se emplea un equipo de vidrio, que consta de tres partes:

A: matraz

B: corneta

C: condensador

El funcionamiento es el siguiente:

En A se dispone el matraz del disolvente, en contacto con una manta calefactora; en B se dispone de una corneta donde se deposita un cartucho de papel filtro o tela que contiene un peso dado de la droga; C es el condensador y en él se condensa el disolvente que por efecto de la gravedad cae en B embebiendo el material vegetal. El empleo de este método garantiza que durante la extracción no existe la posibilidad de degradar las moléculas del colorante por efecto de la temperatura, debido a que se emplean bajas temperaturas durante la operación, además de permitir el uso de distintos disolventes, según convenga ^(6, 32).

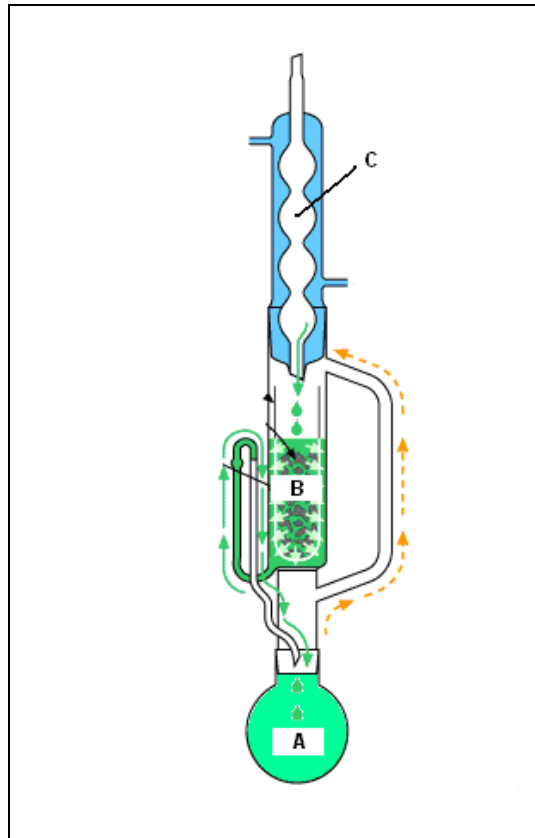


Fig. No. 7. Extractor tipo Soxhlet

3.8 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN.

3.8.1 Cromatografía en Capa Fina.

En la actualidad este método es empleado en la separación de mezclas de toda clase de productos naturales y está reconocida como una técnica analítica importante en las farmacopeas modernas. Las principales ventajas que presentan son la versatilidad, velocidad y sensibilidad. La versatilidad se debe a la posibilidad de empleo de un variado número de adsorbentes (celulosa, óxido de aluminio, celita, hidróxido cálcico, poliamida), aunque es la sílica gel la que

se emplea mayoritariamente. La mayor velocidad es debida a la naturaleza compacta del soporte cuando se embebe.

La detección de los compuestos separados se realiza por métodos generales o específicos. Así, la luz UV permite detectar sustancias que absorben a la longitud de onda larga (365nm) y de onda corta (254nm). También rociando la capa con reactivos químicos, lo cual se convierte en una ventaja adicional, puesto que permite el empleo de reactivos a base de ácidos como por ejemplo el ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, agente muy útil en la detección (6).

3.8.2 Reacciones de Coloración o Precipitación.

Se trata de reacciones simples, específicas de algún principio activo o componente característico de una droga, el cual actúa como identificador de dicha droga. Estas reacciones a veces tienen un interés limitado y no son aplicables a todas las drogas debido a las interferencias que pueden ser observadas con sustancias químicas parecidas a aquellas que se pretenden identificar. Debido a esto los resultados se deben interpretar con prudencia, ya que solamente van a tener valor real si previamente se ha realizado un reconocimiento botánico riguroso y, aún más, si se ha completado con análisis cromatográficos precisos, por lo que solo se pueden considerar como ensayos rápidos complementarios que forman parte del amplio esquema a realizar en el control de una planta. No obstante, estos ensayos son muy útiles debido a su sencillez y rapidez, y, en general, se realizan directamente sobre un extracto de

la planta, que suele ser el extracto alcohólico por ser el más apropiado para detectar la presencia de los principios activos más importantes ⁽⁶⁾.

3.9 COMERCIALIZACIÓN.

Los colorantes pueden ser suministrados en forma de soluciones, aunque por lo general se comercializan como polvos, que contiene una o varias sustancias colorantes.

Cuando el suministro de los colorantes es en seco, se economizan costos de transporte y garantizan una mejor conservación de productos ⁽¹⁸⁾.

Dentro de los métodos para obtener los colorantes en polvo tenemos la liofilización, aunque también pueden utilizarse otros métodos alternativos.

3.9.1 Liofilización.

La liofilización consiste en evaporar el agua a una sustancia congelada sin pasar por el estado líquido, se congela la solución acuosa de la sustancia química que deseamos liofilizar y a esa baja temperatura que impide cambios químicos de deterioro, se le somete a un alto vacío que hace pasar el solvente del estado sólido al estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido; es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajas, sin el deterioro que produciría el recalentamiento ⁽²⁶⁾.

Se obtiene una masa seca, esponjosa de más o menos el mismo tamaño que la masa congelada original, mejorando su estabilidad y siendo fácilmente redisuelta en el solvente adecuado ⁽²³⁾.

3.9.1.1 Ventajas.

- La temperatura a que es sometido el producto está por debajo de aquella a la que muchas sustancias inestables sufren cambios químicos.
- Debido a la baja temperatura en que se opera, la pérdida de constituyentes volátiles es mínima, se reduce el peligro de contaminación microbiana y los preparados enzimáticos no sufren alteraciones.
- La gran porosidad del producto facilita con rapidez la reconstitución por la adición de agua o el solvente adecuado.
- Al ser despreciable la humedad remanente, el producto puede ser almacenado por tiempo ilimitado constituyendo productos de larga estabilidad, siempre que las condiciones sean óptimas en temperatura y humedad ambiental.

Todas estas particularidades pueden resumirse en una estabilidad óptima, una solubilidad fácil, rápida y completa; una conservación ilimitada; una buena protección contra las influencias externas nocivas y una rápida disponibilidad de uso (23).

3.9.1.2 Desventajas.

- Es un proceso caro.
- Necesidad de personal calificado en la operación y mantenimiento de los equipos.
- Elevado costo de inversión de las instalaciones y equipo (23).

3.9.2 Método de Secado al Vacío.

La eliminación de la humedad de un extracto concentrado se puede realizar utilizando un desecador conectado a una bomba de vacío y que por la diferencia de presión generada se dará la evaporación del solvente.

3.10 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS.

Tanto los colorantes naturales como los artificiales deben de cumplir con pruebas microbiológicas establecidas para su aplicación en la Industria Alimenticia. Estas pruebas garantizan que el producto será aceptable desde el punto de vista de la salud pública, es decir, que no serán responsables de la difusión de enfermedades infecciosas ni de intoxicaciones alimentarias, también garantizan que serán aceptables desde el punto de vista estético, en el sentido de que se ha evitado la contaminación con materia fecal, con parásitos, mohos, etc. Otro factor que se busca es que tengan calidad de conservación (5).

3.10.1 *Escherichia coli* y Coliformes Totales.

Al utilizar el género Coliformes Totales, los microbiólogos se refieren en forma general, a la familia de bacterias de los géneros ***Escherichia***, ***Enterobacter***, ***Citrobacter*** y ***Klebsiella***. La mayoría de estos organismos se encuentran en vida libre es decir en el medio ambiente y materia en descomposición, excepto el género ***Escherichia*** que vive solo en organismos como en el del hombre y animales de sangre caliente (20).

La ***E. coli*** del género ***Escherichia***, hallado en las heces es un bacilo gramnegativo, el cual se divide en muchos biotipos y serotipos, algunos de los cuales son patógenos potenciales para el hombre (5).

3.10.2 Mohos y Levaduras.

El término Moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Algunos mohos pueden tener textura laxa y un aspecto lanoso, mientras que otros son compactos. Pueden tener aspecto seco, pulverulento, húmedo o gelatinoso. Su tamaño puede ser limitado ya sea por el alimento o el recipiente en el que crecen.

El término levadura se refiere a aquellos hongos que generalmente no son filamentosos, sino unicelulares y de forma ovoide o esferoide, y que se reproducen por gemación o fisión. La levadura en los alimentos puede ser beneficiosa, como en la elaboración del pan, cerveza, vinos, vinagre, etc.

Es perjudicial cuando produce alteraciones en diversos alimentos como lo son los zumos de frutas, la melaza, la miel, carnes, etc. (5).

CAPÍTULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

Se divide en:

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

Dicha investigación fue un estudio Retrospectivo, Prospectivo y Experimental.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco, Facultad de Química y Farmacia Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de Centro Natura Medic (Medicina Alternativa).
- Búsqueda en Sitios de Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO.

4.3.1 Universo y Muestra.

El universo de la investigación son todas las especies vegetales comestibles que contienen en su composición química Flavonoides, principalmente en frutos. El tipo de muestreo que se utilizó fué puntual al azar en el cual se tomó como muestra el hollejo de la uva (*Vitis vinifera*), los frutos de la fresa (*Fragaria vesca*) y mora (*Morus nigra*).

4.3.2 Selección y Recolección de Muestra.

- Las muestras que se utilizaron fueron adquiridas en el supermercado Super Selectos y el Mercado Municipal de la colonia Zacamil en San Salvador.
- Se utilizaron solamente las especies vegetales sanas, maduras, que no presentaran picaduras y no estuvieran golpeadas ⁽¹⁰⁾.
- La cantidad aproximada que se utilizó fue 400.0g de hollejo de uva, 400.0g del fruto de la fresa y 400.0g de fruto de la mora.

4.3.3 Preparación de la Muestra.

- Lavar las partes de las especies vegetales a utilizar.
- Proceder a mondar las uvas y realizar el troceado del fruto de la fresa y mora.
- Realizar la extracción por Método Soxhlet y Maceración usando los solventes: alcohol etílico, alcohol etílico acidificado, mezcla alcohol etílico-agua destilada 60/40 y agua destilada.

4.4 INVESTIGACION DE LABORATORIO.

4.4.1 Extracción por Método Soxhlet (Obtención de Colorante Natural) ⁽³²⁾.

- Pesar 50.0g de muestra.
- Transferir la muestra a un cartucho de tela y colocarlo en la corneta.
- Adicionar 250.0 mL de solvente a utilizar en un balón de 500.0 mL.

- Proceder a reflujar a una temperatura no mayor de 60°C hasta observar completa extracción del colorante.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente protegido de la luz.
- Envasar.

Nota: los diferentes solventes que se utilizaron fueron: agua destilada, alcohol etílico, alcohol etílico acidificado, mezcla alcohol etílico–agua destilada 60/40 (Ver Anexo 3).

4.4.2 Extracción por Maceración (Obtención de Colorante Natural).

- Pesar 50.0g de muestra.
- Transferirla a un frasco.
- Adicionar 250.0 mL del solvente a utilizar.
- Tapar el frasco y dejar reposar por 14 días en un lugar fresco y protegido de la luz.
- Filtrar y envasar.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente protegido de la luz.

Nota: los diferentes solventes que se utilizaron fueron: agua destilada, alcohol etílico, alcohol etílico acidificado, mezcla alcohol etílico – agua destilada 60/40 (Ver Anexo 3).

4.4.3 Identificación de Colorantes Naturales en los extractos de Uva, Fresa y Mora con los diferentes solventes obtenidos por Método Soxhlet y Maceración.

4.4.3.1 Pruebas de Identificación para Flavonoides.

4.4.3.1.1 Prueba de Shinoda ⁽¹⁷⁾.

- Medir 2.0 mL de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Adicionar una porción de Mg^o metálico.
- Adicionar 1.0 mL de HCl concentrado.
- Observar coloración formada y comparar con los colores de la tabla No.10

Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1).

4.4.3.1.2 Prueba con Zn/HCl ⁽¹⁷⁾.

- Medir 2.0 mL de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Transferirlo a un tubo de ensayo.
- Adicionar una porción de Zn^o metálico.
- Adicionar 1 mL de HCl concentrado.
- Observar coloración formada y comparar con los colores de la tabla No.11

Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1).

4.4.3.1.3 Prueba con NaOH 1N ⁽¹⁷⁾.

- Tomar 10.0 mL de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Calentar en baño de vapor y concentrar hasta 5.0 mL.
- En un tubo de ensayo colocar 2.5 mL del extracto concentrado.
- Añadir 0.5 mL de NaOH 1N.

- Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla No. 12
Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1).

4.4.3.1.4 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido (17).

- Medir 1.0 mL de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Transferir a un tubo de ensayo.
- Adicionar unas gotas de HCl concentrado hasta llevar a pH ácido, utilizando papel Litmus para verificar el pH.
- Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla No. 13
Identificación para Antocianinas (Ver Anexo 1).

4.4.3.1.5 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH alcalino (17).

- Medir 1.0 mL de cada uno de los extractos obtenidos sin concentrar.
- Transferir a un tubo de ensayo.
- Adicionar unas gotas de NaOH 1N hasta llevar a pH alcalino, utilizando papel Litmus para verificar el pH.
- Observar coloración obtenida y comparar con los colores de la tabla No. 13
Identificación para Antocianinas (Ver Anexo 1).

4.4.4 Procedimiento para concentrar los extractos seleccionados.

Se tomaron los extractos obtenidos con alcohol etílico y alcohol etílico acidificado de cada una de las muestras ya que estos presentaban una mejor extracción del colorante.

Cada uno de los extractos se dividió en dos porciones de 100.0 mL.

4.4.4.1 Concentración de una porción del extracto sin preservante.

- Concentrar 100.0 mL del extracto en baño de vapor.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente protegido de la luz, envasar y etiquetar.

4.4.4.2 Concentración de una porción del extracto con preservante.

Se encontró la concentración máxima permitida en alimentos del ácido benzoico que es del 0.1% pero no la del Benzoato de Sodio como agente conservante para colorantes, por lo cual se optó por utilizarlo al 0.01%, porcentaje en el cual se adiciona a la mayoría de alimentos.

- Pesar 0.01g de benzoato de sodio ⁽⁵⁾.
- Adicionar el benzoato de sodio a 100.0 mL del extracto.
- Agitar hasta completa disolución.
- Concentrar el extracto en baño de vapor.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y proteger de la luz, envasar y etiquetar.

4.4.5 Método de Secado al Vacío.

- En un desecador al vacío colocar las muestras concentradas preservadas y no preservadas.
- Conectar la Bomba que hará el vacío al desecador por dos minutos aproximadamente.
- Cerrar el vacío y desconectar la Bomba.

NOTA: Este método no dió el resultado esperado, por lo que se optó a utilizar el colorante en solución concentrada.

4.4.6 Pruebas Microbiológicas.

Se seleccionaron las muestras preservadas y no preservadas de los extractos con alcohol etílico y alcohol etílico acidificado.

4.4.6.1 Prueba para verificar la ausencia de Coliformes Totales y *Escherichia coli* ⁽¹⁵⁾.

4.4.6.1.1 Preparación de la muestra (Ver Anexo 4).

- Preparar una dilución 1:10 de cada una de las muestras seleccionadas utilizando solución salina 0.9%.
- Mezclar u homogenizar la muestra.
- Tomar pH a la muestra diluida y ajustar entre 6.6 y 7.2 usando NaOH 1N o HCl 1N verificando con papel pH.

