

EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLORANTE DEL EXTRACTO DE *Justicia secunda* Vahl COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE COLORANTES AZOICOS EN LECHE FERMENTADAS

AUTORES:  
GUILLERMO A. PARRADO CASTRO  
KAROL G. PARDO PARDO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR POR  
EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

DIRECTOR: Dr. MIGUEL A. NAVARRO RAMÍREZ  
CODIRECTOR: Dra. JOHANNA I. MURILLO PACHECO

UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES  
PROGRAMA DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL  
VILLAVICENCIO  
2019

Los directores y jurados examinadores de este trabajo de grado no serán responsables de las ideas emitidas por los autores de este.

**Artículo 24 Resolución N° 04 de 1994**

## AGRADECIMIENTOS

Es inevitable no sentirnos aliviados y con una sensación de deber cumplido al ver finalizado el proyecto plasmado en estas hojas, un paso más de los cientos que dimos para alcanzar esta meta que nos propusimos hace algunos años, que con gran esfuerzo y dedicación hoy logramos, y de la cual nos sentimos muy orgullosos. Pero es nuestro deber mencionar y agradecer a las personas que mediante su apoyo lograron que no solo esta tesis se realizaría. Convirtiéndose en piezas clave que aportaron en nuestro crecimiento profesional, intelectual y emocional.

Agradecemos al profesor Miguel Ángel Ramírez y a su personal de laboratorio, especialmente a Dora Malva y Gelman Saldaña, quienes de manera desinteresada y solidaria permitieron el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de las pruebas. A las profesoras Martha Ortiz y Luz Stella Suárez, quienes ayudaron en los procesos de identificación taxonómica y la solicitud de los permisos correspondientes. Al SENA - Centro Agroindustrial del Meta (Sede Hachón) y al Centro de Investigación AGROSAVIA sede la Libertad, por posibilitar la realización de ensayos, que no hubiésemos podido ejecutar sin su apoyo. De manera especial agradecemos sinceramente a los directores de este proyecto, los doctores Miguel Ángel Navarro y Johanna Murillo, que con paciencia y rectitud nos guiaron en todo momento, ayudándonos a ver los obstáculos como oportunidades.

Para finalizar queremos extender nuestro agradecimiento a cada una de las personas que de una u otra manera contribuyeron para que este logro se hiciera realidad, a nuestros compañeros de estudio y a todos los docentes que hicieron parte de nuestra educación, mil gracias.

Personalmente, yo Guillermo Parrado agradezco;

A mis profesores, en especial a Martha Melo y Patricia Rodríguez, quienes con su dedicación lograron emocionarse e inspirarme. A mi familia por darme la libertad y confianza necesaria para caminar con mis propios pies. Al mejor grupo de trabajo y juega que pude tener, Julieth y Diandra. Agradezco además, haber tenido la suerte de siempre estar rodeado de personas que me alentaron con su ejemplo, personas fuertes y capaces, mis amigos; Alejandra, Stefanía, Ada y Alejandro. Por último, aunque puede sonar algo narcisista, quiero darme gracias por haber logrado cosas que ni siquiera hubiese imaginado, por lo que fue, e indudablemente será.

Personalmente, yo Karol Pardo agradezco;

A mis padres, este logro es de ustedes, gracias por motivarme siempre y apoyar todas mis decisiones. A mi familia y amigos, quienes desde la distancia siempre estuvieron conmigo. A la familia Díaz Urrea por hacerme parte de su hogar y hacerme sentir como en casa durante gran parte de mi vida académica. A mis compañeros universitarios, con los que viví inolvidables experiencias, y quienes dejaron en mis grandes enseñanzas. Por último, pero no menos importante a todos y cada uno de mis docentes quienes lograron dejar en mí, numerosos aprendizajes que hoy me convierten en profesional.

## TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN .....	1
1. OBJETIVOS .....	4
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS.....	5
2.2 ADITIVOS COLORANTES .....	7
2.2.1 El uso de colorante azoicos y su posible riesgo para la salud .....	8
2.3 MICROENCAPSULACIÓN DE ADITIVOS ALIMENTARIOS.....	10
2.4 EL SANGRITO O INSULINA ( <i>Justicia secunda</i> Vahl) .....	11
2.5 LAS ANTOCIANINAS COMO COMPUESTOS COLORANTES.....	13
2.6 EL COLOR Y SU CUANTIFICACIÓN .....	14
2.7 YOGUR .....	16
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1 FASE 1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y ADECUACIÓN DE LA MUESTRA.....	18
3.1.1 Área de estudio y recolección del material vegetal .....	18
3.2 FASE 2. OBTENCIÓN DEL COLORANTE EN POLVO .....	20
3.2.1 Obtención del extracto colorante.....	20
3.2.2 Determinación de antocianinas monoméricas por espectrofotometría.....	20
3.2.3 Microencapsulación del extracto .....	21

3.2.4 Pruebas físicas del extracto microencapsulado .....	21
3.2.5 Análisis de antocianinas por HPLC en el extracto microencapsulado .....	22
3.3 FASE 3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLORANTE .....	23
3.3.1 Adición del colorante en yogur .....	23
3.3.2 Estabilidad del color durante el almacenamiento .....	24
3.4 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA .....	24
3.5 ANÁLISIS DE DATOS .....	25
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	27
4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE .....	27
4.2 EXTRACCIÓN DEL COLORANTE .....	27
4.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS .....	31
4.4. CARACTERÍSTICAS DEL MICROENCAPSULADO .....	36
4.5. ESTABILIDAD DEL COLOR EN YOGUR .....	37
4.6 CINÉTICA .....	42
CONCLUSIONES .....	45
RECOMENDACIONES .....	46
REFERENCIAS .....	47
ANEXOS .....	58

## LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica Justicia sp. ....	11
Tabla 2. Composición nutricional del yogur .....	17
Tabla 3. Efecto del disolvente sobre el color del extracto .....	27
Tabla 4. Compuestos determinados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS .....	36
Tabla 5. Propiedades físicas del microencapsulado .....	37
Tabla 6. Parámetros cinéticos de la evolución del color en yogur .....	42
Tabla 7. Estimación de parámetros cúbicos .....	44

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Descripción de algunos aditivos naturales según su categoría .....	7
Figura 2. Clasificación de los colorantes según su procedencia.....	9
Figura 3. <i>Justicia secunda</i> Vahl .....	11
Figura 4. Estructura general de las antocianinas y sus sustituyentes.....	13
Figura 5. Modelo de color CIELAB.....	16
Figura 6. Localización del área de recolección del material vegetal .....	19
Figura 7. Metodología .....	25
Figura 8. Formas estructurales predominantes de antocianinas a diferentes valores de pH .....	28
Figura 9. Variación de color del extracto según pH .....	29
Figura 10. Efecto solvatocrómico del extracto .....	30
Figura 11. Estructura química de las seis principales antocianinas glicosiladas....	31
Figura 12. Estructuras químicas de antocianinas aciladas .....	32
Figura 13. Estructura tridimensional antocianidina .....	33
Figura 14. Espectros UV-Vis del extracto a diferentes valores de pH.....	34
Figura 15. Estructura de antocianinas macrocíclicas.....	35
Figura 16. Degradación de color en muestras de yogur .....	38
Figura 17. Gráficos de dispersión coordenadas colorimétricas .....	39
Figura 18. Cambios en las coordenadas colorimétricas respecto el día cero .....	40

Figura 19. Estabilidad del color durante el almacenamiento.....	40
Figura 20. Estimación curvilínea de los cambios en los parámetros colorimétricos .....	44

## LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Obtención del extracto, pruebas con disolventes .....	58
Anexo B. Fragmentograma de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS....	58

## RESUMEN

La industria alimenticia está orientada a buscar métodos alternativos que permitan la obtención de aditivos menos contaminantes que no generen efectos negativos en la salud humana, en este camino, los colorantes de origen natural han sido objeto de diferentes estudios. Dada la importancia que representa encontrar opciones viables que se ajusten a estas tendencias, el objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad del extracto obtenido de la planta *Justicia secunda* como colorante adicionado en yogur, de acuerdo con la degradación del color en el periodo de almacenamiento. Los extractos acuosos de la planta se estabilizaron mediante microencapsulación por aspersión y se adicionaron a una base de yogur natural, almacenándolos por un tiempo de 26 días, al cual se le midió la variación de la luminosidad ( $L^*$ ), la croma ( $C^*$ ), el ángulo de tono ( $H^\circ$ ), y la diferencia total de color desde el tiempo cero (DTC). La estabilidad del color del extracto se comparó con la del colorante azocio comercial Rojo escarlata (Rojo Ponceau 4R – E124 y Amaranto – E123). La prueba Mann-whitney, indico diferencias significativas entre la DTC de ambos grupos ( $P \leq 0,05$ ), en donde la estabilidad del colorante rico en antocianinas (Tratamiento) fue superior a la del colorante control (Rojo escarlata), pese a esto no fue posible igualar el tono exacto de ambos colorantes, con valores de  $L^*$  inferiores por parte del tratamiento. El bajo valor en la DTC del pigmento extraído ( $DTC < 1,5$ ) y la apreciación visual del color, indican cambios poco perceptibles por parte del consumidor y la posibilidad de emplear eficazmente el colorante obtenido en la tinción de yogur, además de su potencial uso en otros productos alimenticios.

## ABSTRACT

The food industry is focused at finding alternative methods that allow obtaining less polluting additives that do not generate negative effects on human health, in this way, the dyes of natural origin have been the subject of different studies. Given the importance of finding viable options that fit these trends, the objective of this work was to evaluate the stability of the extract obtained from the *Justicia secunda* plant as a colorant added in yoghurt, according to the color degradation in the period of storage. The aqueous extracts of the plant were stabilized by microencapsulation by spray dryer and added to a base of natural yogurt, storing them for a period of 26 days, which was measured the variation of brightness ( $L^*$ ), chroma ( $C^*$ ), the pitch angle ( $H^\circ$ ), and the total color difference from time zero (DTC). The stability of the color of the extract was compared with that of the commercial azo colorant Scarlet Red (Ponceau Red 4R - E124 and Amaranth - E123). The Mann-whitney test

indicated significant differences between the DTC of both groups ( $P \leq 0.05$ ), where the stability of the anthocyanin-rich dye (Treatment) was higher than that of the control dye (Scarlet red), despite this it was not possible to match the exact tone of both dyes, with lower  $L^*$  values for the treatment part. The low value in the DTC of the pigment extracted (DTC  $< 1.5$ ) and the visual appreciation of the color, indicate changes not perceptible by the consumer and the possibility of using effectively the colorant obtained in the yoghurt stain, in addition to its potential use in other food products.

## INTRODUCCIÓN

El creciente cambio en el estilo de vida de la población, preocupada cada vez más por el cuidado de la salud y el desarrollo de una conciencia de protección ambiental, ha encaminado a la industria alimentaria a implementar nuevas alternativas para la obtención de insumos y aditivos menos perjudiciales para la salud y amigables con el medio ambiente (Sloan, 2008). En la producción de alimentos comúnmente se emplean aditivos colorantes, con la intención de resaltar sus atributos físicos y organolépticos a través de la percepción visual que genera el color en los consumidores (Álvarez, 2011), aspecto que incide en la decisión de compra y demás características indirectamente ligadas a la calidad del alimento (MacDougall, 2002; Lakshmi, 2014).

Tradicionalmente, la síntesis química ha sido la forma predominante de producción de aditivos alimentarios (Ibañes, Torre y Irigoyen, 2003). Algunas de estas sustancias de este tipo han sido sospechosas de promover o causar toxicidad crónica en el organismo del consumidor (Kamel y El-lethey, 2011; Roca et al., 2017). Enfermedades como el cáncer de intestino y riñón, afectaciones en el sistema respiratorio y cardiaco, daños en la estructura del ADN y efectos alérgicos, son presuntamente atribuidos al consumo habitual de este tipo de sustancias (Combes y Haveland, 1982; Guerrero y Mora, 2014). Entre ellas se encuentran los colorantes de origen azoico como la tartrazina (E102), el amarillo ocazo (E110), el rojo Allura (AC-E129) y el Ponceau (4R-E124), los cuales son utilizados comúnmente en comestibles como frituras, pastas, salsas, sopas, bebidas y confites (Diacu, 2016).

Sin embargo, en la última década se han promovido nuevas tendencias que propenden por la utilización de materias primas de origen natural, así como el uso de prácticas y tecnologías para su obtención (Carocho, Morales y Isabel, 2015). Prácticas como la fermentación, el empleo de microorganismos, el estudio de métodos de extracción y aislamiento de metabolitos (Duran, 2001), han sido alternativas para generar aditivos capaces de sustituir eficientemente los aditivos convencionales (Hsieh y Ofori, 2007).

La preferencia de la que gozan alimentos procesados con aditivos naturales ha aumentado el interés que poseen los pigmentos de origen vegetal por parte de las industrias alimentarias y de los consumidores (Ibañes, Torre y Irigoyen, 2003). Este comportamiento se atribuye a la percepción que existe entre el beneficio para la salud y la disminución del riesgo de padecer enfermedades cancerígenas, con la

ingesta de productos de origen natural. Algunos estudios, han demostrado que determinados pigmentos, poseen propiedades bioactivas que ejercen un efecto beneficioso en la salud (Gimenez, Angosto y Fernandez, 2013). Las antocianinas, por ejemplo, poseen características que las hacen útiles en el tratamiento de padecimiento tumorales e inflamatorios (Garzón, 2008), otros colorantes como los carotenoides y las clorofilas han demostrado poseer propiedades anticancerígenas (Mínguez, Pérez y Hornero, 2005).

No obstante, la implementación de colorantes de origen natural conlleva una serie de retos relacionados con su poca estabilidad, menor eficiencia y mayor costo frente a sus análogos, los colorantes de síntesis química (Rodríguez, 2016). A su vez, existe una falta de comprensión de las condiciones en las que los colorantes naturales expresen su máximo potencial y logren una mayor estabilidad en los alimentos a los que son adicionados, por lo que su uso se vuelve poco efectivo. Razón por lo que resulta importante estudiar métodos alternativos que permitan el empleo de colorantes de origen natural, que cumplan al mismo tiempo los criterios de calidad ligados a la estabilidad del color durante el procesamiento y en el producto final (Diacu, 2016). Disminuyendo así la utilización de colorantes artificiales y de los efectos adversos en la salud que podrían ocasionar, (Bearth, Cousin y Siegrist, 2014).

Se han llevado a cabo procesos de bioprospección en algunas especies de vegetales y frutos, a través de la caracterización química de sus extractos, los cuales han revelado actividad biológica que evidencia la presencia de pigmentos colorantes como: antocianinas, presentes en rábanos, cebollas rojas y cerezas (Castañeda y Guerrero, 2015); carotenoides, extraídos de fuentes como zanahoria, calabaza y pimentón rojo (Mínguez, Pérez y Hornero, 2005), y clorofilas, encontradas en hojas y vegetales verdes (Martin y Castañeda, 2017), entre muchos otros. El empleo de la prospección de la biodiversidad posibilita el uso de nuevas fuentes de obtención de aditivos, capaces de satisfacer la necesidad existente de desarrollar colorantes menos perjudiciales, que cumplan todos los estándares de calidad que se requieren para ser utilizados en los procesos de transformación industrial (Boucher, 1999).

Aunque es poca la información sobre el potencial de los compuestos colorantes presentes en plantas del género *Justicia*, algunos estudios han demostrado la presencia de metabolitos secundarios de interés, como antocianinas, en especies vegetales de este grupo como *Justicia spicigera* (Espinosa et. al., 2012), *Justicia secunda* (Akibou et... al., 2014), *Justicia matammensis* y *Justicia laxa* (Mpiana et... al., 2014). Por su parte, *Justicia secunda* Vahl es reconocida por su alto contenido de antocianinas y se presenta como una alternativa viable para la

extracción de pigmentos, soportado con estudios que revelan la presencia de compuestos fenólicos con una alta actividad antioxidante (Sepúlveda *et... al.*, 2009), convirtiéndola en una especie útil para el tratamiento de enfermedades hepáticas, coronarias y citotóxicas (Alonso *et... al.*, 2012; Ortiz *et... al.*, 2012). Pese a esto, pocas son las investigaciones que respaldan su posible uso como colorante alimentario, atribuido a la carencia de conocimiento sobre sus características fisicoquímicas y funcionales, su perfil de metabolitos secundarios y aplicabilidad en alimentos específicos, siendo aún más escasa la información del uso de plantas de esta especie procedentes de la Orinoquia colombiana.

El objetivo de esta investigación es evaluar la estabilidad colorante del extracto obtenido de las hojas de *Justicia secunda* Vahl, como posible sustituto de colorantes azoicos en leches fermentadas como el yogur, con el fin de ampliar las fuentes de obtención de pigmentos de origen vegetal y el conocimiento acerca de su efectividad en la coloración de este tipo de alimentos. Con lo anterior, este estudio pretende contribuir a la ampliación del conocimiento sobre las potencialidades del uso de los colorantes de origen natural en la industria láctea.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad colorante del extracto obtenido de las hojas de *Justicia secunda* Vahl como alternativa de sustitución de colorantes azoicos en leches fermentadas.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la efectividad del extracto de *J. secunda* Vahl en procesos de coloración a través de la comparación de la durabilidad del color entre el extracto y un colorante azoico (Rojo Escarlata) adicionados en yogur.
- Establecer la cinética de degradación de color del extracto de *J. secunda* Vahl para tratar de predecir su comportamiento a través del tiempo y su posible utilización en leches fermentadas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS

El sabor, olor, color y textura son características organolépticas ligadas a la calidad de cualquier producto alimentario. Es por ello por lo que la utilización de aditivos por parte de la industria alimentaria es un elemento de vital importancia en el mejoramiento o conservación de estos aspectos. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los aditivos se definen como un ingrediente o combinación de ingredientes añadidos a la mezcla alimentaria o parte de ésta para satisfacer una necesidad específica. De acuerdo con el Codex Alimentarius (Comisión del Codex Alimentarius, 1995), los aditivos alimentarios son:

Cualquier sustancia que, normalmente no se consume como alimento en sí ni se use como ingrediente característico en la alimentación, independientemente de que tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada a los productos alimenticios, con un propósito tecnológico en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características.

Las autoridades sanitarias basan la utilización de aditivos en estudios que analizan el efecto que puede causar su consumo, definiendo una Ingesta Diaria Admisible (IDA) con un amplio margen de seguridad. Siendo las autoridades sanitarias que marcan la pauta en normativas de uso de aditivos alimentarios, la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y la EFSA (European Food Safety Authority) en la Unión Europea.

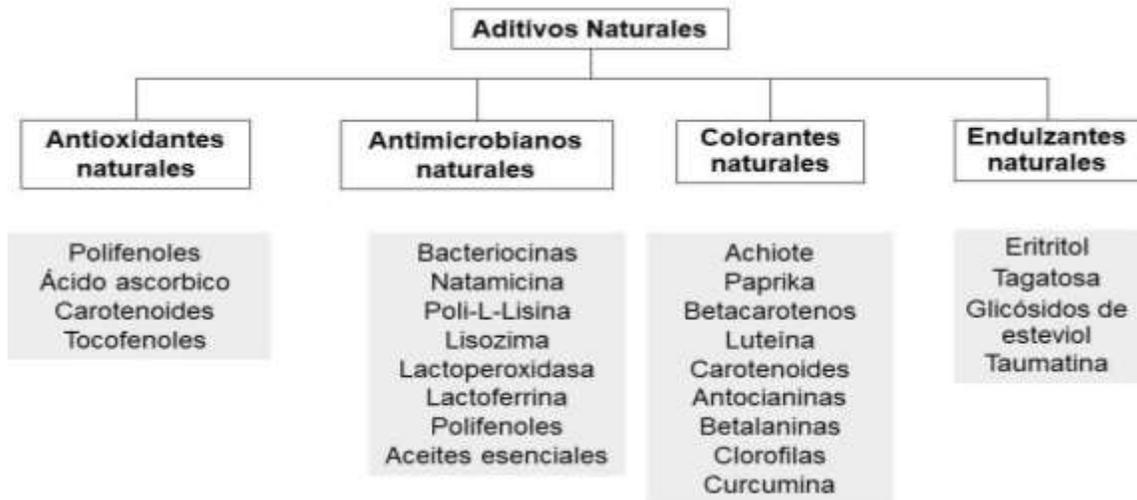
Con el fin de conferir a los productos, cualidades específicas, la adición de una amplia variedad de aditivos es una práctica común en todas las industrias alimentarias. Por lo cual el desarrollo de nuevos aditivos alimentarios de origen natural es ahora un imperativo para este tipo de industrias. Estudios realizados demuestran la predilección existente por parte de los consumidores por los aditivos de origen natural sobre los obtenidos de forma sintética, los cuales relacionan estos últimos con posibles amenazas para su salud (Bearth, Cousin y Siegrist, 2014).

Actualmente, la preocupación por el cuidado de la salud y el medio ambiente ha propiciado una cultura de consumidores informados, que basan su decisión de compra analizando los riesgos y beneficios que atribuye la ingesta de los alimentos y de los ingredientes que los componen (Beareth, Cousin y Siegrist, 2014).

El conocimiento de las regulaciones existentes sobre el empleo de aditivos alimentarios, la confianza que se tenga en las instituciones reguladoras de los mismos y la percepción de posibles problemas o beneficios que acarrea su uso, son variables significativas en las decisiones que toma la industria para la utilización de estas sustancias y de su aceptación por parte del consumidor (Laleh *et. al.*, 2006). A pesar de que el público en general, prefiere optar por los aditivos de origen natural frente a sus análogos sintéticos, y de que estos últimos han demostrado ser una amenaza potencial al bienestar del consumidor, no existe alguna clasificación oficial que los diferencie, lo que ocasiona confusiones en el consumidor sobre la procedencia de estas sustancias (Saleem, Umar y Khan, 2013; Caroch, Morales y Isabel, 2015).

Los aditivos alimentarios de origen natural son sustancias obtenidas de fuentes vegetales, animales o minerales. Los aditivos sintéticos son aquellos que se originan a través de una serie de reacciones químicas asistidas en un laboratorio, a partir de ciertos compuestos precursores. Ambos tipos de aditivos son capaces de conferir atributos de color, sabor, textura o de prolongar la vida útil de los alimentos, y se clasifican según la función que realicen en el alimento al que se incorporen, denominándose así, como aditivos espesantes, conservantes, antioxidantes, emulgentes, colorantes, edulcorantes, etcétera (Rodríguez, 2016). La figura 1 muestra la clasificación de algunos aditivos de origen biológico y sus principales compuestos.

Figura 1. Descripción de algunos aditivos naturales según su categoría



Fuente: Caroch, Morales y Isabel, 2015

## 2.2 ADITIVOS COLORANTES

El color que posee un alimento influye notoriamente en la percepción que este puede generar en el consumidor y está inconscientemente relacionado con su sabor y condición sanitaria (Imram, 1999; Spence *et.. al.*, 2010). Básicamente, un colorante alimenticio es una sustancia capaz de conferir color, con el objetivo de devolver el aspecto original de los alimentos perdido durante los procesos de elaboración, almacenamiento o distribución, hacerlos visualmente más aceptables o simplemente para conferir el color que se desee a determinado alimento (Solymosi *et.. al.*, 2015).

Actualmente diversos colorantes usados por la industria alimentaria en la producción de salsas, bebidas, productos de panadería, derivados lácteos y confites, destacándose para ello, el uso de los colorantes azoicos (de origen sintético) como la tartrazina (E102), Amarillo Anaranjado (E110), Negro brillante BN (E151), Rojo 2G (E128) entre otros. Por otra parte, los colorantes naturales más usados son el achiote (E160b), extraído del árbol *Bixa Orellana L.*; la paprika (E160c), compuesta principalmente por los carotenoides capsantina y capsorubina; los carotenos: luteína, violaxantina, neoxantina, b-criptoxantina, fucoxantina, licopeno y astaxantina; las antocianinas (E163): cianidina, delphinidina, malvidina,

pelargonidina, peonidina y petunidina; las betalainas, betacianinas y betaxantinas; la curcumina (E100i) extraída de los rizomas de la planta *Curcuma longa L.* y las clorofilas (E140) alfa y beta (Carocho, Morales y Isabel, 2015).

El desarrollo de nuevas tecnologías que brinden la posibilidad de sustituir los colorantes artificiales por otros de origen natural, es un reto para las industrias alimentarias debido a la dificultad que presenta la mezcla de los compuestos colorantes con los componentes presentes en los alimentos (Chung *et... al.*, 2016). Lo que puede generar problemas de compatibilidad y afectar la persistencia del color. Es importante mencionar que los costos del uso de colorantes naturales son mayores que el de los sintéticos y que la sobredosificación con este tipo de colorantes es prácticamente ineludible debido a la degradación rápida de su color, generando también posibles cambios en el sabor y olor en el producto final (Galaffu, Bortlik y Michel, 2015).

Lo anterior, enfatiza la necesidad de desarrollar métodos capaces de solucionar estos inconvenientes, con el fin de ampliar de esta manera el uso de sustancias naturales en los procesos de transformación de alimentos y establecer las variables críticas que se deben controlar para su uso efectivo en matrices alimentarias específicas.

### 2.2.1 El uso de colorante azoicos y su posible riesgo para la salud

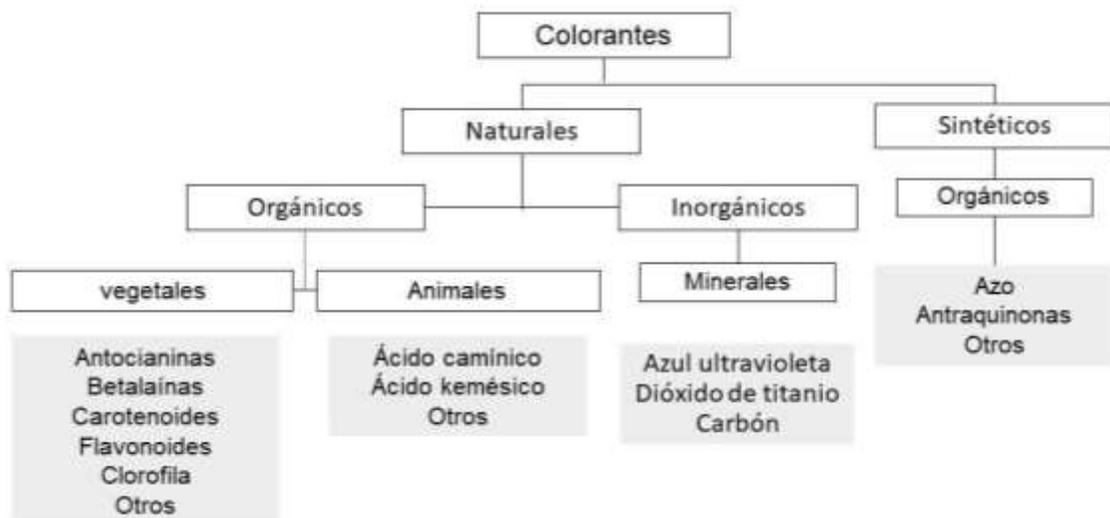
La elevada presencia de alimentos procesados ha aumentado el uso de aditivos utilizados en su producción. Estos deben cumplir condiciones de calidad y estabilidad para que puedan ser usados satisfactoriamente (Rivera y Magro, 2008), razón por la cual se recurre comúnmente al uso de aditivos obtenidos a partir de síntesis. Los colorantes sintéticos ofrecen una mayor estabilidad del color y poseen una mayor eficiencia, pero su uso está limitado y controlado dado los posibles efectos perjudiciales que pueden generar en la salud de los seres humanos.

Las tendencias actuales del mercado respecto a la utilización de sustancias alimentarias que favorezcan la salud del consumidor han desplazado paulatinamente el uso de compuestos no producidos de forma natural, comúnmente asociados con el desarrollo y aparición de distintas enfermedades (Downham y Collins, 2000). Lo anterior, se fundamenta en el progresivo interés del consumidor por adquirir hábitos más saludables que mejoren su calidad de vida, condicionando

la escogencia de sus alimentos según el cumplimiento de determinados aspectos: buena presentación, características sensoriales atractivas y propiedades que beneficien su salud (Rajat *et... al.*, 2012).

Algunos compuestos sintéticos que han sido estudiados por ser potencialmente generadores de efectos cancerígenos son los colorantes azoicos (Tartrazina-E102, E110-amarillo ocajo, rojo Allura AC-E129, Ponceau 4R-E124, etc.), debido a la presencia en su estructura del grupo azo ( $-N=N-$ ), el cual no es producido naturalmente por ningún mamífero (Chung, 1983). Este enlace es la porción más lábil de la molécula del colorante azoico y puede romperse fácilmente debido a la acción metabólica del hombre, lo que induce un estrés oxidativo en el organismo que conduce a la formación de radicales libres que pueden desarrollar daños en el ADN, problemas renales, respiratorios y cardiacos, además de severos cuadros alérgicos (Diacu, 2016). En la figura 2 se muestra la clasificación de los aditivos colorantes según su procedencia.

Figura 2. Clasificación de los colorantes según su procedencia



Fuente: Garibay, Quintero y López, 1993

## 2.3 MICROENCAPSULACIÓN DE ADITIVOS ALIMENTARIOS

La microencapsulación tiene como objetivo aumentar la eficiencia de sustancias seleccionadas, que pueden ser temporal o permanente protegidas por un caparazón designado como encapsulante, lo que las resguarda del entorno exterior y les permite además una liberación controlada de las mismas (Gouin, 2004). Normalmente, en los productos alimentarios, los aditivos de origen natural son inestables desde el punto de vista de procesamiento, el problema básico del uso de sustancias activas naturales, incluidos los colorantes en aplicaciones industriales, es su baja resistencia a los cambios en el pH, el calentamiento y la exposición a la luz, por lo que la microencapsulación, surge como una alternativa eficiente de protección y estabilidad de dichas sustancias dentro de una matriz alimenticia. Esta tecnología permite cubrir con películas poliméricas partículas líquidas, sólidas o gaseosas. (Paulo y Santos, 2017; Janiszewska, 2017).

Algunos de los agentes encapsulantes más usados por la industria alimentaria son el almidón, maltodextrina, goma arábica, agar, lecitina, carboximetilcelulosa, caseína, jarabe de maíz entre otros, los cuales protegen al material encapsulado de factores como el calor y la humedad, aumentando la vida útil del alimento y otorgándole mayor estabilidad en condiciones de procesamiento, almacenamiento y empaquetado, lo que disminuye la pérdida de sabor, aroma, color y valor nutritivo. Productos de la industria de alimentos como los aceites, bacterias probióticas, enzimas, lactosuero, pigmentos vegetales, minerales, vitaminas y aditivos alimenticios son comúnmente sometidos a este tipo de procesos (Parra, 2011). Estudios realizados en colorantes para confitería, demuestran que la película protectora aumenta la estabilidad y reduce los cambios en el color durante el procesamiento (Klinjapo y Krasaekoopt, 2018).