4.4.6.1.2 Inoculación (Ver Anexo 4).

- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la lámina semitransparente superior.
- Con pipeta perpendicular a la placa petrifilm colocar 1.0 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Cuidadosamente deslizar la película hacia abajo evitando atrapar burbujas de aire. No dejar caer la película superior.

- Con el lado plano hacia abajo coloque el dispersor o esparcidor sobre la película superior, como atrapando el inóculo.
- Presionar suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar.
- Levantar el dispersor. Esperar por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.
- Para Coliformes incubar las placas cara arriba por 24 horas (+/- 2 hrs.) a 35°C (+/- 1°C) y ***Escherichia coli*** incubar por 48 horas (+/- 2 hrs.) a 35°C (+/- 1°C).
- Ver Guía de Interpretación para el Recuento de ***E. coli*** y Coliformes Totales en Anexo 5.

NOTA: No se encontró ninguna Especificación Microbiológica Nacional e Internacional para este tipo de Microorganismos en colorantes.

4.4.6.2 Prueba para verificar la ausencia de Mohos y Levaduras (14).

4.4.6.2.1 Preparación de la muestra (Ver Anexo 7).

- Preparar una dilución 1:10 de cada una de las muestras seleccionadas utilizando solución salina 0.9%.
- Mezclar u homogenizar la muestra.

4.4.6.2.2 Inoculación (Ver Anexo 7).

- Colocar la placa petrifilm en una superficie plana y nivelada. Levantar la lámina semitransparente superior.
- Con pipeta perpendicular a la placa petrifilm colocar 1.0 mL de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.
- Liberar la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No deslizarla hacia abajo.
- Sosteniendo la barra cruzada del dispersor o esparcidor para mohos y levaduras colocarlo sobre la película superior, como atrapando el inóculo.
- Presionar suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No girar ni deslizar.
- Levantar el dispersor o esparcidor. Esperar por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceder a la incubación.
- Incubar las placas cara arriba por 3 a 5 días entre 21°C y 25°C ⁽¹⁴⁾.
- Ver Guía de Interpretación para el Recuento de Mohos y Levaduras en Anexo 8.

NOTA: No se encontró ninguna Especificación Microbiológica Nacional e Internacional para este tipo de Microorganismos en colorantes.

4.4.7 Elaboración de Pan Casero (7).

Se utilizaron los colorantes de Uva, Fresa y Mora en alcohol etílico y alcohol etílico acidificado que presentaron resultados negativos (ausencia de microorganismos) en ambas pruebas microbiológicas.

- Mezclar 250.0 g. de harina con 25.0 g. de levadura.
- Adicionar agua tibia y dejar levar por 25 minutos.
- Agregar 250.0 g. de harina, 1½ cucharada de aceite vegetal y azúcar al gusto.
- Mezclar todos los ingredientes.
- Dividir la masa en varias porciones.
- Agregar a cada porción 10 gotas del colorante.
- Mezclar nuevamente.
- Enmantecar una bandeja de aluminio.
- Formar los panecillos y colocarlos en la bandeja. Dejarlos levar.
- Cocinar a temperatura moderada durante 25 minutos.
- Observar el poder tintóreo de los colorantes (Ver Anexo 17).

CAPITULO V
RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

5.0 Resultados e Interpretación.

5.1 Extractos obtenidos por Método Soxhlet y Maceración.

Tabla No. 2 Coloración de los extractos obtenidos por Soxhlet y Maceración en los diferentes solventes (Ver Anexo 11).

Fig. No.	Muestra	Método de Extracción	Solventes			
			Alcohol etílico	Alcohol etílico acidificado	Mezcla alcohol etílico -agua destilada	Agua destilada
42	Fresa	Soxhlet	Rosado	Rojo	Rosado	Rosado
43	Mora	Soxhlet	Violeta	Ocre	Rojo	Rosado
44	Uva	Soxhlet	Violeta	Violeta	Morado	Rosado
45	Fresa	Maceración	Ocre	Rojo	Rojo	Rojo
46	Mora	Maceración	Violeta	Ocre	Morado	Rojo
47	Uva	Maceración	Violeta	Ocre	Morado	Rojo

El mejor método de extracción para estos colorantes es el Soxhlet, ya que se observó que el residuo de las muestras no presentaba color después del proceso, no siendo este el caso de la maceración en donde los residuos de dichas muestras presentaban restos de colorante.

Los Flavonoides son compuestos cuyas propiedades físicas dependen de la forma en que se encuentran en la naturaleza (genina o heterósido) siendo solubles principalmente en alcohol y alcohol acidificado, presentando una solubilidad poco marcada en mezcla alcohol-agua y agua.

Por tal razón se seleccionaron los extractos obtenidos con alcohol etílico y alcohol etílico acidificado, debido a que presentaron una mejor extracción del colorante, ya que el color de estos era mucho más intenso que los extractos obtenidos en mezcla alcohol etílico-agua destilada y agua destilada.

5.2 Prueba de Identificación para Flavonoides.

5.2.1 Prueba de Shinoda

Tabla No. 3 Prueba de Identificación para Flavonoides.
Prueba de Shinoda (Ver Anexo 12).

Fig. No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Coloración obtenida
48	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
49	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
50	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
51	Mora	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Soxhlet	Salmón
	Uva	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
52	Mora	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
53	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
54	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
55	Mora	Agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Agua destilada	Maceración	Rojo

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de flavonoles y coloraciones anaranjadas como resultado de la combinación de colores amarillo y rojo debido a la interferencia de pigmentación, determinándose de esta manera la presencia de flavonas y flavonoles. También se obtuvo una coloración salmón (probablemente por la poca estabilidad que presento este extracto) la cual no se pudo determinar el tipo de flavonoide , ya que dicha coloración no estaba presente en la Tabla No. 10 Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1).

5.2.2 Prueba con Zn/HCl.

Tabla No. 4 Prueba de Identificación para Flavonoides.
Prueba con Zn/HCl (Ver Anexo 13).

Fig. No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Coloración obtenida
56	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
57	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
58	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
59	Mora	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Soxhlet	Salmón
	Uva	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
60	Mora	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
61	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
62	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
63	Mora	Agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Agua destilada	Maceración	Rojo

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de Flavonoides. Con el extracto de la Fresa en agua destilada por método Soxhlet se obtuvo una coloración salmón con el cual no se pudo determinar el flavonoide presente como resultado de la poca solubilidad de este tipo de colorante en dicho solvente.

En los extractos de Fresa con los diferentes solventes por método de maceración se obtuvieron coloraciones anaranjadas que no indicaban el tipo de flavonoide presente según la Tabla No. 11 Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1), lo cual podría estar relacionado a la poca extracción del colorante con este método.

5.2.3 Prueba con NaOH 1N.

Tabla No. 5 Prueba de Identificación para Flavonoides.

Prueba con Hidróxido de Sodio 1N (Ver Anexo 14).

Fig. No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Coloración obtenida
64	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
65	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde azulado
66	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Verde
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Amarillo verdoso
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Verde
67	Mora	Agua destilada	Soxhlet	Verde
	Fresa	Agua destilada	Soxhlet	Amarillo
	Uva	Agua destilada	Soxhlet	Amarillo verdoso
68	Mora	Alcohol etílico	Maceración	Verde
	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	Verde
	Uva	Alcohol etílico	Maceración	Verde
69	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde azulado
70	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
71	Mora	Agua destilada	Maceración	Verde
	Fresa	Agua destilada	Maceración	Amarillo
	Uva	Agua destilada	Maceración	Verde

En esta prueba se obtuvieron coloraciones de diferentes tonalidades de verde como resultado de la combinación de colores amarillo y azul, debido a la interferencia de pigmentación, lo cual confirma la presencia de flavonas, flavonoles y antocianinas de acuerdo a la Tabla No. 12 Identificación para Flavonoides (Ver Anexo 1). Las coloraciones amarillas en los extractos de Fresa en agua destilada por método Soxhlet y Maceración indica la presencia de flavonas y flavonoles, pero a la vez indica la poca extracción de estos colorantes con este solvente, ya que también se ha podido comprobar la presencia de antocianinas en los extractos de Fresa con los otros solventes utilizados en esta prueba.

5.2.4 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido.

Tabla No. 6 Identificación de Antocianinas con un pH Ácido (Ver Anexo 15).

Fig. No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Coloración obtenida
72	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	Rojo
73	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Rojo
74	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Rojo
75	Mora	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Soxhlet	Salmón
	Uva	Agua destilada	Soxhlet	Rojo
76	Mora	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico	Maceración	Rojo
77	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Anaranjado
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Rojo
78	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Rojo
79	Mora	Agua destilada	Maceración	Rojo
	Fresa	Agua destilada	Maceración	Anaranjado
	Uva	Agua destilada	Maceración	Rojo

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de antocianinas. Con el extracto de la Fresa en agua destilada por método Soxhlet se obtuvo una coloración salmón con el cual no se pudo determinar el tipo de flavonoide presente como resultado de la poca solubilidad de estos colorantes en dicho solvente. En los extractos de Fresa con los diferentes solventes por método de Maceración las coloraciones anaranjadas obtenidas no indicaban el tipo de flavonoide presente según la Tabla No. 13 Identificación para

Antocianinas (Ver Anexo 1), lo cual podría estar relacionado a la poca extracción del colorante con este método.

5.2.5 Prueba de Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino.

Tabla No. 7 Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino (Ver Anexo 16).

Fig. No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Coloración obtenida
*	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	Verde
80	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde azulado
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	Verde azulado
81	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Verde
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Verde
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Soxhlet	Verde
82	Mora	Agua destilada	Soxhlet	Verde
	Fresa	Agua destilada	Soxhlet	Amarillo
	Uva	Agua destilada	Soxhlet	Verde
83	Mora	Alcohol etílico	Maceración	Verde
	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	Verde
	Uva	Alcohol etílico	Maceración	Verde azulado
84	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde
	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde
	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	Verde
85	Mora	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
	Fresa	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
	Uva	Mezcla alcohol etílico-agua destilada	Maceración	Verde
86	Mora	Agua destilada	Maceración	Verde azulado
	Fresa	Agua destilada	Maceración	Verde
	Uva	Agua destilada	Maceración	Verde

En esta prueba se obtuvieron coloraciones verdes y verdes azuladas que indican la presencia de antocianinas. También se obtuvo una coloración amarilla en la cual no se pudo determinar si estaba presente la antocianina ya que dicha coloración no se encontraba en la Tabla No. 13 Identificación para Antocianina

(Ver Anexo 1).

5.3 Método de Secado al Vacío.

El proceso de Secado al Vacío no fue el adecuado para obtener estos colorantes en polvo, ya que al momento de aplicarlo se obtuvo el colorante con apariencia de caramelo, esto es debido a los diferentes azúcares presentes en la estructura de los Flavonoides, considerando también la presencia de otras sustancias ajenas a este estudio.

5.4 Pruebas Microbiológicas.

5.4.1 Prueba Microbiológica para Coliformes Totales y *Escherichia coli*.

Tabla No. 8 Pruebas Microbiológicas que verifican la ausencia de Coliformes Totales y *Escherichia coli* (Ver Anexo 6).

Fig. No.	No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Preservado	No Preservado	Resultados	
							Coliformes totales	E. Coli
⊖	C2	Control	Solución Salina estéril 0.9%	-----	-----	-----	-	-
8	M1	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	X		-	-
	M2	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	X		-	-
	M3	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	X		-	-
	M4	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet		X	-	-
9	M5	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet		X	-	-
	M6	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet		X	-	-
*	M7	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		*	*
9	M8	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		-	-
	M9	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		-	-
10	M10	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	-	-
	M11	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	-	-
*	M12	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	*	*
10	M13	Uva	Alcohol etílico	Maceración		X	-	-
	M14	Mora	Alcohol etílico	Maceración		X	-	-
11	M15	Fresa	Alcohol etílico	Maceración		X	-	-
	M16	Mora	Alcohol etílico	Maceración	X		-	-
	M17	Uva	Alcohol etílico	Maceración	X		-	-
*	M18	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	X		*	*
12	M19	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	-
	M20	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	-
	M21	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	-
13	M22	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-
	M23	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-
	M24	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-

(-) = Resultado Negativo (ausencia de Coliformes Totales y *E. coli*).

(*) = No se realizaron ya que las muestras presentaron alteración de color.

(⊖) = Placa control aparece en todas las figuras relacionadas con esta prueba.

Los resultados de las Pruebas Microbiológicas para determinar la presencia de Coliformes Totales y *E. coli* en las muestras seleccionadas obtenidas por método Soxhlet y Maceración en Alcohol Etílico y Alcohol Etílico Acidificado preservadas y no preservadas mostraron resultados negativos, es decir, que no había presencia de estos microorganismos, favoreciendo también a estos resultados los solventes utilizados, así como la adición de preservantes en algunos de los extractos.

5.4.2 Prueba Microbiológica para Mohos y Levaduras.

Tabla No. 9 Pruebas Microbiológicas que verifican la ausencia de Mohos y Levaduras (Ver Anexo 9).

Fig. No.	No.	Muestra	Solvente	Método de extracción	Preservado	No Preservado	Resultados	
							Mohos	Levaduras
⊖	C1	Control	Solución Salina estéril 0.9%	-----	-----	-----	+	-
14	M1	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet	X		+	+
15	M2	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet	X		+	-
16	M3	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet	X		+	+
17	M4	Fresa	Alcohol etílico	Soxhlet		X	+	-
18	M5	Uva	Alcohol etílico	Soxhlet		X	+	-
19	M6	Mora	Alcohol etílico	Soxhlet		X	-	-
*	M7	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		*	*
19	M8	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		-	-
20	M9	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet	X		-	-
21	M10	Mora	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	+	-
22	M11	Uva	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	+	-
*	M12	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Soxhlet		X	*	*
23	M13	Uva	Alcohol etílico	Maceración		X	+	-
20	M14	Mora	Alcohol etílico	Maceración		X	-	-
24	M15	Fresa	Alcohol etílico	Maceración		X	-	-
	M16	Mora	Alcohol etílico	Maceración	X		-	-
25	M17	Uva	Alcohol etílico	Maceración	X		-	+
*	M18	Fresa	Alcohol etílico	Maceración	X		*	*
26	M19	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	-
	M20	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	-
27	M21	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración	X		-	+
28	M22	Fresa	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-
	M23	Uva	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-
29	M24	Mora	Alcohol etílico acidificado	Maceración		X	-	-

(-) = Resultado Negativo (ausencia de Mohos y/o Levaduras).

(+) = Resultado Positivo (presencia de Mohos y/o Levaduras).

(*) = No se realizaron ya que las muestras presentaron alteración de color.

(⊖) = Placa control aparece en todas las figuras relacionadas con esta prueba.

En esta Prueba Microbiológica para Mohos y Levaduras las muestras No. 6,8,9,14,15,16,19,20,22,23 y 24 no presentaron crecimiento de Mohos y Levaduras. Las muestras 1 y 3 presentaron crecimiento de Mohos y Levaduras. En las muestras C1, 2, 4, 5, 10, 11 y 13 hubo crecimiento de Mohos pero no de Levaduras. En las muestras 17 y 21 no hubo crecimiento de Mohos pero si de Levaduras. Las muestras 7,12 y 18 no se realizaron ya que estas presentaron alteración de color por lo cual se descartaron.