La microencapsulación por el método de secado por aspersión es el método de encapsulación de ingredientes alimenticios más usado, debido a que es más económico y ofrece un mayor rendimiento frente a otras técnicas de pulverización de alimentos, garantizando la estabilidad del producto final. Estudios realizados demostraron que el encapsulado del extracto acuoso de *Justicia spicigera* en los que se usó combinaciones de goma de mezquite y maltodextrina (1:1) por el método de secado por aspersión, evitaron la degradación de los pigmentos y la pérdida de color (Pavón *et. al.*, 2011).

## 2.4 EL SANGRITO O INSULINA (*Justicia secunda* Vahl)

El género *Justicia* es uno de los más grandes entre la familia Acanthaceae, constituida por alrededor de 700 especies, algunas de ellas crecen en América latina, destacándose la *Justicia spicigera*, *Justicia secunda* y *Justicia pectoral* (Gómez, Reyes y Aguilar, 2012). En la región de la Orinoquía colombiana la *J. secunda* Vahl es conocida vernáculamente como sangrito o sangre de cristo, y se caracteriza por ser una planta arbustiva que alcanza hasta 5 metros de alto, con hojas ovadas, que van de 6,5 a 17,0 cm de largo y 3,5 a 9,0 cm de ancho y flores de color rojo claro o naranja (figura 3). En la tabla 1 se muestra la clasificación taxonómica de la *Justicia sp.*

Tabla 1. Clasificación taxonómica *Justicia sp.*

Clasificación	
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Scrophulariales</i>
Familia	<i>Acantáceas</i>
Género	<i>Justicia</i>

Fuente: World Plants, 2018

Figura 3. *Justicia secunda* Vahl



En los Llanos Orientales colombianos la planta *J. secunda* se usa generalmente como remedio para el tratamiento de enfermedades sanguíneas y como planta ornamental. Existe diversidad de estudios realizados que manifiestan la efectividad de sus compuestos en el tratamiento de enfermedades estomacales, hepáticas, antitumorales y bacterianas. Vega y colaboradores (2012) demostraron el efecto inhibitorio del extracto etanólico y metanólico de la *J. secunda* Vahl sobre el crecimiento de microorganismos patógenos causales de disentería. Investigaciones realizadas en ratas por Awad y colaboradores (2015) estudiaron el efecto hepatoprotector e hipoglucemiante que posee esta planta. Asimismo, se ha demostrado la capacidad que tiene su extracto de disminuir el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer debido a su efecto antiproliferativo, proapoptótico y antiangiogénico. Euler y Alam (1982) realizaron procesos de aislamiento de kaempferitrina de las hojas de esta planta, compuesto útil para el tratamiento de la hipertensión.

Además, el sangrito o sangre de cristo se contempla como una posible alternativa para la obtención de sustancias colorantes. Según Ortega (2015) a través de un estudio realizado a pobladores de la región de los Llanos Orientales colombianos, se encontró que una especie vegetal de las que podrían extraerse tanto metabolitos secundarios de interés farmacéutico como colorantes es la *J. secunda* Vahl. Casanova y colaboradores (2012), demostraron que esta planta fue utilizada en México desde el período prehispánico para la coloración de fibras, la escritura de manuscritos y como pintura mural. Estudios realizados a esta planta demuestran su gran contenido de flavonoides con propiedades antioxidantes para uso en la industria alimentaria y cosmética, por medio de la aplicación de tecnologías que mantengan el color y sus propiedades bioactivas (Sepúlveda *et. al.*, 2009; Espinosa *et. al.*, 2012). De igual forma, Pavón y colaboradores (2011) realizaron estudios de encapsulación para la preservación de los flavonoides presentes en la planta *J. secunda* Vahl con el fin de evitar la degradación de los pigmentos y la pérdida de color del extracto.

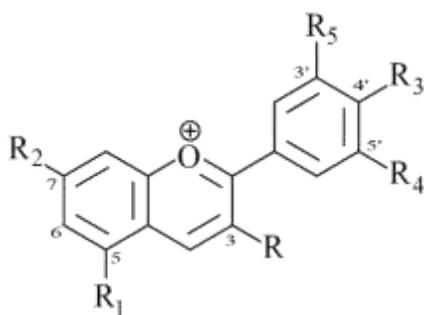
Esta planta al igual que otras del mismo género (*Justicia spp.*) no se mencionan en el Vademécum de Plantas Medicinales Colombiano, elaborado entre el Ministerio de la Protección Social y la Universidad Nacional de Colombia, el cual establece el listado de plantas medicinales aceptadas con fines terapéuticos en el país. Sin embargo, algunos estudios señalan que su ingesta no ocasiona efectos nocivos para la salud o reacciones adversas, considerándose plantas de baja toxicidad con posibles usos en el sector alimentario y farmacológico (Cantillo *et. al.*, 2007; León *et. al.*, 2015).

## 2.5 LAS ANTOCIANINAS COMO COMPUESTOS COLORANTES

Las antocianinas son flavonoides altamente solubles en agua, las cuales confieren a los distintos órganos de la planta colores como el naranja, violeta, magenta y azul. En plantas superiores, comúnmente se encuentran pelargonidina, cianidina, peonidina, delfinidina, petunidina, y malvidina, que son 6 de los 23 tipos de antocianinas conocidas (Garzón, 2008).

La estructura básica de las antocianidinas está formada por 15 carbonos y consiste en un anillo cromano unido a un segundo anillo aromático (anillo B) en la posición dos. La estructura se complementa con una o más moléculas de azúcar unidas a diferentes posiciones hidroxiladas formando las antocianinas. Factores como el pH, el calor, la luz, la presencia de metales y la copigmentación, pueden afectar la estabilidad, color y tonalidad de las antocianinas. En condiciones ligeramente ácidas (pH 3-6), el color rojo y la forma de catión flavilio predomina, mientras que a pH 6 o superior, más azul y más inestable es la molécula, al aumentar el número de grupos hidroxilo en el anillo B (Kirca, Özkan y Cemeroğlu, 2006; García *et. al.*, 2012). Reacciones de acilación pueden provocar cambios en el color y variar la estabilidad y la solubilidad de estos compuestos (Giuliani, Cerretani y Cichelli, 2015). En la figura 4 se muestra la estructura de las antocianinas y sus sustituyentes.

Figura 4. Estructura general de las antocianinas y sus sustituyentes



Antocianinas	R	R1	R2	R3	R4	R5
Apigenidina	H	OH	OH	OH	H	H
Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	H
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	H
Peonidina	OH	OH	OH	OH	OMe	H
Rosinidina	OH	OH	OMe	OH	OMe	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Malvidina	OH	OH	OH	OH	OMe	OMe
Hirsutidina	OH	OH	OMe	OH	OMe	OMe

Fuente: Marcano y Mashisa, 2002

Las antocianinas en los tejidos verdes y vegetativos difieren de las antocianinas presentes en las flores y los frutos, debido a que su función es la de reducir la fotoinhibición y la fotodecoloración de la clorofila en condiciones de estrés por luz, minimizando el riesgo de sufrir daño fotooxidativo y la perturbación del metabolismo celular, modulando la absorción de luz de acuerdo con el medio ambiente y los requisitos de la planta para su desarrollo (Steyn *et. al.*, 2002). Asimismo, se ha demostrado que las condiciones edafoclimáticas del lugar donde se encuentre una planta, inciden en su fenología y expresión genotípica, lo que varía la concentración y el perfil de metabolitos secundarios presentes en una especie (Croteau, Kutchan y Lewis, 2000).

## 2.6 EL COLOR Y SU CUANTIFICACIÓN

La colorimetría es la parte de la ciencia que tiene por objeto la evaluación de la energía radiante en cuanto a su capacidad de producir sensación de color. La luz está compuesta por radiación electromagnética, la cual forma un espectro constituido por todos los posibles niveles de energía de la luz (ondas radiofónicas, luz visible y rayos-X), cada uno con una longitud de onda específica. La percepción del color depende de la composición de la luz que absorbe el ojo a través de la retina, que contiene dos tipos de células fotosensibles: los bastoncillos, que permiten diferenciar la claridad y la oscuridad y los conos, que permiten distinguir el color (Contreras, 2007). Es importante mencionar que la porción del espectro capaz de ser apreciada por el ojo humano es relativamente pequeña y es conocida como espectro visible, el cual comprende longitudes de onda que van desde los 400 nm hasta los 700 nm. Dicha longitud de onda puede ser absorbida o reflejada por un cuerpo cualquiera según su composición molecular, confiriéndole de este modo su color característico (Contreras, 2007).

Dicho de otra manera, el color que posea un objeto iluminado por la luz blanca depende de la longitud de onda que no es absorbida por dicho objeto, si éste refleja toda la luz que incide sobre su superficie, su color será blanco, de lo contrario, si su superficie absorbe toda la luz irradiada, su color será negro. Si el objeto es irradiado con luz que no posea la longitud de onda que éste es capaz de reflejar, su superficie se verá de color negro. Este principio permite emplear técnicas de medición de color e identificación inicial de compuestos tintóreos, por medio de la espectroscopía, así como del uso de la cromatografía comparativa con estándares (Villaño, García y Mena, 2016).

La espectrofotometría se realiza mediante la incidencia de un rayo de luz polarizado que se propaga a través de un medio homogéneo el cual incide sobre la superficie de un segundo medio homogéneo de densidad diferente, parte de la luz es reflejada y parte se desvía o se refracta en el segundo medio (Harris, 2007). La cantidad de luz que se desvía es proporcional a la velocidad de la luz en los dos medios, esto se conoce como el índice de refracción y es propio para cada color, relacionado íntimamente con su intensidad y saturación (MacDougall, 2002).

El uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés), es otra técnica ampliamente usada para la identificación y cuantificación de pigmentos. Este proceso consiste en separar la fase móvil a través de una fase inmóvil, que debe ser inmiscible en ella, a la que se conoce como fase estacionaria, la cual está formada por partículas de pequeño diámetro. Las interacciones químicas entre la fase móvil y el pigmento de interés, y entre el pigmento y la fase estacionaria, determinan el grado de migración de los compuestos contenidos en la muestra, lo que da como resultado de la diferencia en la movilidad de los componentes de una muestra, la separación de los mismos (Hernández, 2007). También es posible determinar el color a través del uso de cartas de colores, que funcionan al comparar el color de la carta con el de la muestra para determinar la similitud o diferencia que existe entre las mismas, lo que lo hace un método impreciso, pues la determinación está condicionada a la apreciación que tenga el observador que realice la comparación y al sistema de tintas con el que sea impresa la carta (Martínez, 2011).

Una forma de evaluar el color en términos no subjetivos es el uso de sistemas de medición, cuyo principio se basa en la cantidad de luz reflejada por un objeto para poder cuantificarlo y expresarlo en términos numéricos (Goñi y Salvadori, 2015). Uno de los modelos más usados actualmente para la descripción y comparación del color, que más se asemeja a la forma como el ojo humano percibe el color, es el modelo propuesto por la Comisión Internacional para el Estudio de la Iluminación (CIE) denominado CIElab (Figura 5) (Duangmal, Saicheua y Sueeprasan, 2008).

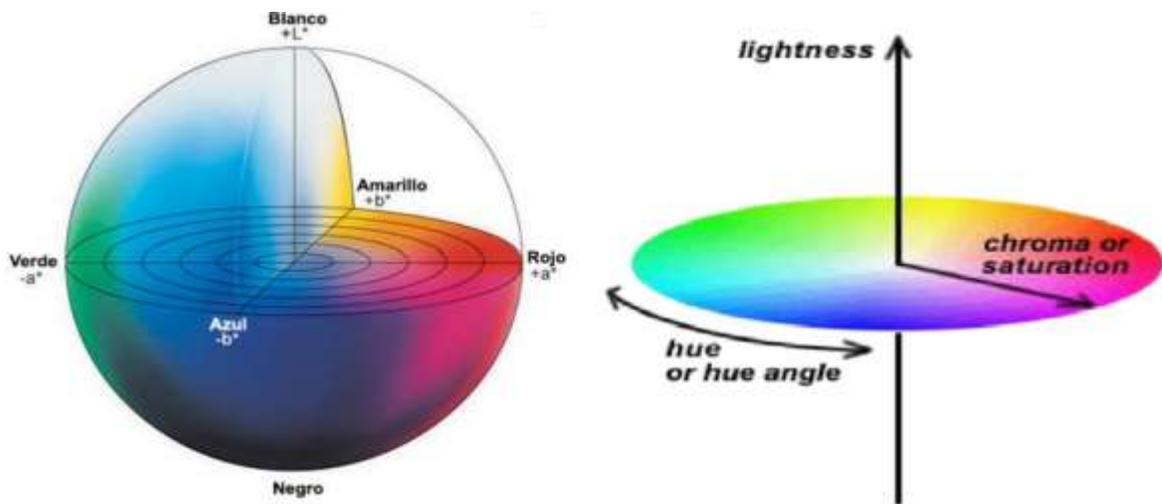
Este modelo establece un sistema cartesiano definido por tres coordenadas colorimétricas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ): la coordenada  $L^*$  indica la luminosidad, es decir, que tan clara u oscura es la superficie del objeto, lo que señala la cantidad de luz reflejada frente a la absorbida; la coordenada  $a^*$  muestra el componente rojo-verde, donde el rojo representa los valores positivos y el verde los valores negativos y la coordenada  $b^*$  define el componente amarillo-azul, donde el azul representa los valores negativos y el amarillo los valores positivos. Existen además dos matices cromáticos fundamentales para definir el color: el tono (H) que indica las variaciones que un solo color puede tener al combinarlo con otros (Ecuación 1) y el croma (C) o

saturación, indica el grado de separación entre un tono determinado y un gris de la misma claridad (Ecuación 2) (MacEvoy, 2015).

$$H = \arctg\left(\frac{b}{a}\right) \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$C = \sqrt{a^2 + b^2} \quad \text{Ecuación 2.}$$

Figura 5. Modelo de color CIELAB



Tomado de: MacEvoy, 2015

## 2.7 YOGUR

El yogur se encuentra dentro del amplio grupo de las leches fermentadas, obtenido por acción de bacterias lácticas que transforman parcialmente la lactosa presente en la leche en ácido láctico, lo que causa la coagulación de sus proteínas (Parra, 2010). De acuerdo con la Norma Técnica Colombiana 805, el yogur se cataloga como un "producto obtenido a partir de la leche higienizada o de una mezcla de ésta con derivados lácteos, fermentados por la acción de *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* y *Streptococcus alivarius* subesp. *thermophilus*, los cuales

deben ser viables, abundantes y activos en el producto hasta el final de su vida útil” (Instituto Colombiano De Normas Técnicas y Certificaciones, 2006).

El Meta se destacó como uno de los departamentos del país en donde más crecieron los rendimientos de producción de leche (Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2018). Para el año 2016 en el país se produjeron 167 toneladas de yogur, cifra que según el DANE está en aumento (Departamento Administrativo Nacional de Estadística, 2016). Lo que demuestra la importancia de este producto en la economía regional.

El yogur es percibido como un producto saludable, desde el punto de vista nutricional aporta nutrientes como proteínas, calcio, fósforo, vitaminas y minerales, además es considerado un alimento probiótico y funcional, pues contribuye al equilibrio de la flora intestinal, actúa como barrera contra microorganismos patógenos y estimula la absorción de minerales (Balcázar, 2011). Es importante mencionar que la composición nutricional de los yogures varía en relación con sus ingredientes. La tabla 2 describe la composición media del yogur natural.