Como algunos de los extractos presentaron resultados positivos a Mohos y Levaduras no se tomaron como datos confiables, ya que las condiciones de laboratorio en las que se trabajó no eran las adecuadas para realizar este tipo de análisis, considerando también que la placa control (solución salina al 0.9% estéril) dió resultado positivo, por lo que se considera que hubo contaminación por el ambiente.

5.5 Elaboración de Pan.

El colorante de la Mora es el que presenta mayor poder tintóreo comparado con los otros dos colorantes obtenidos de la Uva y Fresa, pero también a demás de dar una coloración aceptable al pan le proporciona su sabor.

Este colorante presenta un color rosado, que le da una mejor apariencia al pan comparado con los otros dos colorantes, donde el de la Uva da un color café y el de la fresa da un color rosado pálido a incoloro (Ver Anexo 17).

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES.

1. El Método más adecuado para la extracción de este tipo de colorantes es el Soxhlet por su rapidez, el empleo de bajas temperaturas, el uso de distintos disolventes según convenga y por la completa extracción del colorante.
2. El Método por Maceración no se considera adecuado para obtener este tipo de colorantes, ya que no se realiza una completa extracción del mismo y el proceso requiere de mucho tiempo.
3. Se utilizó el Ácido Tartárico como agente acidificante para el alcohol etílico (llevando a pH 6) evitando de esta manera la degradación del colorante y proporcionando una mejor estabilidad al mismo.
4. Los mejores solventes para la extracción de este tipo de colorantes son el alcohol etílico y alcohol etílico acidificado, ya que en estos se obtiene una coloración más intensa comparándola con las extracciones realizadas en mezcla alcohol etílico-agua destilada y agua destilada.
5. Mediante pruebas de identificación se pudo confirmar la presencia de Antocianinas, Flavonoles, Flavonas y Flavonoles en todos los extractos de Uva, Mora y Fresa obtenidos por ambos métodos.

6. Los extractos de Fresa no son los adecuados para obtener este tipo de colorantes por su poca estabilidad (decoloración durante un lapso corto de almacenamiento).
7. Los extractos de Mora y Uva son los adecuados para obtener este tipo de colorantes por la estabilidad que presentan.
8. Se utilizó el Benzoato de Sodio como agente conservante para estos colorantes para evitar descomposiciones de carácter microbiológico.
9. El Método de Secado al Vacío no es el adecuado para obtener el colorante en polvo por los diferentes azúcares presentes en los flavonoides, lo que le confiere apariencia de caramelo.
10. Las pruebas microbiológicas para Coliformes Totales y *Escherichia coli* dieron resultados negativos, lo cual indica que las muestras en análisis no presentaban contaminación.
11. Algunos de los extractos presentaron resultados positivos a Mohos y Levaduras debido a la contaminación por el ambiente.
12. Al elaborar el Pan (a nivel casero) para verificar el poder tintóreo de los colorantes seleccionados (Mora, Fresa y Uva en alcohol etílico y alcohol etílico acidificado por método Soxhlet y Maceración) se pudo comprobar que el colorante de la Mora tiene mayor poder tintóreo comparado con las otras muestras.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES.

1. Realizar la extracción del colorante de la Mora, Fresa y Uva utilizando el método Soxhlet.
2. Utilizar el alcohol etílico y alcohol etílico acidificado para obtener una mayor extracción de colorantes en Mora, Fresa y Uva.
3. Investigar las restricciones del alcohol etílico contenido en estos colorantes para su utilización en la industria alimenticia (principalmente la destinada a niños) y declarar porcentaje en etiqueta.
4. Realizar el proceso de Liofilización a partir de los extractos para obtener el o los colorantes en polvo.
5. Realizar la purificación de los colorantes obtenidos para evitar interferencias al momento de identificarlos y también para evitar interacciones con los componentes de los productos donde serán aplicados.
6. Realizar pruebas específicas de identificación para Flavonoides, como las Técnicas Espectroscópicas Ultravioleta, Resonancia Magnética Nuclear de Protones, Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 y Espectrometría de Masas.

7. Realizar las pruebas microbiológicas por triplicado para mayor validez de resultados.
8. Utilizar las muestras con diferentes diluciones para facilitar así el recuento de los microorganismos si es que están presentes, llevando a cabo pruebas específicas para identificarlos.
9. Realizar estudios clínicos y toxicológicos adecuados para colorantes previo a su utilización en la Industria Alimenticia y Farmacéutica.
10. Utilizar el colorante de la Mora en la elaboración de pan por su poder tintóreo.
11. Realizar estudios fitoquímicos y de estabilidad en la Fresa, ya que los extractos de esta presentaron poca decoloración comparada con los extractos de la Uva y Mora.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Bruneton, J.1975. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosía. España. Zaragoza. Editorial Acribia, S. A. p. 159-175.
2. Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria. v. 1. p. 177-178, 228-230.
3. Domínguez. J.A. Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Editorial Limusa.
4. Evans, W.C. 1991. Farmacognosia. 13 ed. México. Interamericana Mc Graw-Hill. p. 305-306.
5. Frazier, W. C. y otros. 1993. Microbiología de los Alimentos. 4 ed. España. Editorial Acribia, S. A.
6. Fresno, A. M. V. del. 1999. Farmacognosia. General. España. Editorial Síntesis. p. 66-67, 83-85, 90-91, 209-217, 219-233.
7. Grupo Editorial Océano. 1991. Paladar Cocina y Repostería. España. Barcelona. v. 2. p. 261.

8. Grupo Editorial Océano. 1992. Diccionario Enciclopédico Ilustrado Océano Uno. Colombia.
9. Interamericana McGraw-Hill.1989. Diccionario Medico de Bolsillo Dorland. 23 ed. España.
10. LIBSA Editorial S.A. 2004. Hierbas y Plantas Curativas. España. p. 28-29.
11. Merck & CO.1983. The Merck Index. Tenth edition. p.1833.
12. Mortimer, Charles E. 1983. Química. 5 ed. México. Grupo Editorial Iberoamerica.
13. United States Pharmacopeial Convention. INC. 2002. The United States Pharmacopeia. Twenty Fourth Edition (USP 24). National Formulary. Nineteenth Edition (NF 19). EEUU. p. 2349, 2351, 2352.
14. <ftp://ftp.mmm.com/pub/Mx/PYM.pdf>
15. <ftp://mmm.com/pub/Mx/PEC.pdf>
16. <http://bioaplicaciones.galeon.com/index.html>

17. <http://docencia.udea.edu.co/~farmacogfit/flavonoides/>
18. <http://html.rincondelvago.com/colorantes.html>
19. <http://usuarios.lycos.es/vicobos/nutricion/quimica7.html>
20. <http://www.basktek.com.mx/atributos.html>
21. <http://www.bibvirt.futuro.usp.br/especiais/frutasnobrasil/amora.html>
22. <http://www.botanical-online.com/medicinalesantocianinas.htm>
23. http://www.bvs.sld.cu/revistas/sint/vo/4_1_98/sint5198.htm
24. <http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/categorias/color2.doc>
25. <http://www.hipernatural.com/es/index.html>
26. <http://www.manaxx.com/liofili.htm>
27. <http://www.portalalimentos.com.ar/colorantes/>

28. <http://www.portalalimentos.com.ar/colorantes/cnaturales.php>

29. <http://www.uesb.br/sbcn/sucedaneos.html>

30. <http://www.webcolombia.com/plantascurativas/vid.htm>

31. <http://raulalberto.tripod.com.co/paginadealimentos/id57.html>

32. www.flaqt.com/conferenciasXVIcongreso/americas.htm

GLOSARIO ^(8,9).

- **Absorber:** atraer un cuerpo de modo que se difunda en su interior; moléculas de un líquido o gas con que está en contacto.
- **Adsorber:** atraer y retener en su superficie moléculas o iones de otro cuerpo en estado líquido o gaseoso.
- **Angiosperma:** son las plantas más completas, además de contar con todos los caracteres de las gimnospermas, cuentan con flores completas con cáliz, corola, estambres y carpelos. Los óvulos quedan encerrados en el ovario y la semilla permanece dentro del fruto.
- **Aquenios:** fruto seco, indehiscente y con pericarpio separado del tegumento de la semilla.
- **Astringente:** sustancia que provoca una contracción fibrilar de los tejidos orgánicos.
- **Briofitas:** plantas criptógamas que tienen tallos y hojas, pero carecen de vasos y raíces, fijándose al suelo mediante unos filamentos que absorben el agua con las sales que necesitan para nutrirse; viven en lugares húmedos y algunas son acuáticas.
- **Cistitis:** inflamación de la vejiga.
- **Colorante:** adj. que colorea. Química e Industria. Cualquier sustancia capaz de teñir o colorear un material.
- **Decocción:** acción de cocer en agua sustancias vegetales o animales.

- **Droga:** el concepto farmacológico y médico de la palabra droga es cualquier sustancia química capaz de modificar el funcionamiento de un ser vivo. La modificación puede ser beneficiosa o perjudicial y depende del tiempo de administración y de la dosis. Nombre genérico de ciertas sustancias minerales, vegetales o animales, que se emplean en la medicina y en la industria.
- **Eczema:** afección de la piel caracterizada por vejiguillas muy espesas que forman manchas irregulares o rojizas.
- **Embeber:** absorber un cuerpo sólido poroso otro en estado líquido; empapar o impregnar de líquido una cosa porosa o esponjosa.
- **Estomatitis:** inflamación de la mucosa bucal a causa de factores locales o generales, que pueden abarcar las mucosas bucal y labial, el paladar, la lengua, el suelo de la boca y las encías.
- **Febrífuga:** sustancia que elimina o reduce la fiebre.
- **Flebitis:** inflamación de las venas.
- **Fluorescencia:** propiedad que tienen algunos cuerpos de mostrarse luminosos, mientras reciben la excitación de ciertas radiaciones.
- **Gemación:** modo de reproducción propio de muchas plantas y muchos animales invertebrados, que se verifica separándose del organismo una pequeña porción del mismo llamado yema, la cual se desarrolla y forma un nuevo ser.

- **Gimnospermas:** son plantas muy antiguas que tienen el lóbulo y la semilla al descubierto, no encerrado en el ovario. Sus flores carecen de cáliz y corola, pero tienen estambres y carpelos.
- **Glabra:** Lampiño.
- **Glúcido:** este nombre proviene de que pueden considerarse derivados de la glucosa por polimerización y pérdida de agua. El vocablo procede del griego *glycys*, que significa dulce.
- **Helechos:** nombre común de las plantas pteridófitas. En general viven en lugares húmedos y sombríos.
- **Hemostasia:** conjunto de procesos que impiden la salida de sangre al exterior cuando existe una lesión vascular.
- **Hemostático:** todo medio físico o químico que favorece la hemostasia.
- **Hollejo:** piel delgada de algunas frutas o legumbres.
- **Lampiño:** Liso, falta de pelos.
- **Litiasis:** trastorno caracterizado por formación de cálculos y concreciones.
- **Mesófilo:** espacio comprendido entre la epidermis inferior y la superior de las hojas de los vegetales.
- **Molturar:** moler granos o frutos.
- **Mondar:** quitar la cáscara, vaina, etc., a las frutas, tubérculos y legumbres.
- **Pigmento:** sustancia que posee color propio por reflexión de determinadas longitudes de onda del espectro visible.
- **Rinitis:** inflamación de la mucosa de la nariz.
- **Termolábil:** que se altera fácilmente por la acción del calor.

- **Tintóreo:** aplicase a las plantas de donde se extraen sustancias colorantes.
- **Tisis:** consunción, agotamiento, extenuación.
- **Trocear:** dividir en trozos.
- **Urticaria:** reacción vascular de la piel caracterizada por aparición transitoria de manchas (ronchas) lisas y ligeramente elevadas, más rojizas o más pálidas que la piel circundante, que suele acompañarse de prurito intenso.
- **Versátil:** que se vuelve o se puede volver fácilmente adaptable a diversos usos y funciones.

ANEXOS

ANEXO 1

TABLAS DE IDENTIFICACIÓN PARA FLAVONOIDES.

Tabla No. 10 Identificación para Flavonoides (3).

PRUEBA	REACTIVO	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Ensayo de Shinoda	Magnesio Metálico, Ácido Clorhídrico Concentrado.	Coloración Amarilla-Roja	Flavonas y Flavonoles
		Coloración Roja	Flavononoles
		Coloración de Rojo-Violeta-Azul	Flavanonas
		Negativo	Isoflavonas, Chalconas y Auronas

Tabla No.11 Identificación para Flavonoides (17).

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

Tabla No. 12 Identificación para Flavonoides (3).

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

Tabla No. 13 Identificación para Antocianinas (17).

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

ANEXO 2

LISTADO DE REACTIVOS, CRISTALERÍA Y EQUIPO

REACTIVOS:

- Ácido Clorhídrico 1N.
- Ácido Clorhídrico Concentrado.
- Ácido Tartárico.
- Agua destilada.
- Alcohol Etílico Acidificado.
- Alcohol Etílico.
- Benzoato de Sodio.
- Hidróxido de Sodio 1N.
- Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada.
- Papel Litmus azul.
- Papel Litmus rojo.
- Papel pH.
- Solución Salina 0.9% estéril.

CRISTALERIA:

- Agitador de Vidrio.
- Baño María.
- Beaker 10 mL.
- Beaker 25 mL.
- Beaker 50 mL.

- Beaker 400 mL.
- Beaker 600 mL.
- Cápsulas de Porcelana.
- Cartucho de tela.
- Desecador esmerilado para vacío.
- Embudo de vidrio.
- Espátula.
- Frascos ámbar con capacidad para 20 mL y tapón de rosca color blanco.
- Frascos de plástico blanco con capacidad de 500 mL. y tapón de rosca color blanco.
- Gotero.
- Gradilla.
- Malla de asbesto.
- Papel filtro.
- Papel glacil.
- Pipetas de 1 mL.
- Pipetas de 10 mL.
- Probeta de 10 mL.
- Probeta de 100 mL.
- Termómetro.
- Tubos de ensayo.
- Vidrio de reloj.

EQUIPO:

- Autoclave.
- Balanza Analítica.
- Balanza Granataria.
- Bomba de Vacío.
- Cocina Eléctrica.
- Contador de Colonia.
- Equipo Soxhlet (Balón esmerilado 250 mL., Corneta, Refrigerante).
- Horno eléctrico.
- Hot Plate.
- Incubadora.

ANEXO 3 (1, 13, 11).

Tabla No. 14 Preparación de Reactivos.

REACTIVO	COMPONENTES	PROCEDIMIENTO
Alcohol Etílico Acidificado	0.7 g. de Acido Tartárico 250 mL de Alcohol Etílico	Adicionar Acido Tartárico al Alcohol Etílico hasta llegar a pH 6.*
Mezcla Alcohol Etílico - Agua destilada (60:40)	150 mL de Alcohol Etílico 100 mL de Agua destilada	Adicionar el Agua destilada al Alcohol Etílico y mezclar.*
Hidróxido de Sodio 1N (NaOH)	0.8 g. de perlas de NaOH 50 mL de Agua destilada libre de CO ₂	Disolver las perlas de NaOH en H ₂ O destilada libre de CO ₂ y llevar a volumen (utilizando baño de hielo).
Acido Clorhídrico 1N	3.32 mL de HCL concentrado 36.68 mL de Agua destilada	Diluir el HCL concentrado sobre el H ₂ O destilada y llevar a volumen de 40 mL.

(*) Preparación de solventes utilizados para la extracción.

ANEXO 4

ANEXO 4 (15).

3M Placas Petrifilm^{MR} para el Recuento de *E. coli* y Coliformes Totales

Recomendaciones de uso

Para detallar información sobre PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

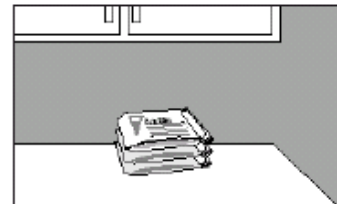
ALMACENAMIENTO



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura \leq a 8°C (46°F). Las placas deben usarse antes de su fecha de expiración. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se temperen a la temperatura del lugar de trabajo antes de abrirlos.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el envoltorio y colóquelo una cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y por lo tanto alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperaturas \leq a 25°C (77°F) y una humedad relativa \leq 50%. No refrigere los paquetes que ya han sido abiertos. Utilice las placas Petrifilm^{MR} máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelo en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelo en congelación, para usar las placas saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde en las mismas condiciones antes descritas.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA



4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetee la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril usual.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH₂PO₄ y con pH ajustado a 7.2), agua de peptona al 0.1%, diluyente de sal peptonada (método ISO 6887), Buffer de agua de peptona (método ISO 6579), solución salina (0.85 a 0.90%), caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

No utilice buffer que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, porque pueden inhibir el crecimiento.

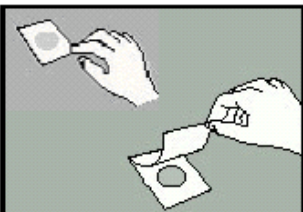


6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

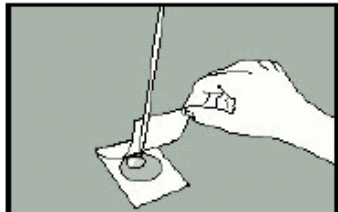
Ajuste el pH de la muestra diluida entre 6.6 y 7.2:

Para productos ácidos: use solución 1N de Na OH
Para productos básicos: use solución 1N de HCl

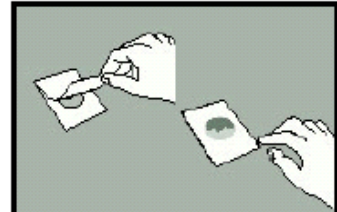
INOCULACIÓN



7 Coloque la Placa Petrifilm^{MR} en una superficie plana y nivelada. Levante la lámina semitransparente superior.



8 Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm^{MR} coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrícula inferior.

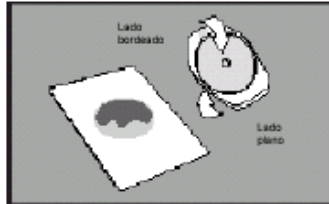


9 Cuidadosamente deslice la película hacia abajo evitando atrapar burbujas de aire. No deje caer la película superior.

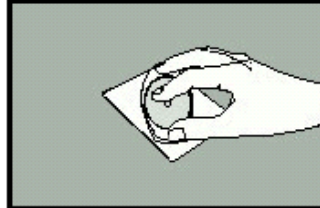
3M Placas Petrifilm^{MR}

para el Recuento de *E. coli* y Coliformes Totales

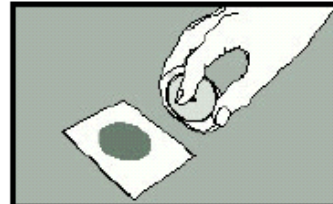
Recomendaciones de uso



10 Con el lado plano hacia abajo coloque el dispersor o esparcidor sobre la película superior, como atrapando el inóculo.



11 Presione suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir el inóculo sobre la área circular. No gire, ni deslice el dispersor. Recuerde distribuir el inóculo antes de inocular una siguiente placa.



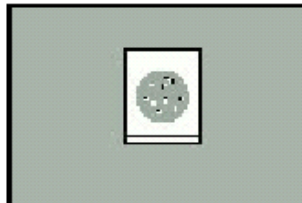
12 Levante el dispersor o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

INCUBACIÓN



13 Incube las placas cara arriba en grupos de hasta 20 unidades de altura. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad.

INTERPRETACIÓN



14 Las placas Petrifilm^{MR} pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo lupa con luz. Referirse a la Guía de interpretación para leer los resultados.



15 Las colonias pueden ser aisladas para identificación posterior. Levante el film superior y repicar la colonia del gel.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos comúnmente aprobados son:

- **AOAC Método oficial 991.14**

Para Coliformes:

Incubar 24 hrs. (+/- 2 hrs.) a 35°C (+/- 1°C)

Para *E. coli*:

Incubar 48 hrs. (+/- 2 hrs.) a 35°C (+/- 1°C)

- **NMK método 147.1993**

Para Coliformes:

Incubar 24 hrs. (+/- 2 hrs.) a 37°C (+/- 1°C)

Para *E. coli*:

Incubar 48 hrs. (+/- 2 hrs.) a 35°C (+/- 1°C)

ANEXO 5

ANEXO 5. (15)

Guía de Interpretación para el Recuento de *E. Coli* y Coliformes Totales.

Las Placas Petrifilm MR para el recuento de *E. Coli* y Coliformes Totales contienen nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría, un indicador de actividad Glucoronidasa y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Aproximadamente el 97% de las colonias de *E. Coli* producen beta glucoronidasa la que a su vez forma un precipitado azul asociado a la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la fermentación de la lactosa por parte de los Coliformes y *E. Coli*. Cerca del 95% de las *E. Coli* producen gas, representados por colonias entre azules y rojo azuladas asociadas con el gas atrapado en la Placa Petrifilm MR EC (dentro del diámetro aproximado de una colonia).

La AOAC internacional y el Manual de Bacteriología Analítica (BAM) de la US FDA define Coliformes como bacilos Gram negativos que producen ácido y gas de la fermentación metabólica de la lactosa. Las colonias de Coliformes en las Placas Petrifilm MR EC durante su crecimiento van generando ácido, por lo que el indicador de pH va oscureciendo o profundizando el color del gel. El gas queda atrapado alrededor de la colonia confirmando la presencia de un coliforme.

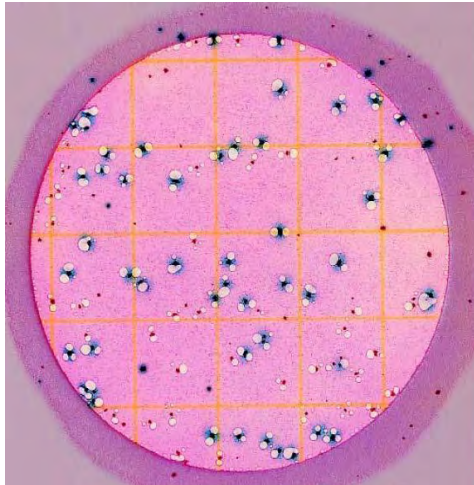


Figura A.

Conteo de *E.coli* =49 (colonias azules con gas)

Conteo de Coliformes Totales =87 (colonias rojas y azules con gas)

Verifique según las Normas locales de su país la aplicación del sistema de conteo y referencia. No use esta placa para la detección de *E. Coli* 0157:H7.

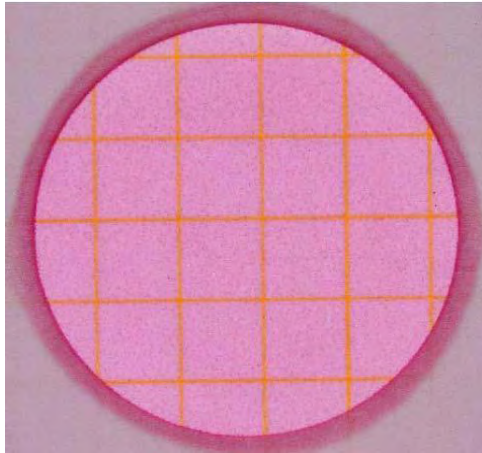
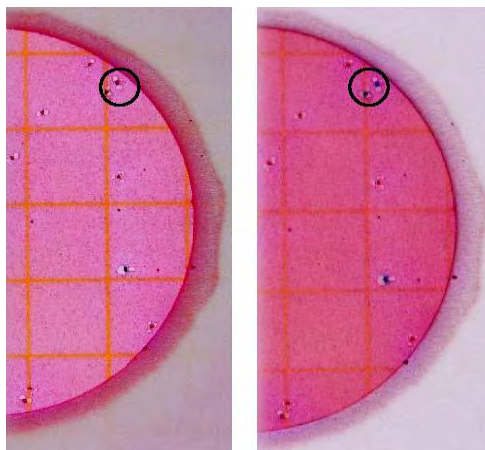


Figura B.
Conteo de *E. coli* / Coliformes= 0

Observe el cambio de color del gel desde la Figura B hasta la I. Al aumentar el conteo de *E. Coli* o Coliformes, el color del gel se vuelve rojo oscuro o púrpura azulado. Las burbujas de fondo son características del gel y no son resultado del crecimiento de microorganismos.



Luz posterior Luz de frente
Figura C.

Conteo de *E. coli* =3

Cualquier azul en una colonia (de azul a rojo-azul) indica la presencia de *E. coli*. La luz de frente mejorará la detección del precipitado azul formado por una colonia. El círculo 1 muestra una colonia rojo-azul cuyo conteo se hizo con luz de atrás. El 2 muestra la misma colonia con luz de frente. El azul precipitado es más evidente en el círculo 2.

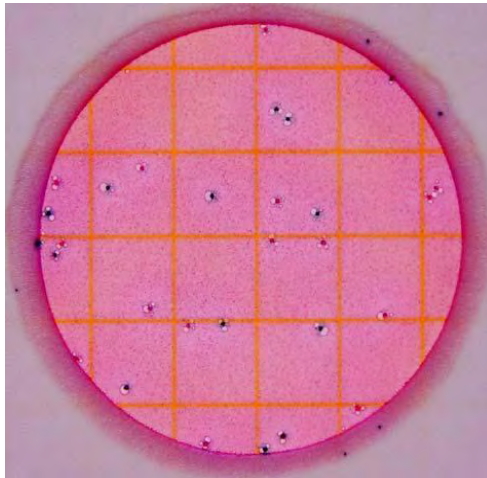


Figura D.
Conteo de ***E. coli*** =13
Conteo de Coliformes = 28

El rango recomendado de conteo en las Placas Petrifilm MR para Recuento de ***E. coli*** y Coliformes Totales es de 15 a 150 colonias. No cuente las colonias que han crecido en la zona de hule por cuanto han sido removidas de la influencia del medio.

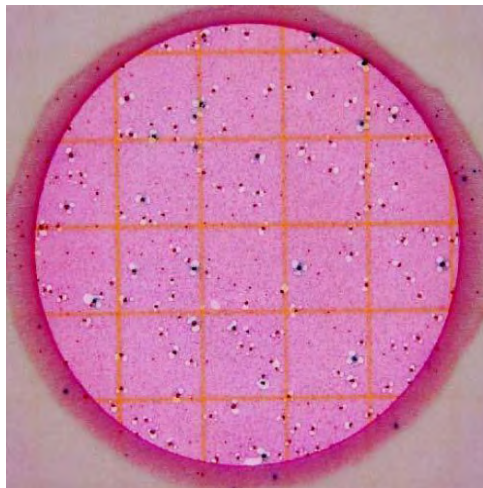


Figura E.
Conteo de ***E.coli*** =17
Conteo de Coliformes = 150 “estimado”

El área circular de crecimiento es de 20 cm² aproximadamente. Conteos estimados pueden hacerse en placas que contengan más de 150 colonias, a través del conteo de cuadros representativos y determinando el promedio por cuadrado. Multiplique el promedio por 20 y determine el valor estimado por placa.

MNPC: muchos números para contar, para obtener mejores resultados, diluya su muestra.

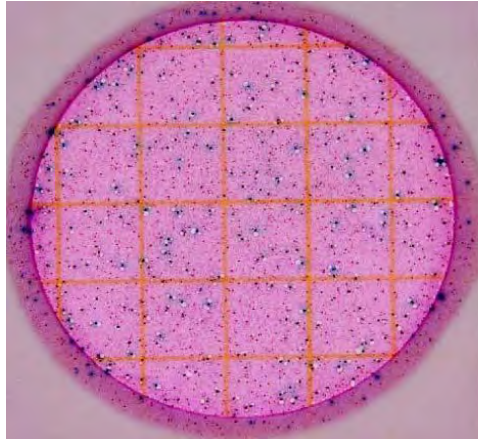


Figura F.
Cuento de *E. coli* = MNPC

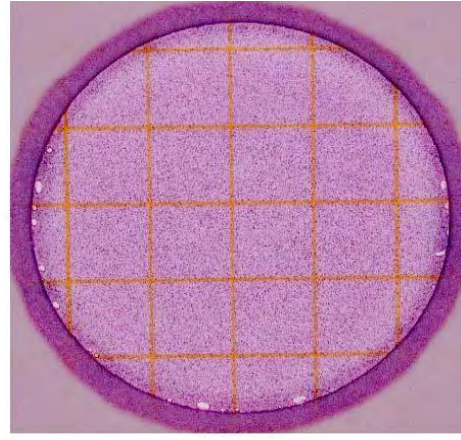


Figura G.
Cuento de *E. coli* = MNPC

La Placa Petrifilm MR EC con crecimiento excesivo (MNPC= muy altas concentraciones de *E. coli* pueden ocasionar que el área sea muy numerosa para contar). Muchas colonias pequeñas, burbujas de gas y oscurecimiento del color del gel de rojo a rojo púrpura.

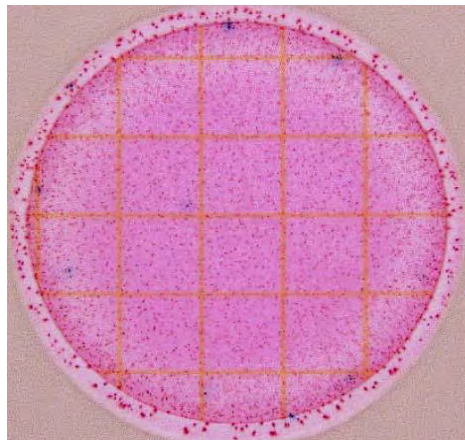


Figura H.
Cuento de *E. coli* = 8
Cuento de Coliformes = MNPC

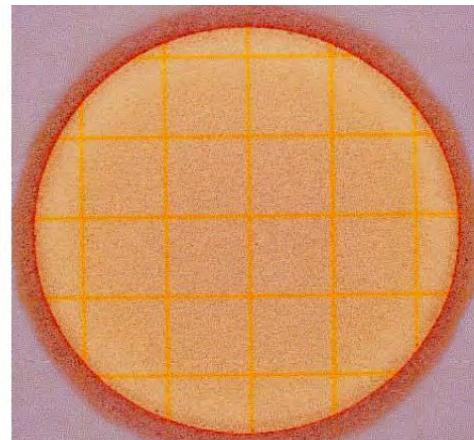


Figura I.
Cuento Total = MNPC

Altas concentraciones de *E. coli* pueden ocasionar que el área de crecimiento cambie a color rojo púrpura, cuando existe presencia de gran número de organismos.