Tabla 2. Composición nutricional del yogur

Composición nutricional del yogur	
Proteína	3,4g
Grasa	3,2g
Carbohidratos	4,0g
Calcio	145 mg
Fósforo	114 mg
Potasio	186 mg
Vitaminas A B y D	0,1 mg

*Los valores están dados en 100 g de yogur natural*

Fuente: Hernandez, 2010

Los ingredientes implícitos en la elaboración de yogur natural son leche y un cultivo láctico, utilizado para la fermentación. Sin embargo, usualmente se añaden otros ingredientes como suero, frutas, colorantes, edulcorantes, espesantes, estabilizantes, reguladores de acidez, entre otros; destinados a mejorar las características organolépticas del producto y/o aumentar su estabilidad y tiempo de vida útil (FAO, 2011). Los colorantes más utilizados para la elaboración de yogur son los sintéticos, entre los que se encuentran el amarillo ocaso (E110), el rojo Ponceau (4R-E124), el rojo Allura (AC-E129), el Amarillo anaranjado (E 110), entre otros (FAO, 2015).

### 3. METODOLOGÍA

La metodología del proyecto se dividió en tres fases, la primera fase comprendió las actividades de recolección, identificación del material vegetal y acondicionamiento de las hojas colectadas; la segunda fase abarcó la extracción del pigmento y obtención del polvo colorante microencapsulado. Por último, la tercera fase, correspondió a las pruebas de aplicabilidad del colorante y la evaluación de la estabilidad del color.

#### 3.1 FASE 1. RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL Y ADECUACIÓN DE LA MUESTRA

##### 3.1.1 Área de estudio y recolección del material vegetal

La recolección de las muestras de las hojas de la planta (*Justicia secunda* Vahl.) se realizó en la finca Los Búhos, vereda Barcelona, ubicada en el municipio de Villavicencio - Meta (latitud: 4,066772, longitud: -73,593098 y altitud de 391 m.s.n.m.) (figura 6). Lugar con un clima tropical marcado con lluvias la mayor parte del año, una precipitación aproximada de 3856 mm/año y una temperatura promedio de 25,5°C. Las plantas se encontraban como vegetación asociada a las cercas vivas de la entrada principal de la finca, con una altura aproximada de tres (3) metros.

Figura 6. Localización del área de recolección del material vegetal



Fuente: Google Earth, 2019

De esta forma, se colectaron, aleatoriamente muestras de especímenes silvestres de *J. Secunda* Vahl, con una altura igual o superior a un metro y con presencia de estructuras florales desarrolladas. Se tomaron hojas de los distintos pisos foliares de cada planta (parte apical, media y baja de la planta).

La recolección y envío del material vegetal para su posterior identificación taxonómica, se realizó bajo los protocolos de Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) (número de permiso de recolección 2018055654-1-000) y se realizó con el apoyo de la Profesora Luz Stella Suárez Suárez, del herbario de la Universidad de los Llanos.

Durante el procesamiento del material vegetal colectado se descartaron inmediatamente las hojas que presentaron partes decoloradas, enfermas y manchadas. Posteriormente, se sumergieron las hojas seleccionadas por cinco minutos en una solución de 100 ppm de hipoclorito de sodio, luego se removió el cloro residual lavándolas con agua. Las hojas desinfectadas, se secaron en un horno de convección forzada marca Lab Companion modelo OF3-45H, por 72 horas a 30 °C.

## 3.2 FASE 2. OBTENCIÓN DEL COLORANTE EN POLVO

### 3.2.1 Obtención del extracto colorante

Se realizaron una serie de ensayos preliminares para definir las condiciones de extracción del pigmento de las hojas de *J. secunda* Vahl. Estas metodologías se basaron en ensayos de obtención de antocianinas para uso alimenticio, como las propuestas por Jing y Giusti (2007) en maíz morado, Montes y colaboradores (2005) en frutos de Jaboticaba y Pavón y colaboradores (2011) en plantas de *Justicia spicigera*. Se tuvieron en cuenta variables como la proporción de materia prima, tipo y concentración de disolvente, tiempo y temperatura de calentamiento y se evaluó de forma subjetiva y espectrofotométrica el color resultante del extracto después de la filtración (Anexo A).

Las hojas secas se pulverizaron con un molino eléctrico (IKA® A11 basic), pasándolas luego por un tamiz No. 20 (tamaño abertura 0.841 mm). El proceso de extracción y microencapsulación se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Pavón y colaboradores (2011). Este método consistió en emplear vasos precipitados con 200 mL de agua destilada cada uno, para depositar el material vegetal molido en proporción 1:15 (g materia vegetal/ mL agua), por una hora a 40 °C, en un baño maría Lab Companion modelo BW-20H. Seguidamente, se filtró el extracto a temperatura ambiente, pasándolo por papel de filtro cualitativo grado 3 hw (BOECO Germany). El sólido recuperado se lavó con agua destilada hasta obtener una solución clara. El extracto obtenido se almaceno en frascos de color ámbar a 4 °C hasta su microenHcapsulación.

### 3.2.2 Determinación de antocianinas monoméricas por espectrofotometría

Con el fin de determinar el contenido de antocianinas monoméricas, se utilizó el método de pH diferencial de acuerdo con lo establecido por Giusti y Wrolstad (2001). Las mediciones se realizaron en un Espectrofotómetro UV-3300 marca Mapada. El contenido de pigmento fue calculado usando como referencia cianidina 3-glucósido, con un coeficiente de extinción molar de 26.900 L cm<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> y un peso molecular de 449,2 g mol<sup>-1</sup>.

Se tomó una alícuota del extracto y se mezcló con una solución de ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0.025 M) y otra solución de acetato de sodio/ácido acético de pH 4,5 (0.4 M). Para luego medir separadamente la absorbancia de la muestra a determinada longitud de onda (absorbancia en el máximo visible  $\lambda_{vis-max}$  y 700 nm) en ambas soluciones.

### 3.2.3 Microencapsulación del extracto

La microencapsulación del extracto de *J. secunda* Vahl se llevó a cabo en el laboratorio de procesos de la Corporación Universitaria La Sallista, en donde se siguió la metodología citada por Pavón y colaboradores (2011). Se mezclaron los agentes encapsulante maltodextrina y goma arábica en una proporción 1:1 en peso con el extracto concentrado del pigmento, agitando continuamente hasta obtener una concentración del 30°Brix en la mezcla, medidos con un refractómetro. Se pulverizó la emulsión con ayuda de un secador por aspersion Mini Spray Dryer B 290, utilizando las siguientes condiciones de operación: velocidad de alimentación de 40 mL/min, temperatura de entrada de  $135 \pm 5$  °C, temperatura de salida de  $80 \pm 5$  °C e inyección de aire comprimido a 4 bares.

### 3.2.4 Pruebas físicas del extracto microencapsulado

#### 3.2.4.1 Humedad

La humedad se determinó de acuerdo con el método AOAC 934,06. Un (1) gramo de pigmento encapsulado se colocó en una cápsula de porcelana a 100°C en un horno de convección forzada, hasta que alcanzó un peso constante (12 horas aproximadamente). El resultado se determinó por diferencia de peso.

#### 3.2.4.2 Determinación de la actividad de agua

La determinación de la actividad de agua (Aw) se realizó mediante la utilización de un lector portátil de actividad de agua (Pre Aqualab Water Activity Analyzer) a 20° C. El equipo se ajustó en un modo de equilibrio "AwE mode" una velocidad de

cambio de actividad de agua de 0,001 Aw/min y de 0,01 °C/min. Una vez la razón de cambio de estos parámetros fue inferior a los valores indicados, se leyó la actividad de agua y la temperatura de equilibrio.

#### 3.2.4.3 Densidad Aparente

Se pesaron dos (2) gramos de muestra microencapsulada, los cuales fueron colocadas en una probeta graduada de 10 mL. La densidad aparente se calculó al dividir la masa de polvo por el volumen ocupado en el cilindro, basándose en la metodología propuesta por Cai y Corke (2000).

#### 3.2.4.4 Análisis instrumental de color de los microencapsulados

La evaluación de color del microencapsulado se realizó mediante el uso de un medidor de color marca HunterLab MiniScan EZ, en las instalaciones del Centro de Investigación AGROSAVIA sede la Libertad. Las coordenadas colorimétricas se calcularon usando la escala CIELAB ajustándolo el equipo a un ángulo del observador de 10° y un iluminante D65 (luz diurna).

#### 3.2.5 Análisis de antocianinas por HPLC en el extracto microencapsulado

La determinación cuantitativa del contenido de antocianinas en el extracto microencapsulado se realizó en el laboratorio de cromatografía y espectrometría de masas de la Universidad Industrial de Santander (CROM.MASS). La preparación de la muestra analizada, se realizó por dilución e inyección al equipo cromatográfico. Como materiales de referencia se utilizaron las antocianinas: Cianidina 3- rutinósido (Part N° G36428, Sigma-Aldrich), pelargonidina 3-glucósido (Part N° 53489, SigmaAldrich), quercetina 3-glucósido (Part N° 89230, Phytolab), kaempferol 3-glucósido (Part N° 89237, Phytolab). Los extractos se analizaron en un cromatógrafo líquido de ultra alta eficiencia (UHPLC), Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con una bomba binaria de gradiente (HP G3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfase del LC-MS fue la electronebulización (ESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Orbitrap. La separación cromatográfica

se realizó en una columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2,1 mm, 1,9  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) a 30° C. La fase móvil fue una solución acuosa de 0,2% de formiato de amonio (A) y acetonitrilo con 0,2% de formiato de amonio (B).

La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100% B (8 min); se mantuvo durante cuatro minutos; el retorno a las condiciones iniciales se hizo en un minuto; el tiempo total de corrida fue de 13 min, con 3 min para pos-corrida. El espectrómetro de masas Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), conectado por la interfaz de electronebulización (HESI), con un voltaje de capilar de 4,5 kV, en modo positivo, para la determinación de los antioxidantes y alcaloides. Se usó nitrógeno como gas secante. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas  $m/z$  60-900. El analizador Orbitrap fue calibrado con las soluciones de referencia certificadas: Ultramark™ 1621 Mass Spec. (AB172435, ABCR GmbH & Co. KG); dodecilsulfato de sodio (L4509, Sigma-Aldrich); taurocolato de sodio hidratado (T4009, Sigma-Aldrich). La identificación de los compuestos se confirmó usando el modo de cromatograma de iones extraídos (EIC), medición de masas exactas ( $\Delta\text{ppm} < 0,001$ ) y aplicando una solución estándar de los antioxidantes y alcaloides.

### 3.3 FASE 3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLORANTE

#### 3.3.1 Adición del colorante en yogur

La capacidad colorante del extracto pulverizado se probó en yogur natural, el cual fue suministrado por el SENA - Centro Agroindustrial del Meta (Sede Hachón), y cumplió con las características de comercialización exigidas por la Norma Técnica Colombiana (NTC) 805 (ICONTEC, 2006), además no poseía ningún tipo de fruta, agente colorante o conservante en su formulación.

Se mezclaron separadamente dos lotes de yogur. El primer lote denominado "Tratamiento" se mezcló con el extracto colorante (1 g en 100 mL de yogur) y el segundo lote designado como "Control", con el colorante Rojo escarlata (Mezcla Rojo Ponceau 4R – E124 y Amaranto – E123) de la marca Frutaroma®, en cantidades suficientes para igualar el color del primer lote. De esta manera se formaron dos grupos de 30 unidades de cada lote, cada uno con 50 mL de yogur empacados en envases PEAD (Polietileno de Alta Densidad).

### 3.3.2 Estabilidad del color durante el almacenamiento

Se almacenaron las muestras obtenidas anteriormente a una temperatura de 4 °C en una isla de refrigeración, con iluminación natural, por 26 días, de acuerdo al tiempo de vida útil según empaque. Para cada uno de los lotes estudiados (Tratamiento y Control), se tomaron tres (3) unidades de yogur en cada lectura, las cuales se realizaron en intervalos de tres a cinco días, descartándolas después de hacer las mediciones para evitar la contaminación de las muestras. Se tomó una alícuota de cada envase, ubicándola sobre una caja de Petri de 6,0 cm de diámetro, llenándola a una altura de 0,4 cm para medir las coordenadas colorimétricas con un colorímetro HunterLab MiniScan EZ, usando la escala CIELAB con un ángulo del observador de 10° y un iluminante D65. Estos valores se emplearon para hallar la Diferencia Total de Color (DTC) calculada con la ecuación 3. Con esta información se realizó la cinética de degradación de color, empleando modelos de orden cero (ecuación 4) y de primer orden (ecuación 5).

$$DTC = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2} \quad \text{Ecuación 3.}$$

$$\text{Orden cero: } C = C_0 \pm k_0 t \quad \text{Ecuación 4.}$$

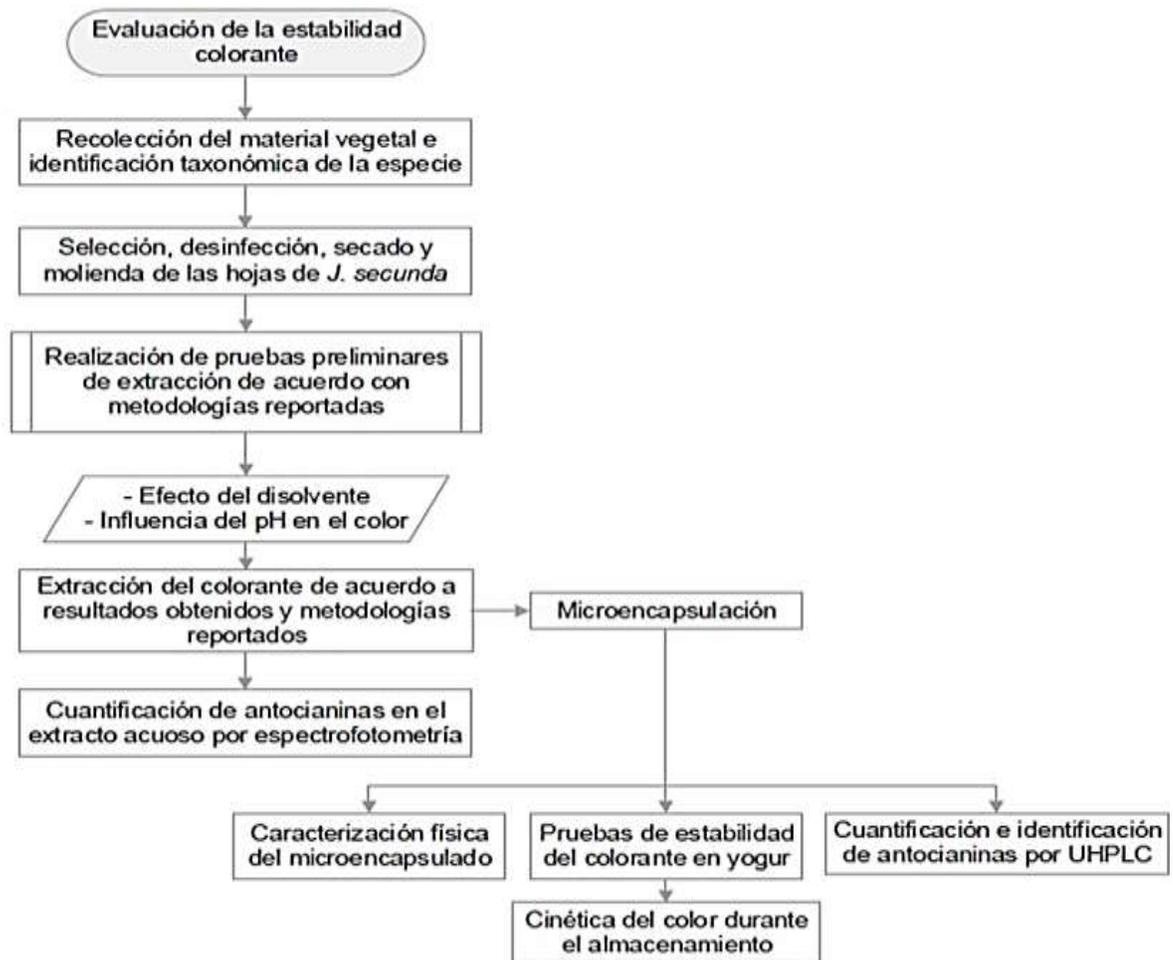
$$\text{Orden uno: } C = C_0 \exp(\pm k_1 t) \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde  $C$  es el valor del parámetro medido o la combinación de las coordenadas colorimétricas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) en un tiempo  $t$ ,  $C_0$  es el valor inicial de  $C$  en el día cero (0),  $k_0$  es la constante de velocidad de orden cero,  $k_1$  es la constante de velocidad de orden uno y  $t$  representa el tiempo de almacenamiento en días.