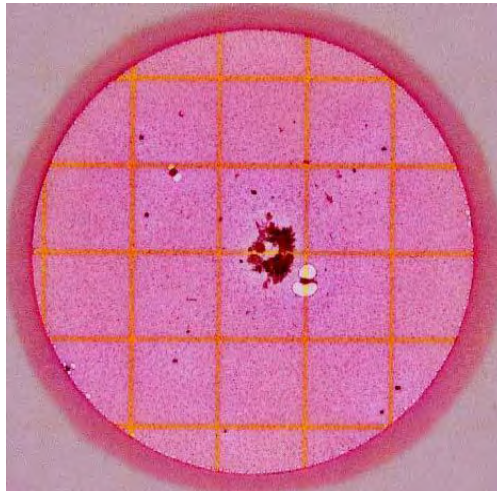


Figura J.
Cuento de Coliformes = 3
Burbujas de aire y partículas de producto.

Las partículas de alimentos son de forma irregular y no están asociadas con burbujas de gas.

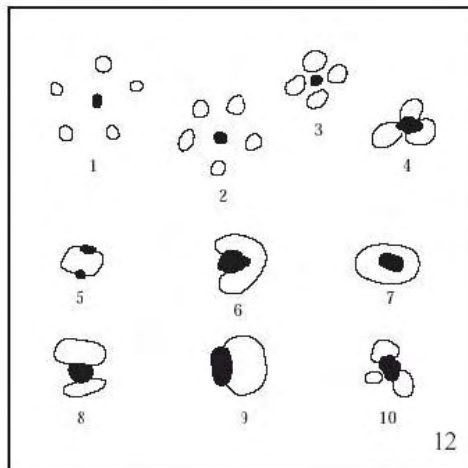


Figura K.

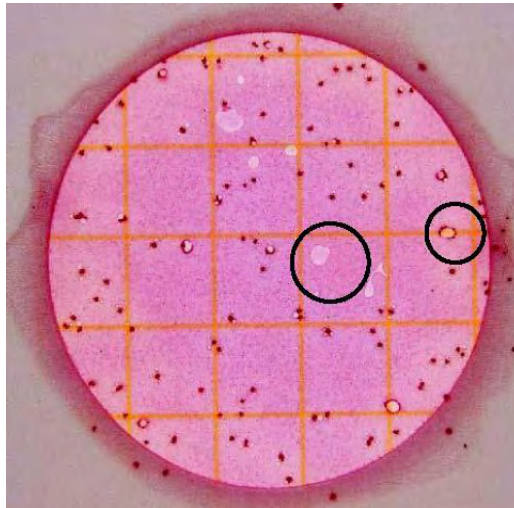


Figura L.
Conteo de Coliformes = 78

Las burbujas pueden resultar de una inoculación inadecuada de la placa, estas son de forma irregular y no están asociadas con una colonia roja. Vea el círculo en la parte central de la placa.

La forma o patrón de las burbujas puede variar. El gas puede romper la colonia como se observa en el círculo del lado derecho de la placa.

Los ejemplos 1-10 de la figura K, muestra varios patrones o formas de burbujas de gas asociadas con las colonias. Todas deben ser enumeradas.

ANEXO 6

Fotografías de pruebas microbiológicas realizadas en placas Petrifilm para Coliformes Totales y *E. coli* en las muestras seleccionadas.

Donde:

C₂ : Placa Control con solución salina 0.9% estéril.

M_x : Muestra.

X : Diferentes muestras seleccionadas para realizar esta prueba.



Fig. No. 8

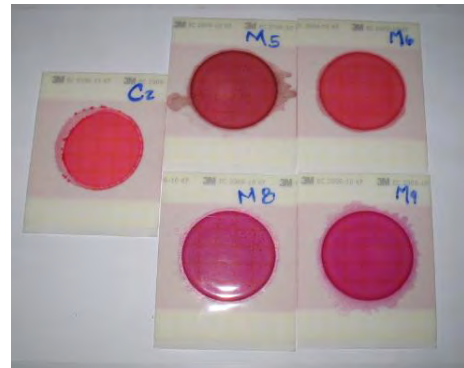


Fig. No. 9

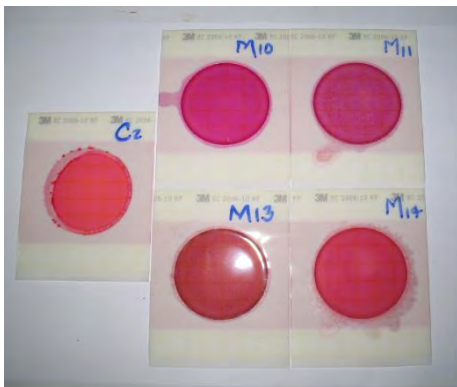


Fig. No. 10



Fig. No. 11

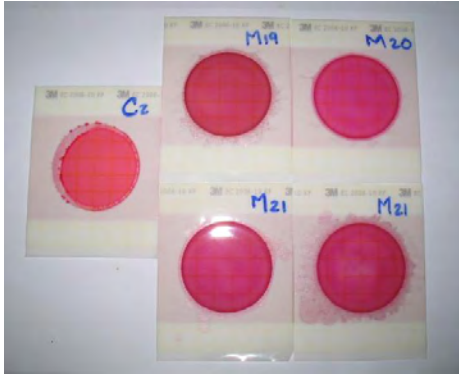


Fig. No. 12

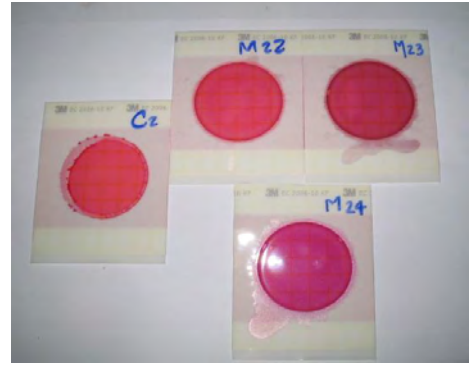


Fig. No. 13

ANEXO 7

ANEXO 7(14).

3M Placas Petrifilm^{MR} para el Recuento de Mohos y Levaduras

Recomendaciones de uso

Para detallar información sobre PRECAUCIONES, COMPENSACIONES POR GARANTÍA / GARANTÍA LIMITADA, LIMITACIONES POR RESPONSABILIDAD DE 3M, ALMACENAMIENTO Y ELIMINACIÓN, e INSTRUCCIONES DE USO, remítase al inserto de producto en el paquete.

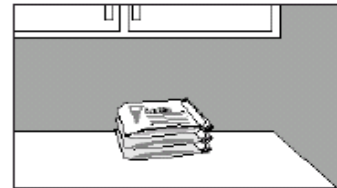
ALMACENAMIENTO



1 Almacene los paquetes cerrados a una temperatura \leq a 8°C (46°F). Las placas deben usarse antes de su fecha de expiración. En áreas de alta humedad, donde la condensación puede ser un inconveniente, es recomendable que los paquetes se temperen a la temperatura del lugar de trabajo antes de abrirlos. Las Placas Petrifilm^{MR} tienen un tiempo de vida útil de 18 meses desde su fecha de elaboración, observe la fecha de caducidad en la parte superior de la placa.



2 Para cerrar un paquete abierto, doble el envoltorio y colóquelo una cinta adhesiva para evitar el ingreso de humedad y por lo tanto alteración de las placas.



3 Mantenga los paquetes cerrados (según se indica en el punto 2) a temperaturas \leq a 25°C (77°F) y una humedad relativa \leq 50%. No refrigere los paquetes que ya han sido abiertos. Utilice las placas Petrifilm^{MR} máximo 1 mes después de abierto el paquete. Para almacenamiento prolongado de paquetes abiertos, una vez cerrados (según punto 2) colóquelo en un contenedor sellable (tipo funda con cierre) y almacénelo en congelación, para usar las placas saque el paquete del congelador, retire el número de placas necesarias y guarde en las mismas condiciones antes descritas.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

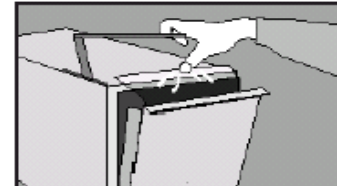


4 Prepare al menos una dilución de 1:10 de la muestra. Pese o pipetee la muestra en una funda o bolsa de Stomacher, botella de dilución o cualquier otro contenedor estéril usual.



5 Adicione la cantidad apropiada de uno de los siguientes diluyentes estériles: tampón Butterfield (tampón IDF fosfato, 0.0425 g/L de KH₂PO₄ y con pH ajustado a 7.2), agua de peptona al 0.1%, diluyente de sal peptonada (método ISO 6887), Buffer de agua de peptona (método ISO 6579), solución salina (0.85 a 0.90%), caldo letheen libre de bisulfato o agua destilada.

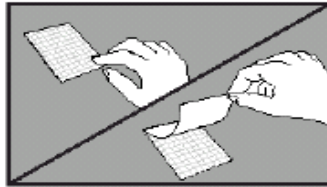
No utilice buffer que contengan citrato, bisulfito o tiosulfato de sodio, por que pueden inhibir el crecimiento.



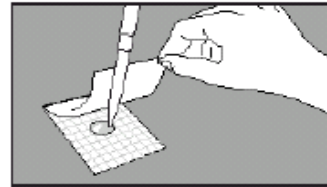
6 Mezcle u homogenice la muestra mediante los métodos usuales.

Las muestras o diluciones no requiere ajustar su pH, sin embargo si este proceso ya ha sido realizado puede igual usarlo en la Placa Petrifilm^{MR} YM

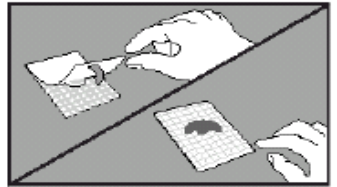
INOCULACIÓN



7 Coloque la Placa Petrifilm^{MR} en una superficie plana y nivelada. Levante la lamina semitransparente superior.



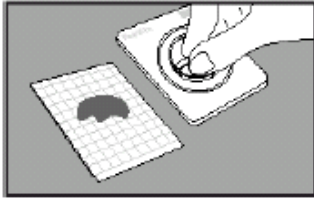
8 Con la pipeta perpendicular a la Placa Petrifilm^{MR} coloque 1 ml de la muestra en el centro de la película cuadrículada inferior.



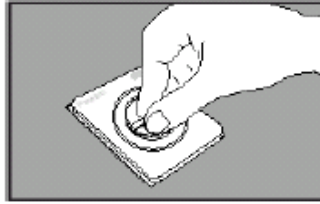
9 Libere la película superior dejando que caiga sobre la dilución. No deslizarla hacia abajo.

3M Placas Petrifilm^{MR} para el Recuento de Mohos y Levaduras

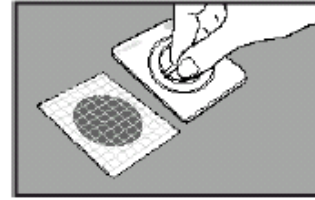
Recomendaciones de uso



10 Sosteniendo la barra cruzada del dispersor o esparcidor para Hongos y Levaduras colóquelo sobre la película superior, como atrapando el inóculo.

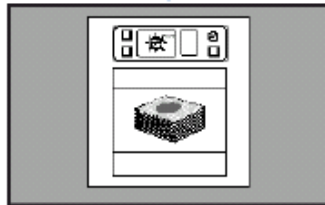


11 Presione suavemente el dispersor o esparcidor para distribuir el inóculo sobre el área circular. No gire, ni deslice el dispersor. Recuerde distribuir el inóculo antes de inocular una siguiente placa.



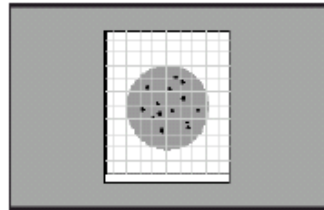
12 Levante el dispersor o esparcidor. Espere por lo menos 1 minuto a que se solidifique el gel y proceda a la incubación.

INCUBACIÓN



13 Incube las placas cara arriba en grupos de hasta 20 unidades de altura. Puede ser necesario humectar el ambiente de la incubadora con un pequeño recipiente con agua estéril, para minimizar la pérdida de humedad. Los Hongos grandes o de crecimiento rápido pueden ocultar los resultados al día 5. Observe las placas al día 3 y registre los resultados de las placas con altos conteos. Si las Placas están con demasiado crecimiento al día 5, registre el resultado obtenido al día 3 como "estimado".

INTERPRETACIÓN



14 Las placas Petrifilm^{MR} pueden ser contadas en un contador de colonias estándar u otro tipo lupa con luz. Referirse a la Guía de Interpretación para leer los resultados.

El tiempo de incubación y la temperatura varían según el método. Los métodos comúnmente aprobados son :

- **AOAC método oficial 997.02**
(En alimentos)
Incubar 5 días entre 21°C-25°C

ANEXO 8

ANEXO 8. (14)

Guía de interpretación para el Recuento de Mohos y Levaduras.

La placa Petrifilm para recuento de Mohos y Levaduras (Yeast & Molds YM) es un sistema de medio de cultivo listo para ser empleado, contiene nutrientes de "Sabih", dos antibióticos, indicador de fosfatos (BCIP), un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Las Placas Petrifilm MY se utilizan en la enumeración de la población total existente de Mohos y Levaduras en productos, ambientes, superficies, etc.



Fig. A
Conteo de Levaduras =44

Las colonias en la figura A son ejemplos de Levaduras y tienen las siguientes características:

- Colonias pequeñas.
- Colonias con filos definidos.
- Colonias con un rango de color desde beige o crema hasta azul verdoso, pueden también tener tonos rosas.
- Colonias tienen apariencia abultada, es decir con una tercera dimensión: convexas.
- Color uniforme, no difusas.

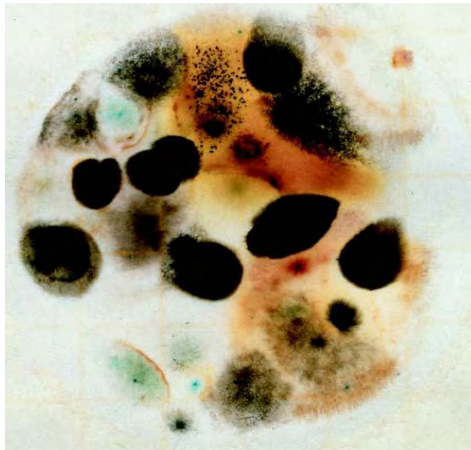


Fig. B
Conteo de Hongos = 27

Las colonias de la Figura B son ejemplos de Mohos y tienen las siguientes características:

- Colonias grandes.
- Colonias con bordes difusos.
- Colonias de colores variables, por ejemplo: café, beige, naranja, azul verdoso, etc.
- Colonias que tienen apariencia plana.
- Tienen un centro oscuro y se expanden difusamente alrededor del mismo.

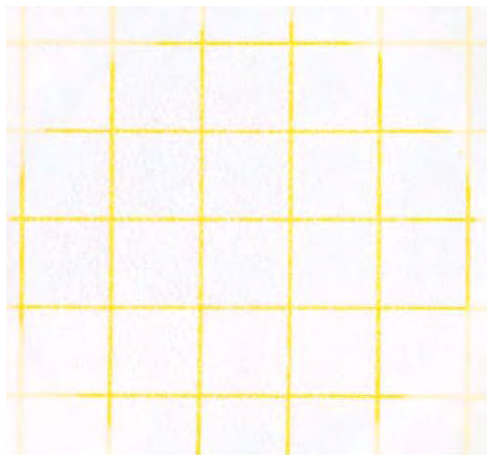


Fig. C
Conteo de Mohos y Levaduras = 0

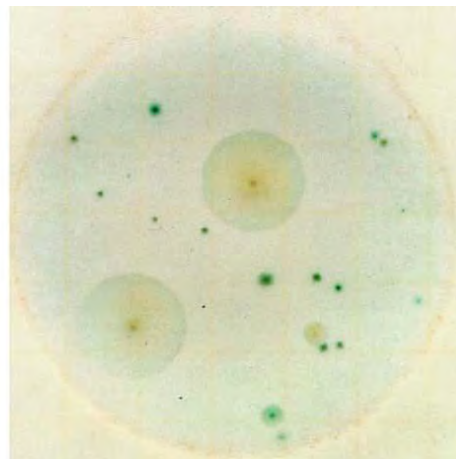


Fig. D
Conteo de Levaduras = 12
Conteo de Mohos = 4

En la Figura C se muestra una Placa Petrifilm para Recuento de Mohos y Levaduras sin crecimiento de Hongos ni Levaduras. En la Figura D muestra crecimiento bajo de colonias de Mohos y Levaduras.

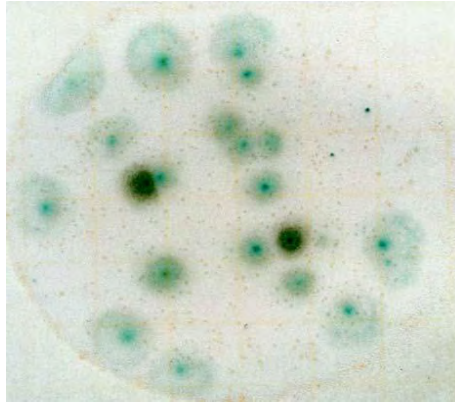


Fig. E
Conteo de Levaduras = 480 "estimado"
Conteo de Mohos = 21

Cuando el número de colonias es mayor a 150 como se puede observar en la Figura E por su excesivo crecimiento, los conteos deben ser estimados. Determine el promedio de colonias en un centímetro cuadrado (cm^2) y multiplíquelo por 30 para obtener el conteo total por placa. El área de inoculación de Petrifilm YM es 30 cm^2 .

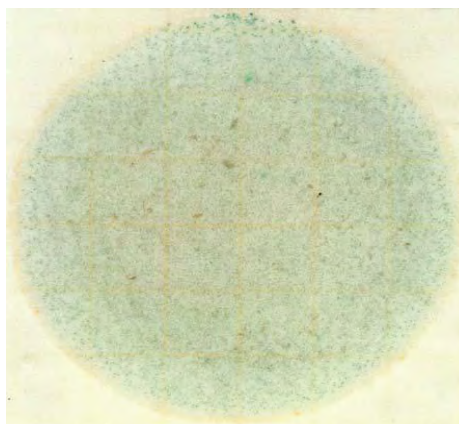


Fig. F
Conteo de Levaduras = MNPC

Conteo estimado: $>10^4$ la Figura F corresponde a una placa Petrifilm YM que contiene demasiadas colonias de Levaduras para contar (MNPC). Las colonias azules pequeñas resaltadas en el recuadro del borde del área de crecimiento se encuentran presentes a través de toda la placa, pero menos visibles.

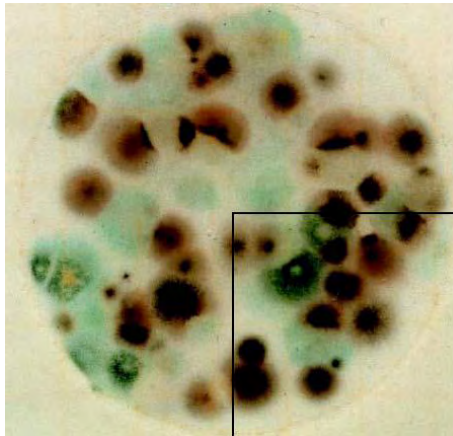
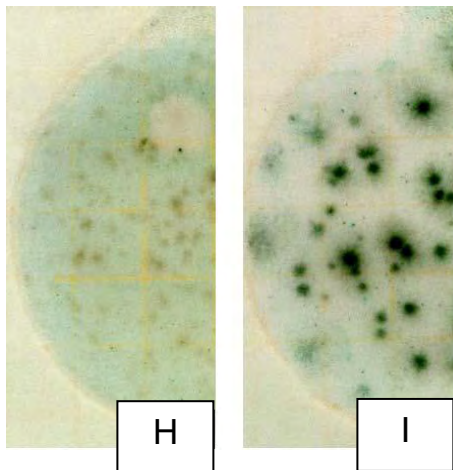


Fig. G
Conteo de Mohos = 59

Las colonias de Mohos de la Figura G están empezando a unirse y sobreponerse una encima de otra en la placa. Cuento cada centro como una colonia. La placa se puede dividir en secciones para facilitar el conteo. La sección remarcada en la Figura G tiene 15 Mohos.



Conteo de Mohos = 12 (Figura H)
Conteo de Mohos = 4 (Figura I)

Las placas que se muestran en la Figura H e I son de la misma muestra. La Figura H corresponde a una dilución 1:10 y tiene colonias que son muy pequeñas, tenues y numerosas, haciendo muy difícil su conteo. La Figura I corresponde a la dilución 1:100 y muestra como diluyendo las muestras se puede obtener placas con conteos deseables (15-150) lo que facilita la enumeración.

REACCIÓN DE FOSFATASA.

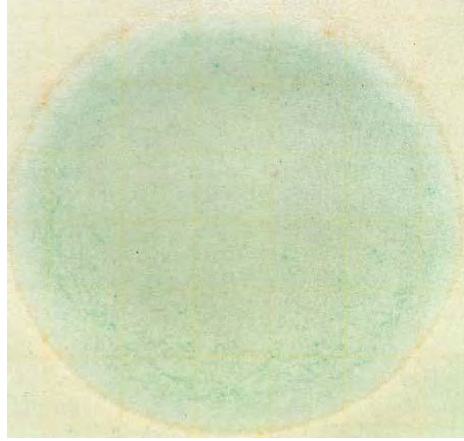


Fig. J

Conteo de Mohos y Levaduras = 0

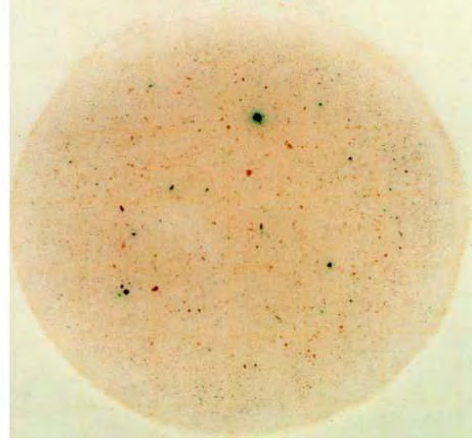


Fig. K

Conteo de Mohos y Levaduras = 0

La placa Petrifilm YM tiene un tinte indicador de Fosfatasa. Por eso algunos productos procesados que contienen fosfatasa pueden causar un cambio de color del gel. Se pueden observar dos tipos de reacciones: un color uniforme azul (Figura J) o cabezas de alfiler o puntos de color azul intenso (círculos en la Figura K) que suelen presentarse en placas de especies y productos granulados.

ANEXO 9

Fotografías de pruebas microbiológicas realizadas en placa Petrifilm para Mohos y Levaduras en las muestras seleccionadas.

Donde:

C₁ : Placa Control con solución salina 0.9% estéril.

M_x : Muestra.

X : Diferentes muestras utilizadas para realizar esta prueba.

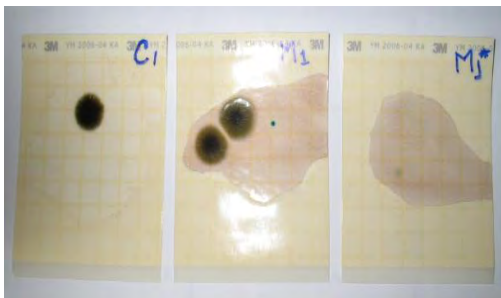


Fig. No. 14



Fig. No. 15

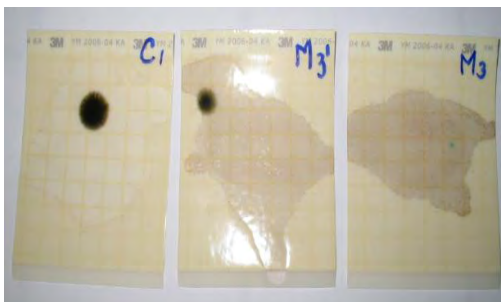


Fig. No. 16

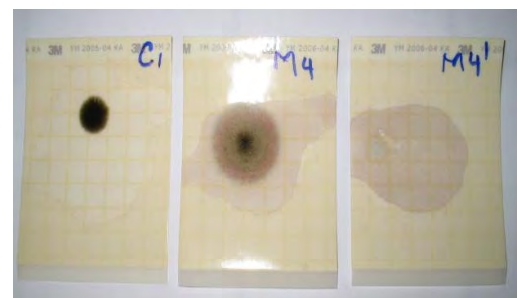


Fig. No. 17

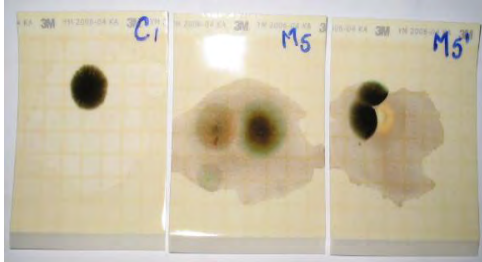


Fig. No. 18

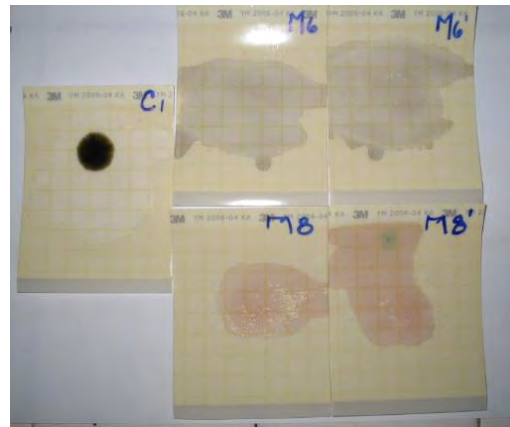


Fig. No. 19

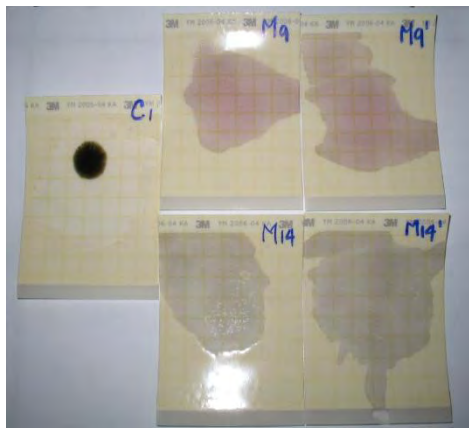


Fig. No. 20



Fig. No. 21

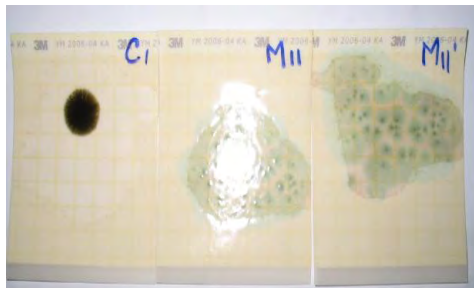


Fig. No. 22



Fig. No. 23

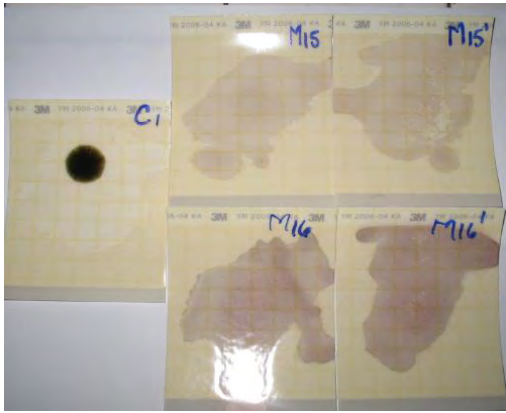


Fig. No. 24

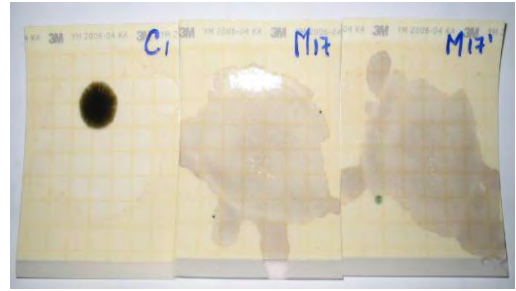


Fig. No. 25

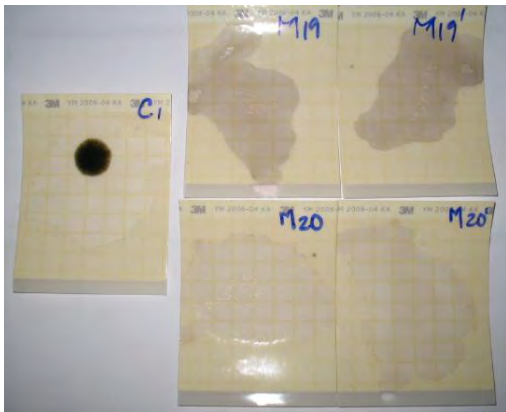


Fig. No. 26

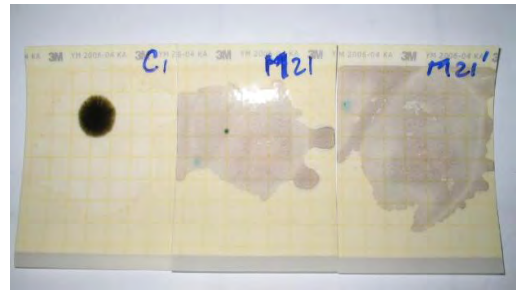


Fig. No. 27

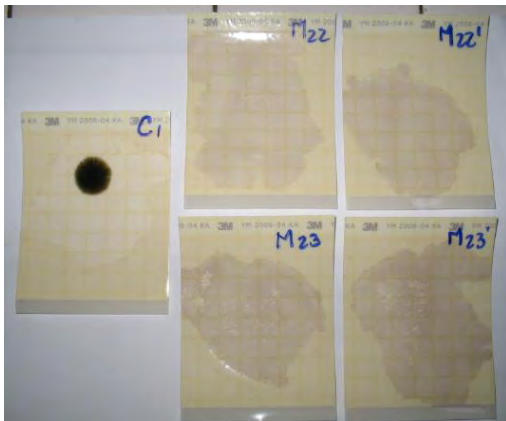


Fig. No. 28



Fig. No. 29

ANEXO 10

TRABAJO DESARROLLADO EN EL LABORATORIO.



Fig. No. 30 Preparación de la Muestra.



Fig. No. 31 Pesado de la Muestra.



Fig. No. 32 Preparación de la Muestra para Maceración.



Fig. No. 33 Extracción por Método Soxhlet.