### 3.4 RESUMEN DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA

En la figura 7 se resume a través de un flujograma, la metodología utilizada para el desarrollo del presente estudio.

Figura 7. Metodología



### 3.5 ANÁLISIS DE DATOS

La variable de respuesta establecida fue el cambio de las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de los productos evaluados, determinando cambios en la Croma ( $C^*$ ), Angulo de tono ( $H^0$ ) y la diferencia total de color desde el tiempo cero (DTC), durante el periodo de almacenamiento. Tanto para las muestras coloreadas con el extracto obtenido, como para las muestras de colorante azoico (Rojo Escarlata). Dichos valores fueron representados con la ayuda del software Photoshop CS6.

Se calcularon pruebas paramétricas con análisis de varianza, regresiones lineales y modelos lineales generalizados, para las variables descritas anteriormente que cumplían los supuestos de distribución normal. Para aquellas variables que luego de su exploración no cumplían con este supuesto y después de probar con un ajuste no lograron ser explicadas, se procedió a la aplicación de análisis no paramétricos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, presentado los resultados como promedio  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$ . Los análisis estadísticos se realizaron por medio del software InfoStat versión 2018l y las gráficas fueron elaboradas mediante Microsoft Excel 2013.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA ESPECIE

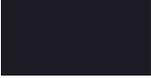
La muestra botánica colectada, se identificó en el HERBARIO LLANOS de la Universidad de los Llanos, bajo el número de depósito LLANOS:017:SN como planta de la especie *Justicia secunda* Vahl – *Acanthaceae*.

### 4.2 EXTRACCIÓN DEL COLORANTE

Teniendo en cuenta que el colorante se propone para uso en productos para la alimentación humana, se descartó el uso de metanol y ácido clorhídrico (HCl) debido a su alto grado de corrosividad y la posibilidad que podría tener este ácido de causar una hidrólisis parcial en antocianinas aciladas, especialmente en aquellas que presentan ácidos dicarboxílicos (Fong, Kepner y Webb, 1971).

Al evaluar el efecto de la concentración de etanol y la adición de ácido cítrico como posible disolvente, tal como lo indican metodologías realizadas en plantas de la misma familia (García *et... al.*, 2012; Vega *et... al.*, 2012; Mpiana *et... al.*, 2014) y de otras fuentes vegetales (Montes *et... al.*, 2005; Jing y Giusti, 2007), el extracto presentó cambios en el tono y la saturación del color en cada uno de los ensayos realizados, relacionado con el porcentaje de alcohol empleado (tabla 3). Los distintos disolventes indicaron un pH similar ( $7,38 \pm 0,56$ ), que solo refleja la acidez del agua, dado que en general, no se trata de soluciones acuosas.

Tabla 3. Efecto del disolvente sobre el color del extracto

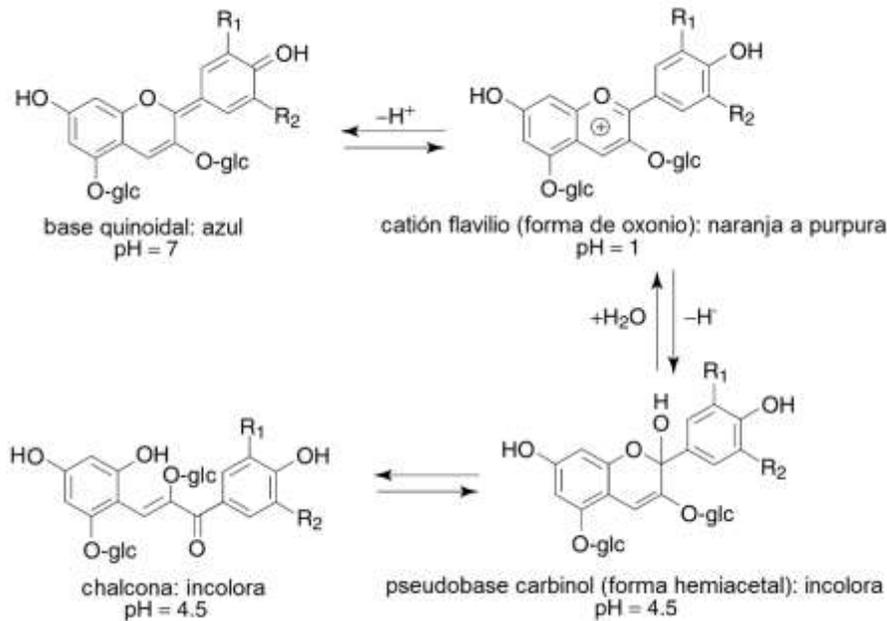
	96%	Etanol 80%	50%	Agua destilada
Sin acidificar				
Acidificado				

Los disolventes se acidularon al 1% v/v con una solución de ácido cítrico (1 M)

Yang y colaboradores (2008) evaluaron las condiciones de extracción para lograr la mayor concentración de antocianinas en maíz morado, tomando como parámetros el tipo de disolvente, la relación disolvente/agua y el tipo y concentración de ácido orgánico, reportando como resultado que los valores de Croma ( $C^*$ ) y Angulo de tono ( $H^0$ ), pese a estar relacionados con el rendimiento de extracción de antocianinas, presentaron diferencias meramente cuantitativas, sin mostrar diferencias visuales perceptibles, caso contrario al del presente estudio, como lo indica la tabla 3.

El pH mostro tener gran importancia en el color del extracto, lo cual es consistente al tratarse de compuestos antociánicos, a causa de cambios en su estructura ocasionados por la pérdida de la forma catiónica, tal como se representa en la figura 8 (Wrolstad, Durst y Lee, 2005).

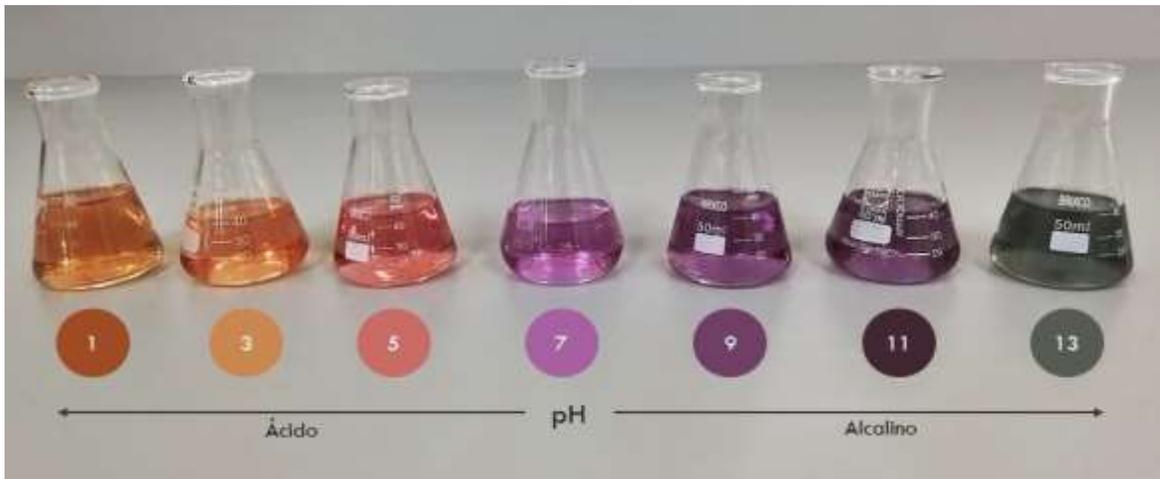
Figura 8. Formas estructurales predominantes de antocianinas a diferentes valores de pH



Fuente: Giusti y Wrolstad, 2001

El efecto del pH en el color de los extractos se evidenció al colocar una alícuota del extracto acuoso a diferentes pH y observar la coloración resultante, lo cual se muestra en la figura 9.

Figura 9. Variación de color del extracto según pH



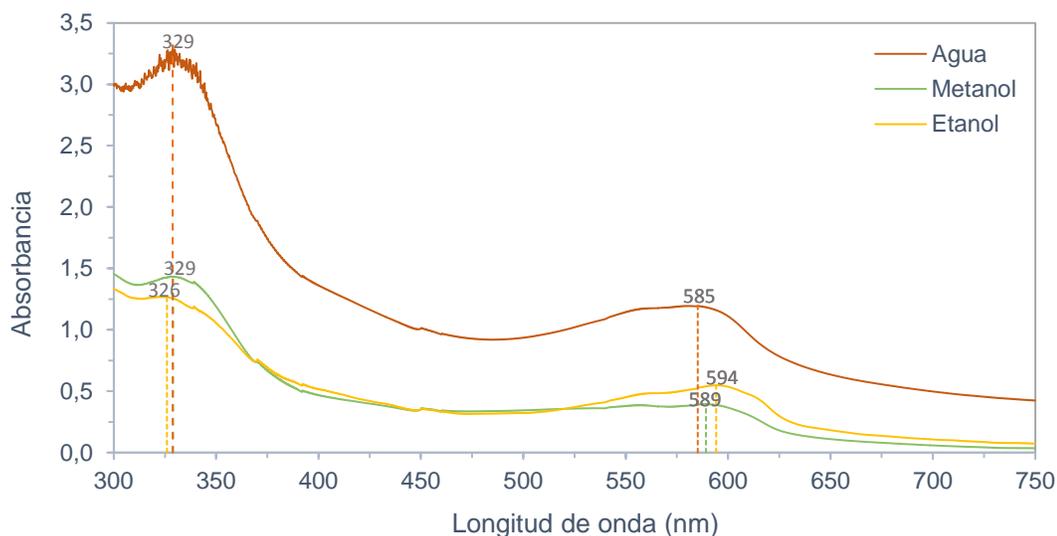
La estabilidad de las antocianinas y por tanto la intensidad de color, está directamente relacionada con el pH de la solución. El color es más intenso cuando las moléculas del pigmento están en su forma de catión flavilio (pH 1,0), lo que produce un desplazamiento hacia el rojo (Giusti y Wrolstad, 2001). Contrariamente, el pigmento mostró una coloración distinta a la esperada, pues presentó un color rojo más intenso a pH 4,5 a 5,0 en el que se supone predominan las especies pseudobase carbinol o hemiacetal y la forma chalcona o de cadena abierta, que son incoloras y de tonalidad amarilla (Francis y Markakis, 1989). A valores de pH superiores a 7,0 se presentan las formas quinoidales de color púrpura, las cuales se oxidan fácilmente en presencia de oxígeno (Garzón, 2008).

No obstante, contrario a lo que se esperaba, los extractos mostraron (figura 9) un color naranja a pH 1,0 y un color rosado a pH 5,0; mientras que a un pH de entre 7,0 a 11,0 el color predominante fue el púrpura, por otra parte, a pH 13,0 el verde fue el color observado. Estudios hechos por Harborne y Williams (2000), revelan que algunos pigmentos antociánicos son singularmente inestables cuando se extraen con solventes ácidos y solo se pueden extraer si se usan medios neutros, y parecen estar estabilizados por fenómenos de copigmentación, lo cual podría explicar los resultados obtenidos.

Para tratar de comprender el comportamiento del extracto relacionado a los cambios de color, previo a proceder con la extracción del colorante, se realizó además pruebas de medición de absorbancia usando agua destilada, etanol absoluto y metanol como disolvente, los cuales son mencionados recurrentemente en los procesos de extracción de antocianinas. Estos resultados mostraron un

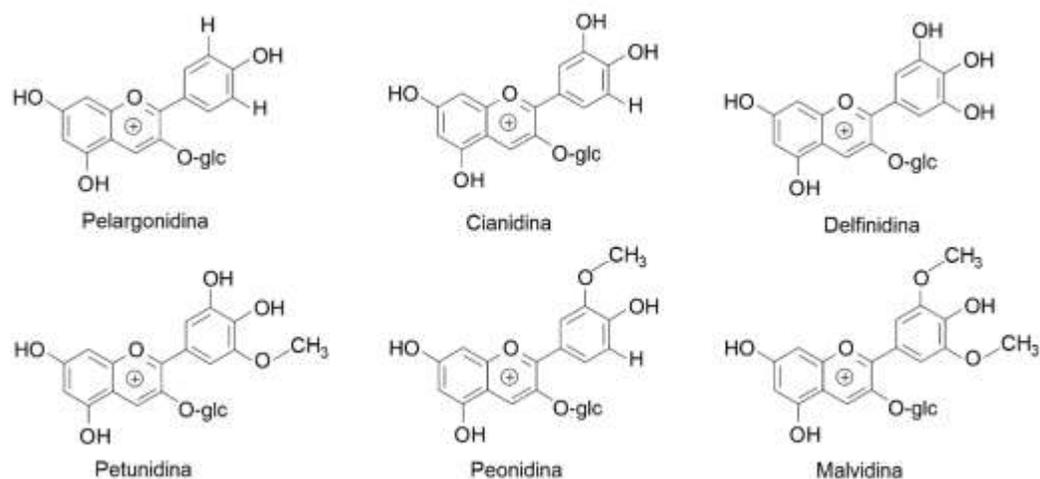
solvatocromismo negativo de los compuestos colorantes extraídos de la planta, cambiando de color según la polaridad del disolvente empleado y variando la longitud de onda de máxima absorción en el espectro, presentándose a la vez un desplazamiento hiperacrómico (figura 10). La figura 10 también muestra picos de máxima absorbancia en la región ultravioleta del espectro (UV), entre los 310 y 330 nm. Lo cual es característico de antocianinas aciladas por la presencia de ácidos hidroxycinámicos existentes en la pared celular (Jackman y Smith, 1996). Este tipo de antocianinas mejora la estabilidad, intensidad y retención del color en medios neutros o poco ácidos, en donde las antocianinas no aciladas son prácticamente incoloras y facilitan a su vez los fenómenos de copigmentación (Jackman y Smith, 1996).

Figura 10. Efecto solvatocrómico del extracto



Los picos máximos de absorbancia ( $\lambda_{vis-max}$ ) encontrados en los tres sistemas disolvente (agua = 585 nm, metanol = 589 nm y etanol = 594 nm) superaron los valores de antocianinas como la pelargonidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 496 a 513 nm), cianidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 510 a 530 nm), delphinidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 520 a 543 nm), petunidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 520 a 546 nm), peonidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 511 a 536 nm) o la malvidina ( $\lambda_{vis-max}$  = 520 a 546 nm) (Giusti y Wrolstad, 2001). Lo cual puede deberse a un efecto batocrómico causado por la asociación intermolecular de las antocianinas con otros compuestos que actúan como agentes copigmentantes. La figura 11 muestra la disposición de los grupos hidroxilo y metoxilo de estas seis antocianinas.

Figura 11. Estructura química de las seis principales antocianinas glicosiladas



Fuente: del Valle, González y Báez, 2005

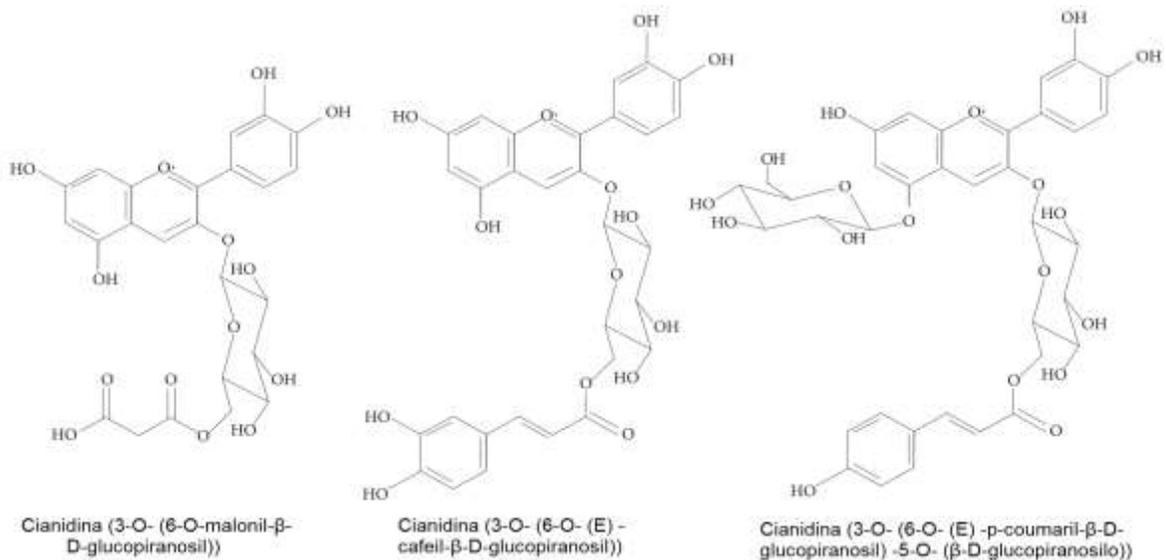
Las diferencias observadas, tanto con el tipo de disolvente como con el pH de extracción (tabla 3 y figura 9), mostraron que el color del extracto varía ampliamente según las condiciones de extracción, lo que demostró la relevancia de estas dos variables en el proceso de extracción. Estos resultados fueron tomados como base para proponer el método de extracción, en el que se usó agua destilada sin acidificar como disolvente. Se obtuvo de esta manera un extracto acuoso con un pH de  $7,73 \pm 0,04$ ;  $1,7 \pm 0,05$  °Brix y un rendimiento de extracto seco de  $16,2 \text{ gL}^{-1}$  (el extracto seco se obtuvo al llevar la muestra a sequedad en un rotavapor IKA® PV10).

#### 4.3. DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

Aunque relativamente es poca la información existente sobre la capacidad, estabilidad y aplicabilidad de los compuestos que poseen actividad colorante presente en plantas del género *Justicia*, algunos autores han demostrado la presencia de antocianinas y de otros metabolitos secundarios de interés en especies vegetales de este grupo: Mpiana y colaboradores (2014) en plantas de *Justicia matammensis* y *Justicia laxa*; Espinosa y colaboradores (2012) en *Justicia spicigera*; Patil y colaboradores (2015) en *Justicia wynaadensis* y Akibou y otros (2014) en *Justicia secunda*, son algunos ejemplos. Sin embargo, dichas

investigaciones no reportan el tipo o tipos de antocianinas presentes en estas plantas, pero si un efecto batocrómico posiblemente causado por procesos de copigmentación, probablemente originado por la presencia de ácidos orgánicos en las estructuras vegetales, como el ácido caféico (Espinosa *et. al.*, 2012). La figura 12 muestra algunas estructuras de antocianinas aciladas con ácidos hidroxicinámicos.

Figura 12. Estructuras químicas de antocianinas aciladas



Fuente: Tsuda y otros, 2006

La copigmentación es uno de los principales factores que contribuyen al color y afectan la estabilidad de las antocianinas, causando cambios hipercrómicos y batocromáticos en la longitud de onda de máxima absorbancia. El ión flavilio predominante a pH 1,0, es casi planar y muestra una deslocalización electrónica, que se extiende por todo el grupo cromóforo, mientras que la forma hemiacetal a pH 4,5, tiene dos anillos aromáticos sin conjugar y un anillo central el cual no es planar, porque tiene un carbono tetrahédrico, por lo tanto el ión flavilio es la única especie capaz de copigmentar. De esta manera, los residuos aromáticos de grupos acil se alinean con el cation flavilio dificultando la adición de agua en las posiciones 2 y 4 del anillo pirilium, lo que impide la hidratación de la molécula y propicia un aumento en la estabilidad del cromóforo (Wilska y Korzuchowska, 1996; Malien,

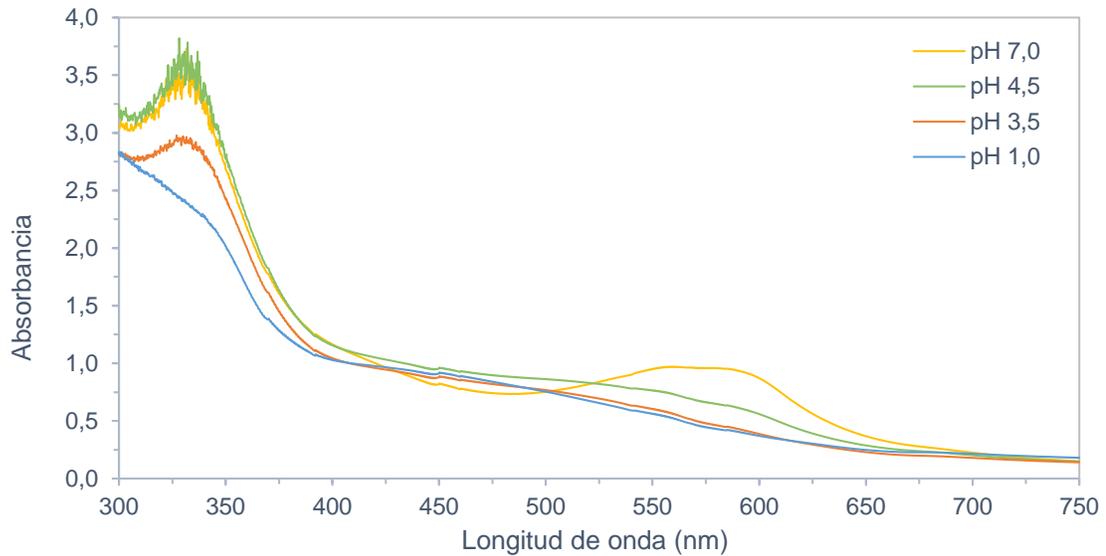
Dangles y Amiot, 2001). La figura 13, representa de forma gráfica lo dicho anteriormente.

Figura 13. Estructura tridimensional antocianidina



El proceso de cuantificación de antocianinas monoméricas totales se desarrolló por el método de pH diferencial. El cual se basa en las transformaciones estructurales reversibles de las antocianinas según el pH, en la que predomina la forma de oxonio (catión flavilio) coloreada a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5 (Giusti y Wrolstad, 2001). Empero, las curvas de absorbancia de los extractos de *J. secunda*, tomados a diferentes longitudes de onda para cada sistema tampón, mostraron que la absorbancia en el buffer a pH 4,5 fue mayor que la absorbancia en el buffer a pH 1,0. Las mediciones también se realizaron a pH 3,5 y 7,0, para tratar de establecer una relación entre el color, el pH, la estructura y tipo de antocianina, lo que reveló un efecto hiperocrómico conforme el aumento del pH (figura 14).

Figura 14. Espectros UV-Vis del extracto a diferentes valores de pH

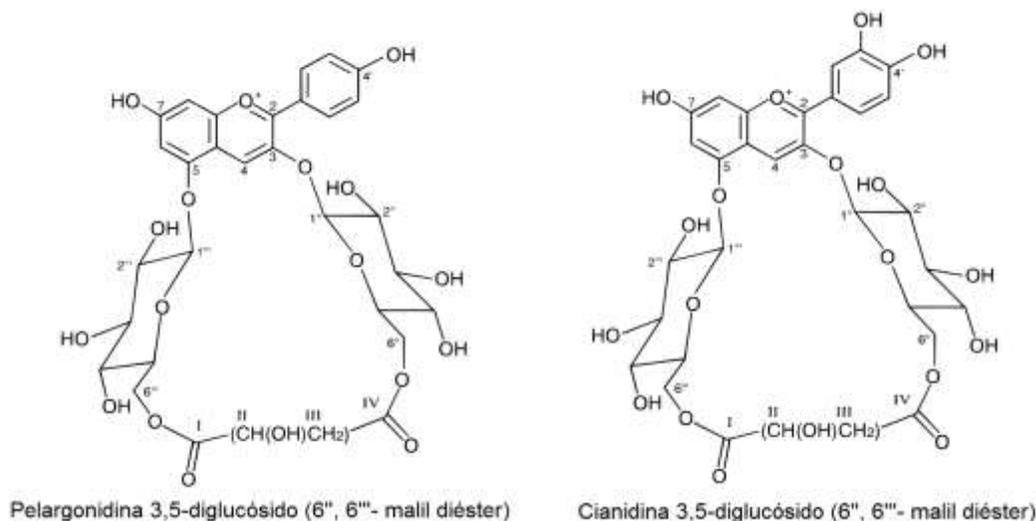


Aunque es probable que esto pueda ser debido a que el extracto obtenido no fue sometido a ningún proceso de purificación, lo que permitiría la presencia de una variedad de compuestos que afectarían la absorbancia y color del colorante. No obstante, otros autores realizaron procesos similares de extracción y aplicación de antocianinas de diversas fuentes vegetales, sin que se reportaran problemas al usar el método de pH diferencial, ni mencionaron obtener espectros semejantes (Heras, Alvis y Arrazola, 2013; Figueroa *et... al.*, 2011; Villacrez, 2013; Jing y Giusti, 2007; Revelo, 2014; Saboya, 2017; Zapata *et... al.*, 2014).

De igual manera la presencia de compuestos fotosintéticos (clorofilas, xantofilas, carotenos), probablemente presentes en las estructuras foliares de la planta, pueden ser causal de este fenómeno, aunque es poca la información disponible de obtención de antocianinas de hojas verdes, estas generalmente muestran ser órganos vegetativos con menos compuestos antociánicos que los órganos reproductores (flores y frutos) (Sepúlveda *et... al.*, 2009). Sin embargo, Patil y colaboradores (2015), obtuvieron resultados similares al estudiar el comportamiento del extracto acuoso de las hojas de la planta *Justicia wynaadensis* en soluciones de diferentes pH, indicando una mayor intensidad del color en medios alcalinos acompañado también de una degradación más rápida, presentándose de igual forma un efecto hipocrómico a medida que descendía el pH, reportando una  $\lambda_{vis-max}$  de 589 nm. Antocianinas como la cianidina 3,5-diglucósido (6'', 6'''- malil diéster) y pelargonidina 3,5-diglucósido (6'', 6'''- malil diéster) obtenidas de flores de claveles (*Dianthus caryophyllus*) (Figura 15), manifestaron mayor labilidad en medios ácidos

y menores valores en la absorbancia, que si se extrajeran usando solventes con pH neutro (Harborne y Williams, 2000; Gonnet y Fenet, 2000).

Figura 15. Estructura de antocianinas macrocíclicas



Fuente: Gonnet y Fenet, 2000

En vista de que el método pH diferencial no arrojó resultados que permitieran cuantificar las antocianinas en el extracto, se propuso como alternativa implementar el método de cromatografía líquida de ultra alta resolución con analizador de masas Orbitrap (UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS). Los tiempos de retención ( $t_R$ ) y la cuantificación de las antocianinas en la muestra microencapsulada (cianidina 3-rutinósido, pelargonidina 3-glucósido, quercetina 3-glucósido, kaempferol 3-glucósido, cianidina y pelargonidina), se reportan en la tabla 4 (Anexo B). Solo fue posible utilizar estándares de antocianinas no aciladas, puesto que eran los únicos disponibles por el laboratorio.

Tabla 4. Compuestos determinados por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS

Compuesto	tR (min)	Concentración (mg/Kg)
Cianidina	3,76	< 0,01
Cianidina 3-rutinósido	3,57	8,8
Pelargonidina	4,42	< 0,01
Pelargonidina 3-glucósido	3,69	< 0,01
Quercetina 3-glucósido	4,22	0,2
Kaempferol 3-glucósido	4,41	< 0,01

*Nivel mínimo de cuantificación del método empleado (NMC=0,01 mg/kg muestra)*

Los resultados demostraron la presencia de cianidina 3-rutinósido, una de las antocianinas más comunes y a la cual se le atribuyen efectos anticarcinogénicos relevantes (Hassimotto, Genovese y Lajolo, 2008; Chiou *et... al.*, 2005) y del flavonol quercetina 3-glucósido, el cual posee potencial antilipoperoxidativo y efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Hassimotto, Genovese y Lajolo, 2008; Chiou *et... al.*, 2005). No obstante, muchos autores reportan niveles superiores de antocianinas en fuentes vegetales utilizando métodos espectrofotométricos: 92,92 mg/kg en cascaras de Jaboticaba (Montes *et... al.*, 2005), 1.050 mg/kg en cascaras de berenjena (Herazo, 2015), 5.900 mg/kg en maíz morado (Yang *et... al.*, 2008), 1.069 mg/kg en cascaras de higo (Aguilera *et... al.*, 2012) y 902 mg/kg en tomate de árbol.

Pese a la relativa poca cantidad de antocianinas en las microcápsulas, conforme a los resultados de los estándares utilizados, la cianidina 3-rutinósido (8,8 mg/kg) solo corresponde a una de las tantas posibles antocianinas presentes en el polvo colorante y no debe descartarse la existencia de antocianinas de tipo acilado, las cuales tienen una mayor estabilidad a cambios en el pH.

#### 4.4. CARACTERÍSTICAS DEL MICROENCAPSULADO

La metodología de extracción y microencapsulación se basó en el trabajo realizado por Pavón y colaboradores (2011), en el cual se usó la especie *Justicia spicigera*. Y se demostró que la microencapsulación inhibió significativamente la degradación del color. La actividad de agua ( $a_w$ ) de la mezcla de coloides goma arábica y maltodextrina (GA50-MD50) reportada por estos autores fue 0,555, mientras que la

obtenida en este estudio fue de 0,552. La tabla 4 muestra algunas de las propiedades físicas del polvo obtenido.

Tabla 5. Propiedades físicas del microencapsulado

Humedad (%)	a <sub>w</sub>	Densidad aparente (g mL <sup>-1</sup> )	Color			Muestra
			L*	a*	b*	
2,74±0,02	0,552±0,001	0,451±0,02	56,5±0,37	3,25±0,05	-1,21±0,03	

Investigaciones hechas por Chung y colaboradores (2016) en antocianinas de zanahoria púrpura como colorante de bebidas comerciales, mostraron que las antocianinas podrían haber interactuado con las fracciones de glicoproteínas de la goma arábica a través de enlaces de hidrógeno, dando como resultado una mayor estabilidad del color.

#### 4.5. ESTABILIDAD DEL COLOR EN YOGUR

El pigmento se disolvió fácilmente en el yogur y de forma homogénea, no presentó migración del color hacia el suero del yogur ni cambios visibles en su textura, es posible que se presenten cambios en el sabor, teniendo en cuenta que el colorante no fue purificado. Para visualizar los cambios de los colorantes durante el periodo de almacenamiento, se crearon muestras de color a partir de los valores L\*, a\* y b\*, las cuales se muestran en la figura 16.