Fig. No. 34 Preparación de Reactivos.



Fig. No. 35 Realización de Pruebas de Identificación para Flavonoides.



Fig. No. 36 Pesado del Preservante.



Fig. No. 37 Concentración de los extractos en baño de vapor.



Fig. No. 38 Procedimiento del Secado al Vacío.



Fig. No.39 Muestras en Secado al Vacío.



Fig. No. 40 Preparación de las Muestras para las Pruebas Microbiológicas.



ANEXO 11

Fotografías de los Extractos obtenidos por los Métodos Soxhlet y Maceración en los diferentes solventes.

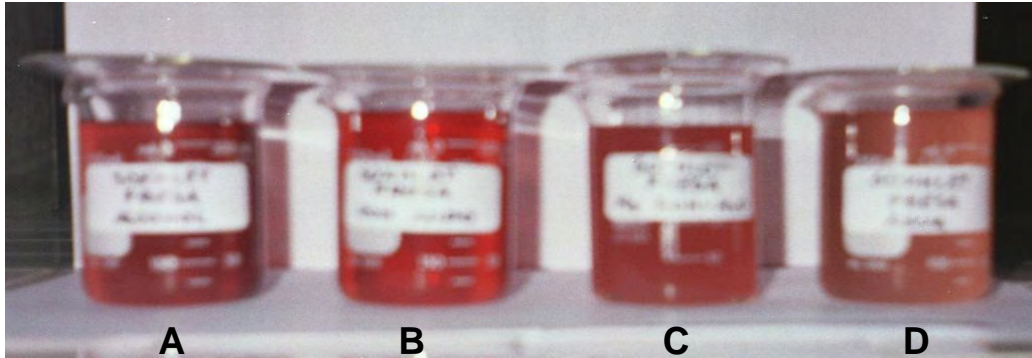


Fig. No. 42 Extractos de la Fresa por Método Soxhlet en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).

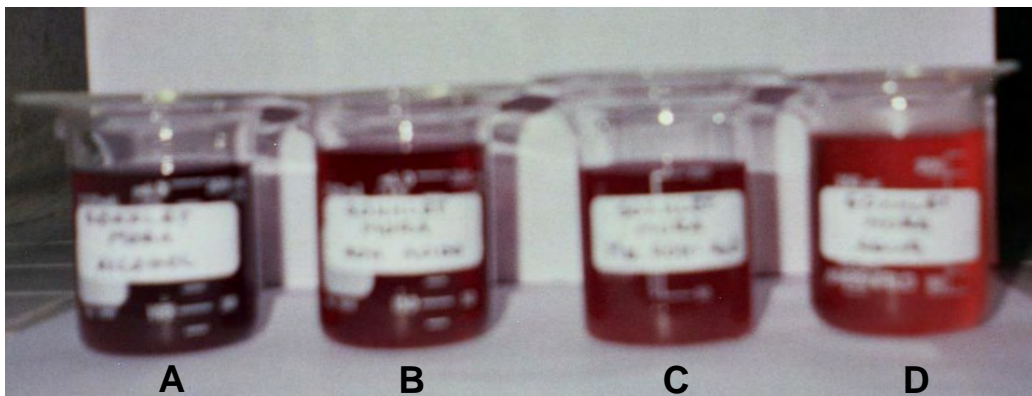


Fig. No. 43 Extractos de la Mora por Método Soxhlet en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).

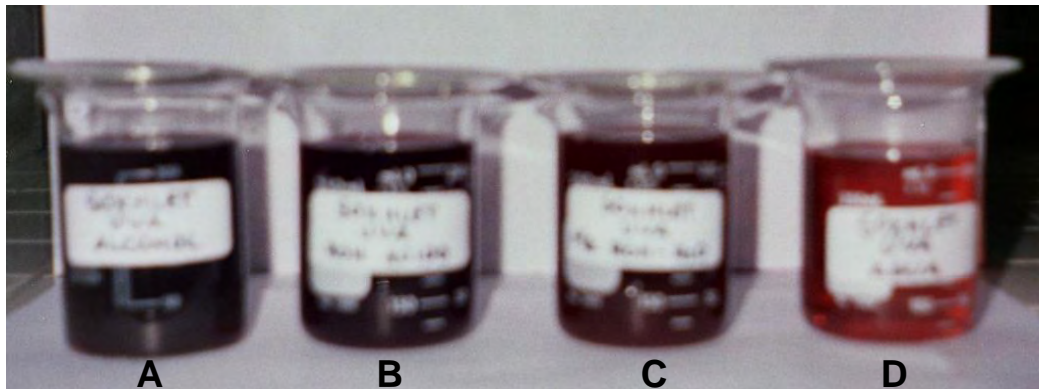


Fig. No. 44 Extractos de la Uva por Método Soxhlet en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).



Fig. No. 45 Extractos de la Fresa por Maceración en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).

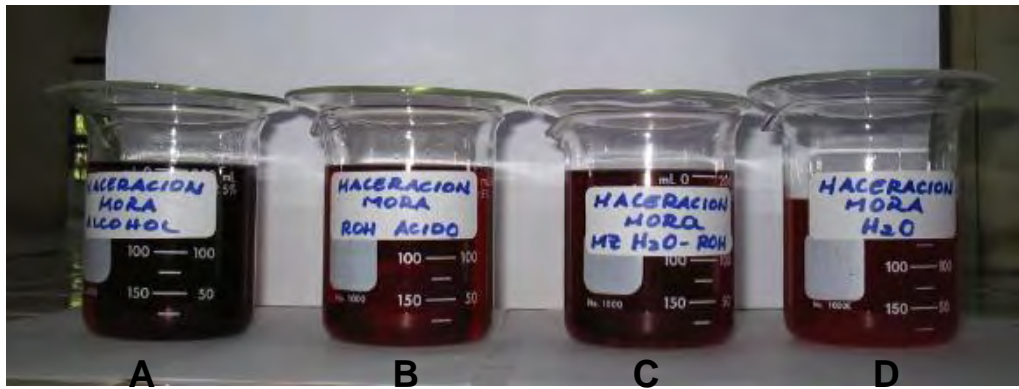


Fig. No. 46 Extractos de la Mora por Maceración en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).

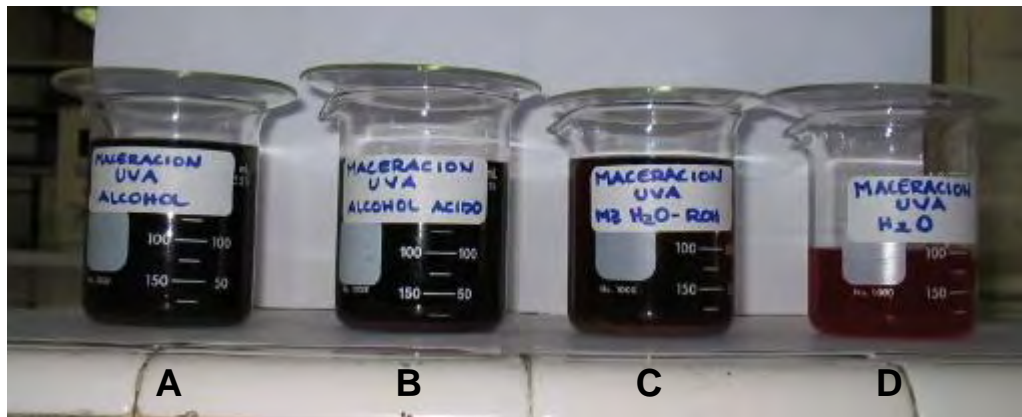


Fig. No. 47 Extractos de la Uva por Maceración en Alcohol Etílico (A), Alcohol Etílico Acidificado (B), Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada (C) y Agua destilada (D).

ANEXO 12

Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides.

Prueba de Shinoda.

Donde:

P1: Patrón Extracto de Mora.

M1: Muestra Extracto de Mora.

P2: Patrón Extracto de Fresa.

M2: Muestra Extracto de Fresa.

P3: Patrón Extracto de Uva.

M3: Muestra Extracto de Uva.

NOTA: El patrón utilizado es el extracto obtenido de cada una de las muestras con los diferentes solventes.

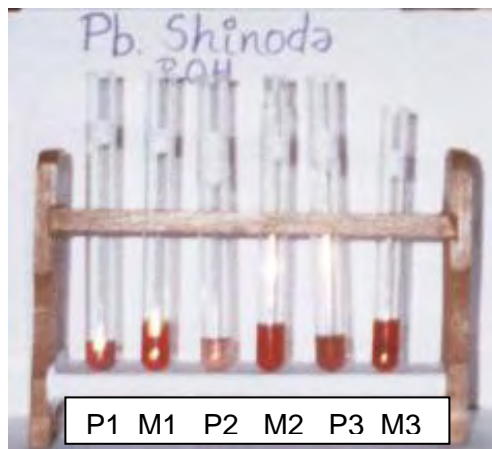


Fig. No. 48 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Eílico por Método Soxhlet.



Fig. No. 49 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Método Soxhlet.

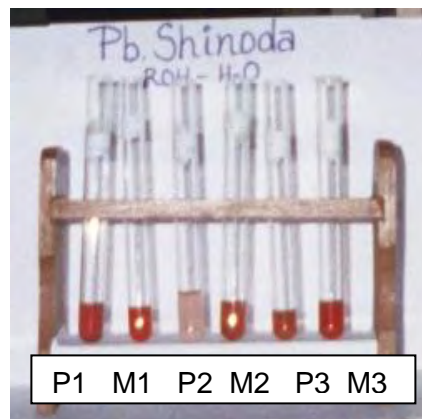


Fig. No. 50 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Método Soxhlet.



Fig. No. 51 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Método Soxhlet.

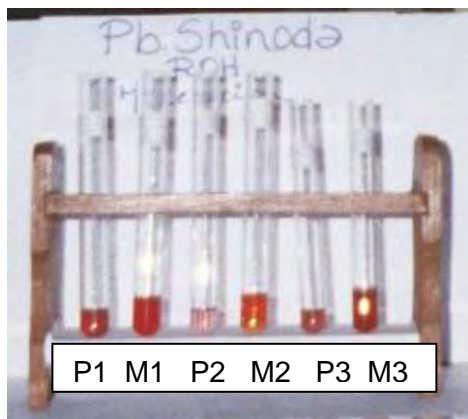


Fig. No. 52 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etilico por Maceración.



Fig. No. 53 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Maceración.

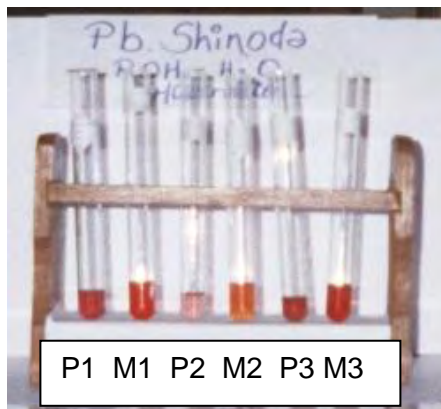


Fig. No.54 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Maceración.

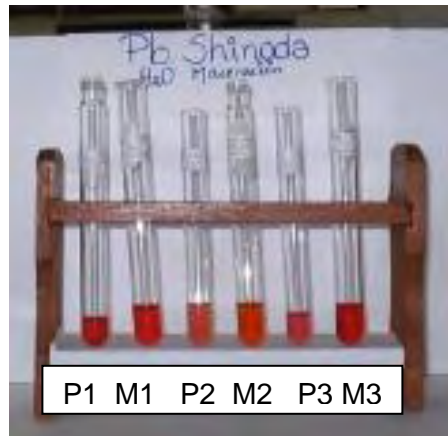


Fig. No. 55 Prueba de Shinoda en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Maceración.

ANEXO 13

Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides.

Prueba con Zn/HCl.

Donde:

P1: Patrón Extracto de Mora.

M1: Muestra Extracto de Mora.

P2: Patrón Extracto de Fresa.

M2: Muestra Extracto de Fresa.

P3: Patrón Extracto de Uva.

M3: Muestra Extracto de Uva.

NOTA: El patrón utilizado es el extracto obtenido de cada una de las muestras con los diferentes solventes.



Fig. No. 56 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico por Método Soxhlet.

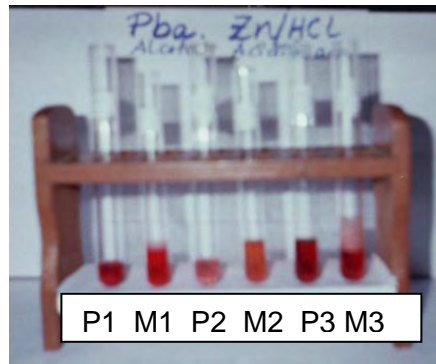


Fig. No. 57 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Método Soxhlet.

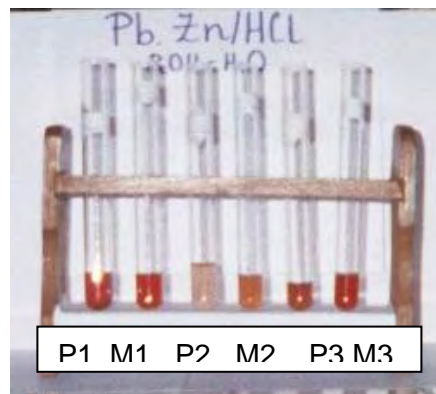


Fig. No. 58 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Método Soxhlet.

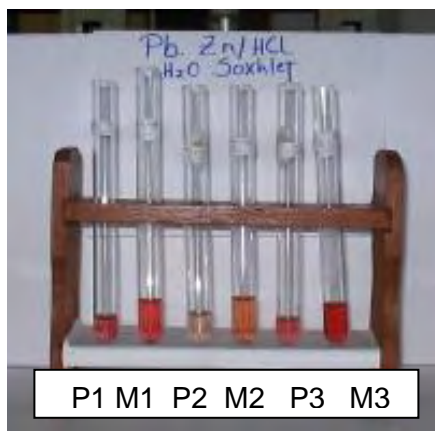


Fig. No. 59 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Método Soxhlet.

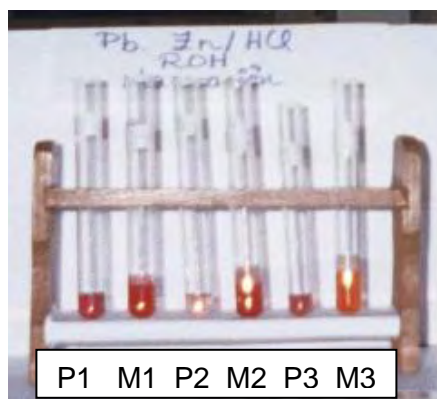


Fig. No. 60 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etilico por Maceración.



Fig. No. 61 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Maceración.

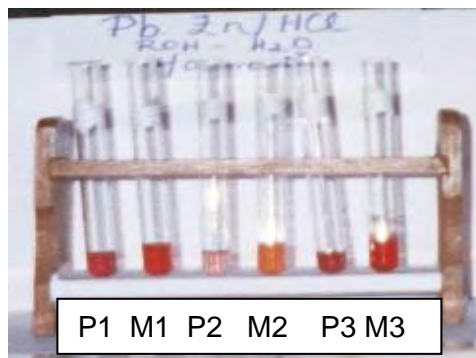


Fig. No. 62 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Maceración.



Fig. No. 63 Prueba con Zn/HCl en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Maceración.