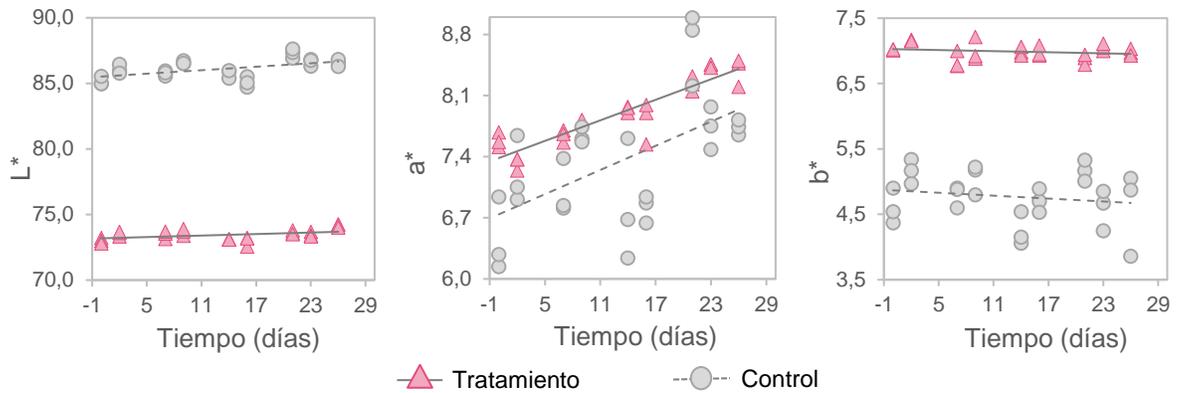
Figura 16. Degradación de color en muestras de yogur



No fue posible igualar la tonalidad entre el yogur coloreado con el colorante azoico y el yogur coloreado con el pigmento, sin importar la cantidad de microencapsulado añadido. El colorante obtenido mostró poseer un potencial de tinción menor que el colorante Rojo escarlata, no obstante, este es un comportamiento característico de todos los colorantes naturales, y es una práctica común en muchas industrias usar mezclas de diferentes colorantes para poder obtener el tono deseado.

Las diferencias de color entre el control y el tratamiento son evidentes (Figura 16). Los cambios en el color a través del tiempo para cada uno de los colorantes fueron prácticamente imperceptibles visualmente, observándose ligeras variaciones en el tono, principalmente en el Control. Sin embargo, el instrumento de medición de color permitió monitorear cambios de forma precisa en las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , los cuales se presentan en la figura 17. Estos valores fueron utilizados para determinar variaciones en la luminosidad ( $L^*$ ), la croma ( $C^*$ ) y el ángulo de tono ( $H^\circ$ ). Simultáneamente se establecieron los cambios en las coordenadas colorimétricas respecto al día cero ( $\Delta L$ ,  $\Delta a$  y  $\Delta b$ ), lo que permitió hallar la diferencia total de color (DTC).

Figura 17. Gráficos de dispersión coordenadas colorimétricas



La figura 17, muestra que los valores de las coordenadas  $L^*$  (brillo) y  $a^*$  (enrojecimiento) tienden a aumentar con el tiempo de almacenamiento, caso contrario al de la coordenada  $b^*$  (amarillez). A su vez, señala una mayor dispersión de los datos para los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ , especialmente los del Control. La diferencia visual entre el color de los dos colorantes (figura 16) radicó principalmente en los valores de  $L^*$ , los cuales fueron menores para el Tratamiento.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, las variables  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $H^0$  y DTC, no presentan una distribución normal. Se aplicaron pruebas no paramétricas (prueba de la U de Mann-Whitney) hallando diferencias significativas entre el colorante Control y el Tratamiento para todas las variables mencionadas, excepto para la variación de los parámetros  $\Delta L$  y  $\Delta b$ . Es decir, los cambios en las coordenadas  $L$  y  $b^*$  con respecto al día de aplicación, son prácticamente iguales para ambos colorantes. Contrariamente, la variación en el enrojecimiento ( $\Delta a$ ) mostró ser mayor en el control. La figura 18 representa el comportamiento de estas variables en la figura 15.

Figura 18. Cambios en las coordenadas colorimétricas respecto el día cero

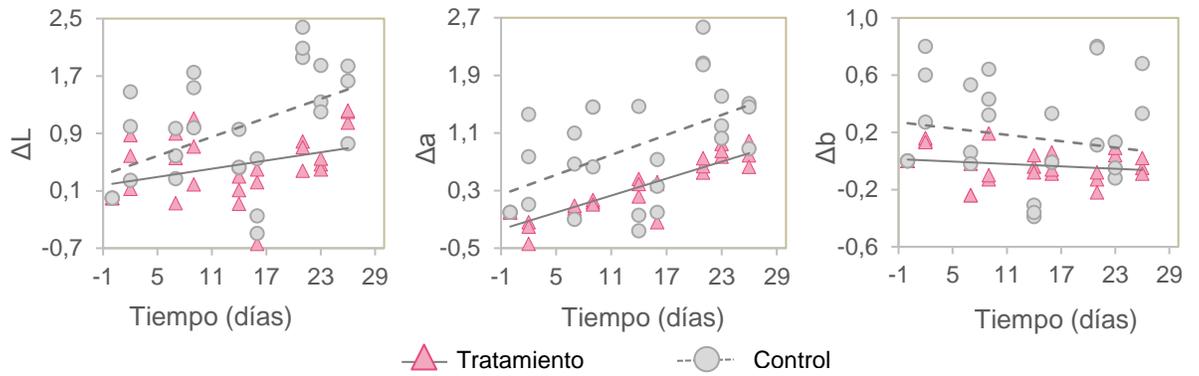
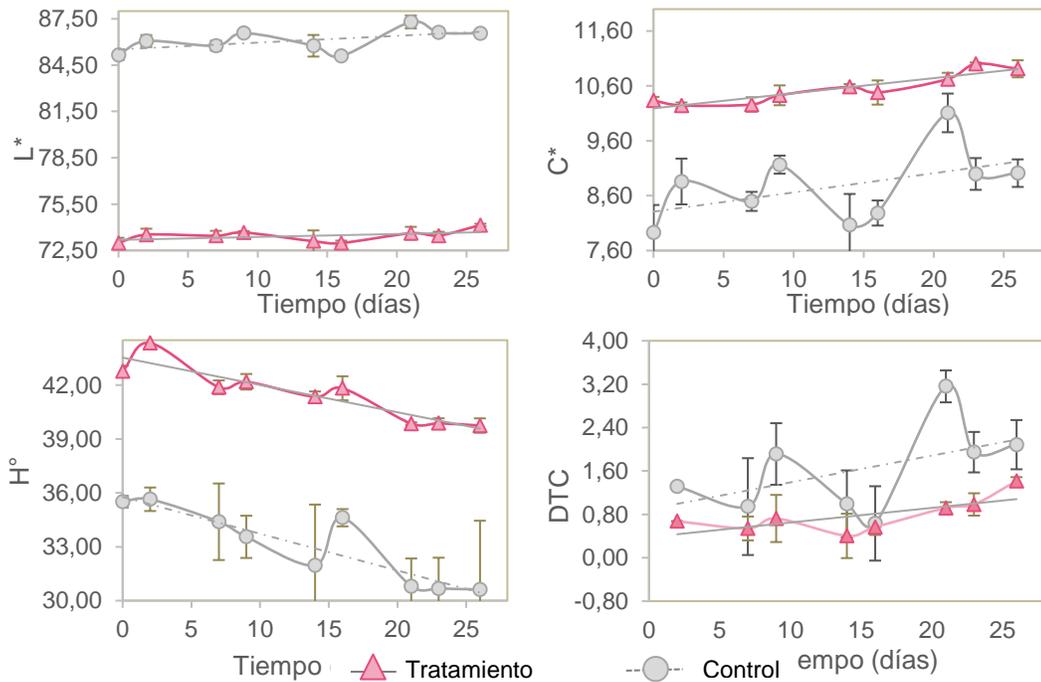


Figura 19. Estabilidad del color durante el almacenamiento



A lo largo del periodo de vida útil del yogur, el color mostro variaciones significativas en comparación con el día cero, haciéndose más evidentes a medida que avanzaba

el tiempo. Los valores de L\* y C\* tienden a aumentar, un aumento en el valor de L\* se relaciona con la formación de extractos translúcidos por la decoloración del color (Reyes y Cisneros, 2007), mientras que valores bajos en la C\* representan menos intensidad en el color (García *et. al.*, 2013). El colorante Rojo escarlata mostro un comportamiento fluctuante durante el tiempo, decayendo y aumentando drásticamente, sin evidenciarse una tendencia clara, pero mostrando un mayor aumento en los valores de C\*, de aproximadamente 2,2 unidades frente a 0,7 del colorante obtenido de las hojas de *J. secunda*. Yang y colaboradores (2008) hallaron una correlación positiva entre la concentración de antocianinas y la Croma, indicando además que los valores más altos de Luminosidad se relacionaron con un menor rendimiento de antocianinas.

Los valores de H° mostraron una línea de tendencia descendente, con una disminución promedio de 4,4 y 4,9 unidades para el Tratamiento y el Control, respectivamente. Los cambios en el valor H° están asociados a la degradación de antocianinas y a la posible formación de especies chalconas (Reyes y Cisneros, 2007). Salas y Tovalino (2018) realizaron pruebas en yogur a partir antocianinas obtenidas de la papa y concluyeron que los valores de H° que se obtenían con el extracto superaban al de los yogures comerciales, alejándose del rojo. En contraste, Aguilera y colaboradores (2012) evaluaron el efecto del pigmento de polvo del higo (*Ficus carica* L.) rico en antocianinas en muestras de yogur, al comparar la estabilidad del color frente a tres marcas de yogur comercial, demostrando que el pigmento seco posee valores de C\* y H° inferiores y menos estables.

Los valores en la DTC aumentaron a medida que el tiempo de almacenamiento fue mayor, con valores máximos de 3,16 y 1,42 unidades para el Control y el Tratamiento respectivamente, presentándose una mayor homogeneidad y una tendencia más definida en la variación de la DTC del tratamiento. Un valor bajo en la DTC indica cambios mínimos en el color, por tanto una mayor estabilidad del colorante. Diferencias de color entre 0 y 1,5 pueden considerarse pequeñas, lo que indica que el color en la muestra es casi idéntico al del día cero (Obón *et. al.*, 2009). Las variaciones en la DTC no corresponden a una variación de color perceptible por el sistema visual humano, aun cuando un valor de 1,0 es considerado como la diferencia mínima de color notable (Gonnet, 1998), esto se evidencia en la figura 16, donde es difícil establecer diferencias subjetivas entre las muestras a medida que transcurre el tiempo. Obón y colaboradores (2009) evidenciaron cambios visibles en el color en una muestra de yogur, solo después de un mes de almacenamiento, lo que sugiere que para obtener diferencias significativas es aconsejable evaluar el color por más tiempo, aun si supera el periodo de vida útil del producto, aunque esto sea comercialmente inviable.

Cada repetición presento disparidad en las coordenadas colorimétricas, acrecentando la dispersión de los datos para ambos grupos de yogures, lo que puede ser consecuencia de condiciones desuniformes en el almacenamiento, a causa de la cercanía a la fuente de refrigeración, variaciones en el flujo eléctrico del equipo e incidencia de la luz, lo que pudo afectar al proceso fermentativo del producto.

#### 4.6 CINÉTICA

Para determinar el orden de la reacción y las constantes de velocidad de orden cero ( $K_0$ ) y de orden uno ( $K_1$ ) de ambos colorantes estudiados, se realizó un análisis de regresión lineal simple. Los parámetros de los modelos cinéticos fueron estimados por el método de mínimos cuadrados. Se halló el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error cuadrático medio (RMSE) de las coordenadas colorimétricas y la DTC, para los modelos cinéticos aplicados. Los resultados se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de la evolución del color en yogur

Colorante	Parámetro	Modelo de orden cero			Modelo de orden uno		
		$K_0$ ( $10^3$ días $^{-1}$ )	$R^2$	RMSE	$K_1$ ( $10^3$ días $^{-1}$ )	$R^2$	RMSE
Tratamiento	L*	-19,1	0,178	0,83	-0,26	0,177	0,02
	a*	-39,2	0,837	1,08	-4,95	0,836	0,21
	b*	2,8	0,046	0,12	0,39	0,045	0,02
	DTC	-34,2	0,503	1,31	-39,29	0,228	0,42
Control	L*	-44,1	0,276	1,80	-0,51	0,275	0,05
	a*	-46,2	0,329	1,77	-6,26	0,331	0,32
	b*	7,4	0,028	0,32	1,67	0,031	0,07
	DTC	-66,5	0,345	2,67	-36,40	0,165	0,51

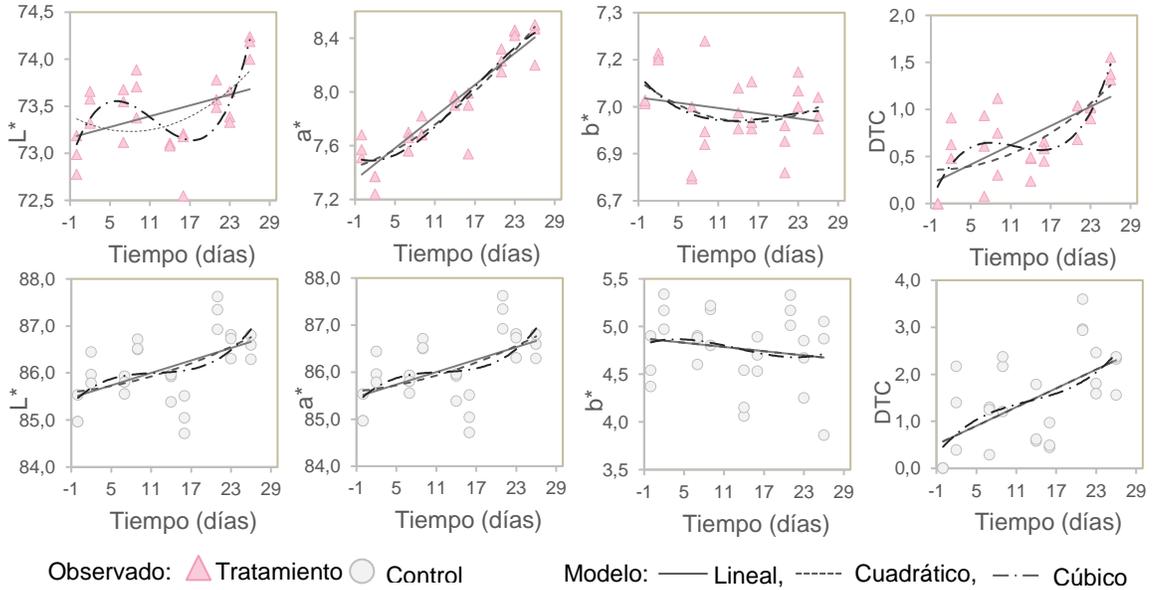
Los resultados mostraron que las curvas cinéticas de las coordenadas colorimétricas y la DTC no se ajustan completamente a modelos de orden cero, uno o dos, debido probablemente a la variabilidad de los datos. Los valores  $R^2$  para los modelos de orden cero y uno no difieren significativamente, siendo menores a 0,7

a excepción del parámetro  $a^*$  del tratamiento, por lo que resulta difícil asumir cual modelo cinético expresa adecuadamente la evolución del color. Sin embargo, los siguientes autores han declarado que el modelo cinético de primer orden fue mejor para los valores  $L^*$  y  $b^*$  en la pasta de tomate concentrada (Barreiro, Milano y Sandoval, 1997), puré de melocotón (Ávila y Silva, 1999) y puré de pera (Ibarz, Pagán y Garza, 1999). Chutintrasri y Noomhorm, (2007) también reportan una cinética de primer orden en los parámetros  $L^*$  y  $b^*$ , pero de orden cero para  $a^*$  y DTC en puré de piña. No obstante, al tratarse de antocianinas la velocidad de degradación del color presenta amplias variaciones según su estructura y estas pueden encontrarse en diferentes formas químicas, lo que depende del pH y de su fuente de obtención.