ANEXO 14

Fotografías de Pruebas de Identificación para Flavonoides.

Prueba con Hidróxido de Sodio 1N (NaOH 1N).

Donde:

P1: Patrón Extracto de Mora.

M1: Muestra Extracto de Mora.

P2: Patrón Extracto de Fresa.

M2: Muestra Extracto de Fresa.

P3: Patrón Extracto de Uva.

M3: Muestra Extracto de Uva.

NOTA: El patrón utilizado es el extracto obtenido de cada una de las muestras con los diferentes solventes.

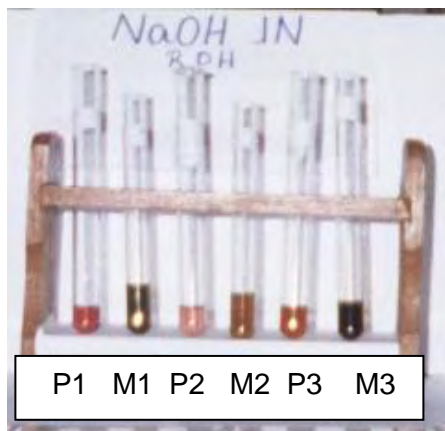


Fig. No. 64 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico por Método Soxhlet.



Fig. No. 65 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Método Soxhlet.

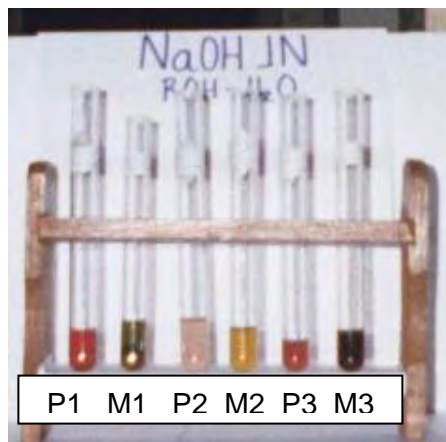


Fig. No. 66 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Método Soxhlet.

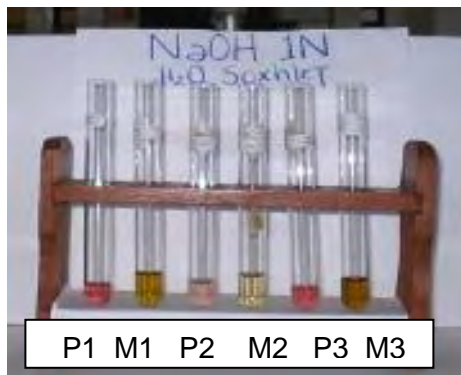


Fig. No. 67 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Método Soxhlet.

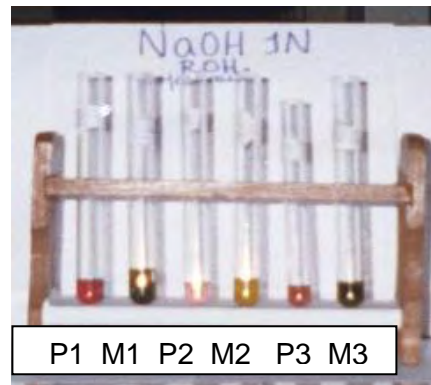


Fig. No. 68 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Eílico por Maceración.

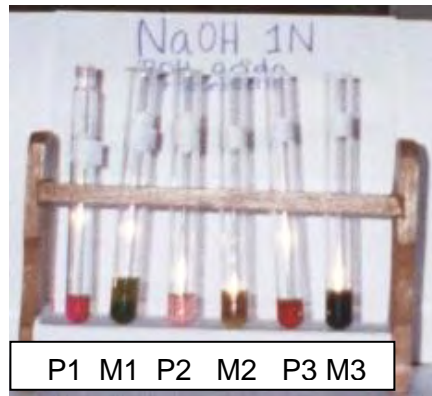


Fig. No. 69 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Maceración.

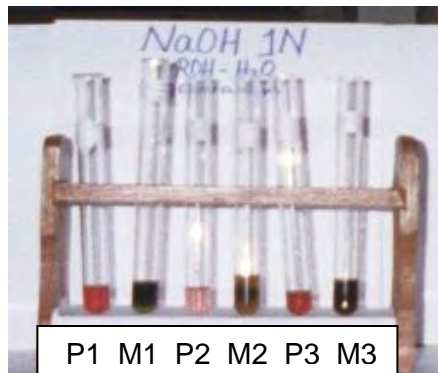


Fig. No. 70 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Maceración.

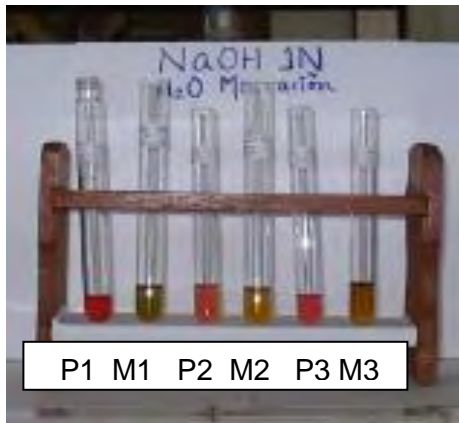


Fig. No. 71 Prueba con NaOH 1N en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Maceración.

ANEXO 15

Fotografías de Identificación de Antocianinas con un pH Ácido.

Donde:

P1: Patrón Extracto de Mora.

M1: Muestra Extracto de Mora.

P2: Patrón Extracto de Fresa.

M2: Muestra Extracto de Fresa.

P3: Patrón Extracto de Uva.

M3: Muestra Extracto de Uva.

NOTA: El patrón utilizado es el extracto obtenido de cada una de las muestras con los diferentes solventes.

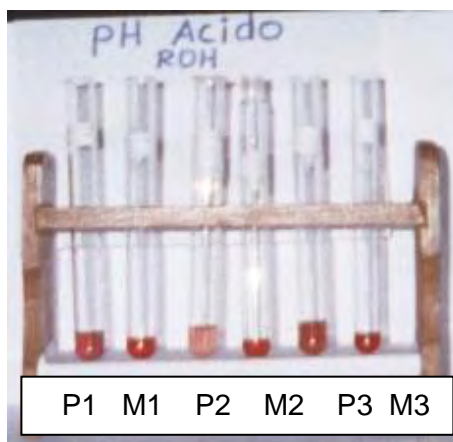


Fig. 72 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etilico por Método Soxhlet.

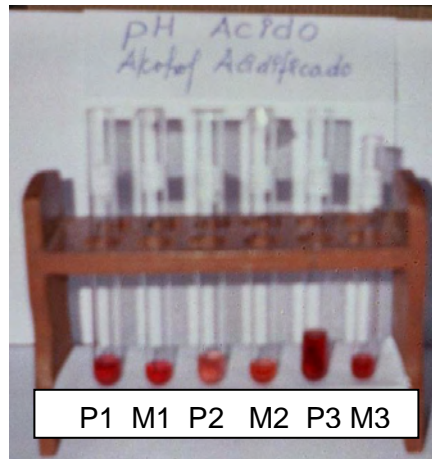


Fig. 73 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Método Soxhlet.

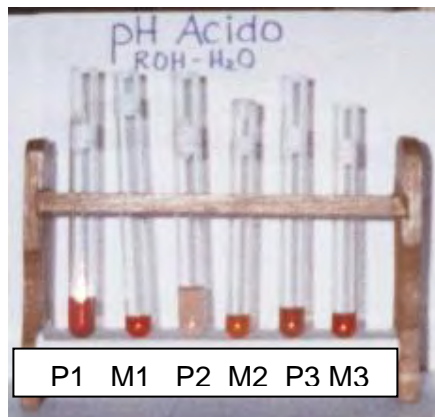


Fig. 74 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Método Soxhlet.

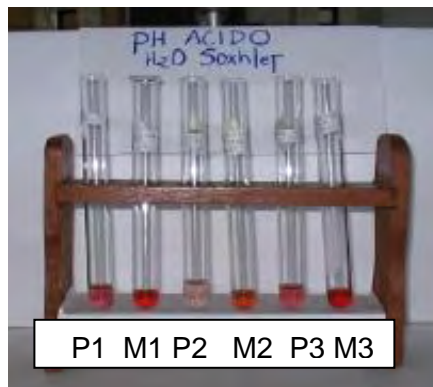


Fig. 75 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Método Soxhlet.

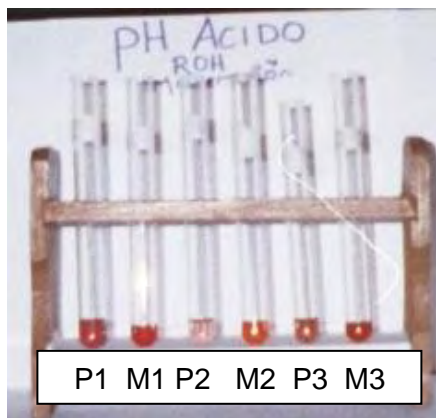


Fig. 76 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico por Maceración.



Fig. 77 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Maceración.

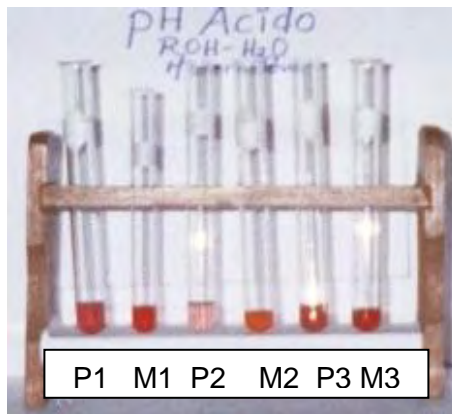


Fig. 78 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etílico-Agua destilada por Maceración.

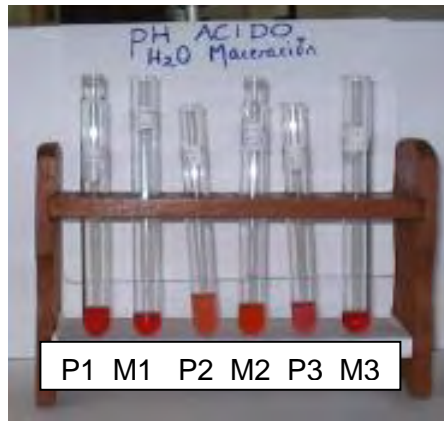


Fig. 79 Identificación de Antocianinas con un pH ácido en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Maceración.

ANEXO 16

Fotografías de Identificación de Antocianinas con un pH Alcalino.

Donde:

P1: Patrón Extracto de Mora.

M1: Muestra Extracto de Mora.

P2: Patrón Extracto de Fresa.

M2: Muestra Extracto de Fresa.

P3: Patrón Extracto de Uva.

M3: Muestra Extracto de Uva.

NOTA: El patrón utilizado es el extracto obtenido de cada una de las muestras con los diferentes solventes.



Fig. 80 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Método Soxhlet.

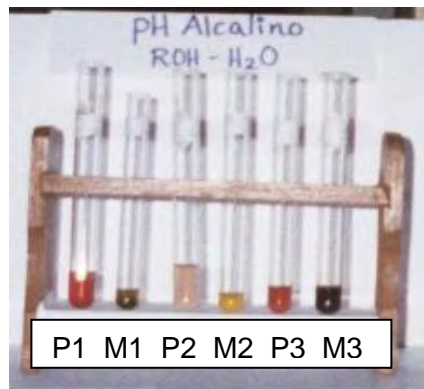


Fig. 81 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etilico-Agua destilada por Método Soxhlet.



Fig. 82 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Método Soxhlet.

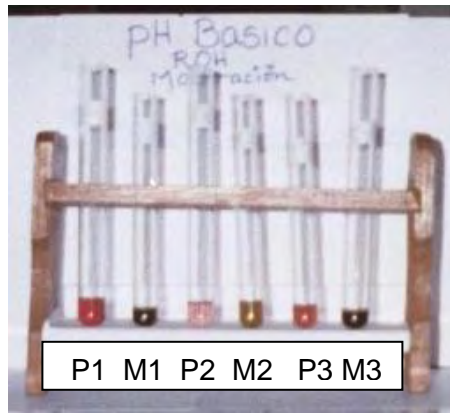


Fig. 83 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico por Maceración.

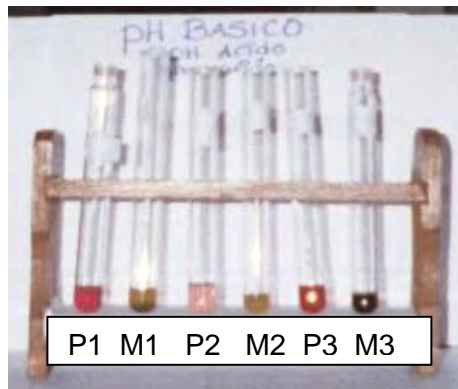


Fig. 84 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Alcohol Etílico Acidificado por Maceración.



Fig. 85 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Mezcla Alcohol Etilico-Agua destilada por Maceración.



Fig. 86 Identificación de Antocianinas con un pH alcalino en extractos de Mora, Fresa y Uva en Agua destilada por Maceración.

ANEXO 17 ⁽⁷⁾.

FOTOGRAFIAS DE LOS PANECILLOS ELABORADOS A NIVEL CASERO.

A: Colorante de fresa con los solventes alcohol etílico y alcohol etílico acidificado (rosado tenue a incoloro).

B: Colorante de mora con los solventes alcohol etílico y alcohol etílico acidificado (rosado).

C: Colorante de uva con los solventes alcohol etílico y alcohol etílico acidificado (café).

D: Panecillo sin colorante (control).

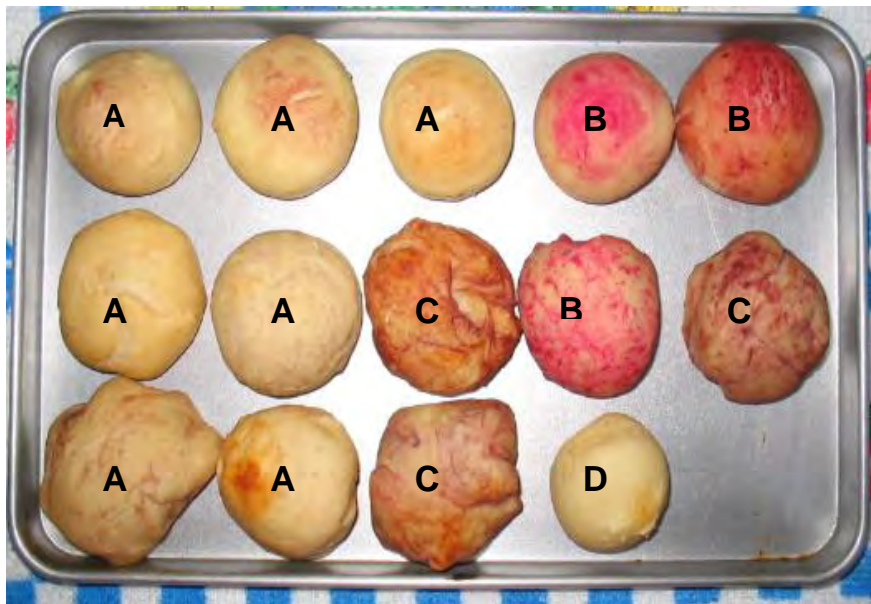


Fig. No. 87