Sánchez y colaboradores (2013) señalan que muchas veces es difícil escoger entre ambos modelos, si no se deja desarrollar la reacción por un tiempo suficiente, por lo que mediciones más frecuentes y por más tiempo podrían aumentar el valor del coeficiente de determinación y aumentarían la posibilidad de predecir satisfactoriamente el comportamiento de las variables por medio del modelo establecido.

Simultáneamente se realizaron contrastes polinomiales de estos parámetros para conocer si existe una tendencia lineal, cuadrática o cúbica, en busca de un modelo que logrará el mejor ajuste de los cambios en el color del pigmento y permitiera realizar la interpretación de los datos con una ecuación adecuada. Los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y DTC del colorante rico en antocianinas registraron una tendencia cúbica significativa ( $p < 0,05$ ) con un mejor ajuste, al contrario del parámetro  $b^*$ , que no mostro ninguna tendencia específica. El colorante azoico mostro una mayor dispersión de los datos y un menor ajuste para todos los modelos polinomiales estudiados ( $R^2 < 0,7$ ). Esto se puede evidenciar en la figura 20.

Figura 20. Estimación curvilínea de los cambios en los parámetros colorimétricos



La tabla 7 muestra los coeficientes de la ecuación cúbica obtenidos del análisis de tendencia de ambos colorantes, la cual es una ecuación algebraica de grado tres que se puede poner bajo la forma canónica:  $b_1x^3 + b_2x^2 + b_3x + c = 0$

Tabla 7. Estimación de parámetros cúbicos

Variable	Tratamiento					Control				
	R <sup>2</sup>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	c	R <sup>2</sup>	b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	c
L*	0,62	1,00E-03	-0,200	0,174	73,1	0,31	3,00E-04	-0,010	0,123	85,47
a*	0,86	-7,49E-05	0,004	-0,010	7,496	0,33	5,81E-05	-0,002	0,056	6,753
b*	0,12	-1,99E-05	0,001	-0,220	7,078	0,03	6,66E-05	-0,003	0,017	4,835
DTC	0,68	4,00E-04	-0,013	0,141	0,176	0,36	2,00E-04	-0,009	0,155	0,458

## CONCLUSIONES

El extracto obtenido de la planta *Justicia secunda* Vahl posee un alto potencial como colorante natural para uso en la industria alimentaria, convirtiéndose en una fuerte alternativa para la sustitución de colorantes azoicos en leches fermentadas y posiblemente en otros productos alimenticios.

El color de los compuestos presentes en el material vegetal estudiado, mostro ser altamente sensible a los cambios en la polaridad y la acidez de los sistemas disolvente empleados. Lo que además de ser útil en el sector alimentario, puede aplicarse en campos como el desarrollo de quimiosensores para el control in situ. Adicionalmente el color extraído mostro ser particularmente inestable en medios ácidos.

El bajo valor en la DTC del pigmento extraído ( $DTC < 1,5$ ) al finalizar el periodo de vida útil del yogur, indica que el colorante podría utilizarse en este tipo de productos sin que haya cambios perceptibles por el consumidor, convirtiéndose en una opción viable para la sustitución de colorantes azoicos. Sin embargo, el color resultante al adicionar el colorante microencapsulado al yogur, no se relaciona fácilmente con tonalidades indirectamente ligadas a sabores comerciales. Demas características sensoriales, como en sabor que confiere el extracto al producto no fueron objeto de este estudio.

El coeficiente de correlación de los tres modelos cinéticos reflejó una correlación moderada a mínima. Por lo tanto, se considera que la degradación de color no depende solo del tiempo, sino de otros factores asociados con la naturaleza de la matriz alimenticia. No obstante, el extracto obtenido presenta además propiedades farmacológicas estudiadas por otros autores, que hacen más interesante su uso como colorante alimentario.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar análisis cromatográficos que permitan la identificación de antocianinas aciladas en el extracto de *J. secunda* Vahl. Lo que ayudaría a explicar el comportamiento del color en los diferentes pH estudiados. Además, es aconsejable llevar a cabo procesos de purificación del extracto, que descarten el efecto de otros compuestos que puedan interferir con la correcta interpretación de las curvas de absorbancia y hagan más atractivo el color para su implementación en yogures.

Considerando que esta investigación tenía como fin evaluar únicamente la estabilidad del color, es conveniente estudiar el grado de afectación del extracto a las características sensoriales del producto al cual es añadido, como el sabor, olor y textura. Se presume que el extracto podría afectar el sabor natural del yogur, lo que podría mejorar si se llevaran a cabo procesos de purificación. Asimismo, es recomendable realizar análisis microbiológicos y de vida útil del yogur con el fin de garantizar que el colorante no afecta la inocuidad del producto, además de establecer si este posee algún grado de toxicidad, antes de ser implementado.

Es aconsejable monitorear los cambios en las condiciones fisicoquímicas del yogur una vez adicionado el colorante, lo cual podría ayudar a establecer una relación entre estas y las fluctuaciones de las coordenadas colorimétricas. Adicionalmente, se recomienda realizar pruebas que permitan establecer si las condiciones climáticas y edáficas de la zona en donde se encuentran las plantas de *J. secunda* Vahl y su estado fisiológico, inciden en su efecto colorante.

Dada la intensidad y estabilidad del color obtenido, se recomienda evaluar el extracto de *J. secunda* Vahl en productos como jugos y bebidas industrializadas.

## REFERENCIAS

- AGUILERA, Miguel et. al. Antocianinas de higo como colorantes para yogur natural. En: Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. 2012, vol. 14, no. 1, p. 18-24.
- AKIBOU, Osseni et. al. Chemical characterization and biological activities of extracts of three plants used in traditional medicine in benin: Tectona grandis, uvaria chameae and justicia secunda. En: Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 2014, vol. 7, no. 5, p. 23-27.
- ALONSO, Angel et.al. Antitumor and immunomodulatory effects of Justicia spicigera Schldl (Acanthaceae). En: Journal of Ethnopharmacology. 2012, vol. 141, no. 3, p. 888-894.
- ÁLVAREZ, Omar. Influencia del color en las preferencias de los consumidores. En: Revista Observatorio Calasanz. 2011, vol. 2, no. 4, p. 228-246.
- ÁVILA, Isabel y SILVA, Cristina. Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. En: Journal of Food Engineering. 1999, vol. 39, no. 2, p. 161-166.
- AWAD, Nagwa et. al. Antioxidant and hepatoprotective effects of justicia spicigera ethyl acetate fraction and characterization of its anthocyanin content. En: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2015, vol. 7, no. 8, p. 91-96.
- BALCÁZAR, Vera, Elaboración y aplicación gastronómica del yogur. Trabajo de grado Licenciatura en gastronomía y servicio de alimentos y bebidas. Cuenca, Ecuador: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias de la Hospitalidad, 2011. 20 p.
- BARREIRO, Jose; MILANO, Miguel y SANDOVAL, Aleida. Kinetics of colour change of double concentrated tomato paste during thermal treatment. En: Journal of Food Engineering. 1997, vol. 33, no. 3-4, p. 359-371.
- BEARTH, Angela; COUSIN, Marie Eve y SIEGRIST, Michael. The consumer's perception of artificial food additives: Influences on acceptance, risk and benefit perceptions. En: Food Quality and Preference. 2014, vol. 38, p. 14-23.

- BOUCHER, François. Los productos nutraceuticos: oportunidad para los recursos naturales autóctonos. El papel de los investigadores. En: Fascículo Técnico S.I.: 1999.
- CAI, Yi-Zhong y CORKE, Harold. Production and Properties of Spray-dried. En: Journal of Food Science. 2000, vol. 65, no. 6, p. 1248-1252.
- CANTILLO, José et. al. Evaluación de la toxicidad aguda (CL50) frente a Artemia franciscana y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de Justicia secunda (Vahl.). En: Scientia et. Technica. 2007, vol. 13, no. 33, p. 257-258.
- CAROCHO, Márcio; MORALES, Patricia y ISABEL, Ferreira; Natural food additives: Quo vadis? En: Trends in Food Science & Technology. 2015, vol. 45, p. 284-295.
- CASANOVA, Edgar et. al. Surface-enhanced Raman spectroscopy spectra of Mexican dyestuffs. En: Journal of Raman Spectroscopy. 2012, vol. 43, no. 11, p. 1551-1559.
- CASTAÑEDA, Armando y GUERRERO, Juan. Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. En: Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2015, vol. 9, p. 25-33.
- CHIOU, Hui-Ling et. al. Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. En: Cancer Letters. 2005, vol. 235, no. 2, p. 248-259.
- CHUNG, Cherly et. al. Enhancement of colour stability of anthocyanins in model beverages by gum arabic addition. En: Food Chemistry. 2016, vol. 201, p. 14-22.
- CHUNG, King. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. En: Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. 1983, vol. 114, no. 3, p. 269-281.
- CHUTINTRASRI, Benjar y NOOMHORM, Athapol. Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. En: LWT - Food Science and Technology. 2007, vol. 40, no. 2, p. 300-306.
- COMBES, Robert y HAVELAND, RD. A review of the genotoxicity of food, drug and

- cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. En: Mutation Research/Reviews in genetic toxicology. 1982, vol. 98, no. 2, p. 101-243.
- COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS, 1995. *Norma general del codex para los aditivos alimentarios: Codex Stan*. 1995. S.I.: s.n.
- CONTRERAS, Ricardo. El origen del color en la naturaleza. Una introducción a la química del color. S.I.: s.n., 2007.
- CROTEAU, Rodney; KUTCHAN, Toni y LEWIS, Norman, Natural Products (Secondary Metabolites). En: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2 ed. Chichester, Inglaterra: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318. ISBN 00319422 (Issn).
- DEL VALLE, Graciela; GONZÁLEZ, Alberto y BÁEZ, Reginaldo. Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. En: Revista Fitotecnia Mexicana. 2005, vol. 28, no. 4, p. 359 – 368.
- DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. Encuesta Nacional Agropecuaria 2016. Bogotá D.C.: 2016.
- DEPARTAMENTO ADMINISTRATIVO NACIONAL DE ESTADÍSTICA. Boletín mensual de leche cruda. Bogotá D.C.: 2018.
- DIACU, Elena, Colors: Properties and Determination of Synthetic Pigments. En: B. CABALLERO, P.M. FINGLAS y F. TOLDRÁ (eds.), En: Encyclopedia of food and health. Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016. p. 284-290. ISBN 978-0-12-384947-2.
- DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. Colouring our foods in the last and next millennium. En: International Journal of Food Science and Technology. 2000, vol. 35, no. 1, p. 5-22.
- DUANGMAL, Kiattisak; SAICHEUA, Busararat y SUEEPRASAN, Suchitra. Colour evaluation of freeze-dried roselle extract as a natural food colorant in a model system of a drink. En: LWT-Food Science and Technology. 2008, vol. 41, no. 8, p. 1437-1445.
- DURAN, Luis. Aditivos naturales. En: Arbor. 2001, vol. 168, no. 661, p. 87-107.

- ESPINOSA, Yolanda et. al. Characterization of a natural dye by spectroscopic and chromatographic techniques. En: MRS Online Proceedings Library Archive. 2012, vol. 1374, p. 49-59.
- EULER, Kenneth y ALAM, Maktoob. Isolation of Kaempferitrin from Justicia spicigera. En: Journal of Natural Products. 1982, vol. 45, no. 2, p. 220-221.
- FAO. Leche y Productos Lácteos Leche y Productos Lácteos. S.l.: s.n., 2011. ISBN 9789253067862.
- FAO. Norma General Para Los Aditivos Alimentarios. En: Codex Alimentarius. 2015, p. 426.
- FIGUEROA, Ricardo et. al. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en cáscara de pitahaya (Hylocereus undatus). En: Rev. Iber. Tecnología Postcosecha. 2011, vol. 12, no. 1, p. 44-50.
- FONG, Ronald; KEPNER, Richard y WEBB, Dinsmoor. Acetic-acid-acylated anthocyanin pigments in the grape skins of a number of varieties of vitis vinifera. En: American Journal of Enology and Viticulture. 1971, p. 150-155.
- FRANCIS, F. y MARKAKIS, Pericles. Food colorants: Anthocyanins. En: Food Science and Nutrition. 1989, vol. 28, no. 4, p. 273-314.
- GALAFFU, Nicola; BORTLIK, Karlheinz y MICHEL, Martin, An industry perspective on natural food colour stability. En: Colour Additives for Foods and Beverages. S.l.: Elsevier Ltd., 2015. p. 91-130. ISBN 9781782420200.
- GARCÍA, Eristeo et. al. Effect of solvent-temperature extraction conditions on the initial antioxidant activity and total phenolic content of muiltle extracts and their decay upon storage at different pH. En: Revista Mexicana de Ingeniera Qumica. 2012, vol. 11, no. 1, p. 1-10.
- GARCÍA, Matilde et. al. Color-copigmentation study by tristimulus colorimetry (CIELAB) in red wines obtained from Tempranillo and Graciano varieties. En: Food Research International. 2013, vol. 51, no. 1, p. 123-131.
- GARIBA, Mariano; QUINTERO, Rodolfo y LÓPEZ, Agustín. Biotecnología alimentaria. México D.F., México: Limusa S.A., 1993.
- GARZÓN, Gloria. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos

- bioactivos: Revisión. En: Acta Biológica Colombiana. 2008, vol. 13, no. 3, p. 27-36.
- GIMENEZ, Pedro; ANGOSTO, José y FERNANDEZ, José, 2013. *Bioactividad de colorantes rojos naturales*. 2013. S.l.: s.n.
- GIULIANI, Angela; CERRETANI, Lorenzo y CICHELLI, Angelo, Colors: Properties and Determination of Natural Pigments. En: B. CABALLERO, P. FINGLAS y F. TOLDRA (eds.), En: Encyclopedia of food and health. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 273–275.
- GIUSTI, Mónica y WROLSTAD, Ronald. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En: Current Protocols in Food Analytical Chemistry S.l.: 2001.
- GOMÉZ, Juan; REYES, Ricardo y AGUILAR, Isabel, Chemistry and Pharmacology of Selected Asian and American Medicinal Species of Justicia. En: DAYA PUBLISHING HOUSE (ed.), En: Bioactive Phytochemicals: Perspectives for Modern Medicine. 1 ed. New Delhi, India: s.n., 2012. p. 455-473.
- GOÑI, Sandro y SALVADORI, Viviana. Medición de color de alimentos en el espacio CIELAB a partir de imágenes. En: 3ras Jornadas ITE-Facultad de Ingeniería S.l.: 2015.
- GONNET, Jean y FENET, Bernard. «Cyclamen red» colors based on a macrocyclic anthocyanin in carnation flowers. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000, vol. 48, no. 1, p. 22-26.
- GONNET, Jean François. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited - 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. En: Food Chemistry. 1998, vol. 63, no. 3, p. 409-415.
- GOUIN, Sébastien. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. En: Trends in Food Science and Technology. 2004, vol. 15, no. 7-8, p. 330-347.
- GUERRERO, Teresa y MORA, Galo. Posibles riesgos para la salud debido al consumo de aspartame. En: Enfoque UTE. 2014, vol. 5, no. 2, p. 1-13.
- HARBORNE, Jeffrey y WILLIAMS, Christine. Advances in flavonoid research since 1992. En: Phytochemistry. 2000, vol. 55, no. 6, p. 481-504.

- HARRIS, Daniel. Análisis químico cuantitativo. 3 ed. Barcelona, España: Reverté SA, 2007.
- HASSIMOTTO, Neuza; GENOVESE, Maria y LAJOLO, Franco. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. En: Nutrition Research. 2008, vol. 28, no. 3, p. 198-207.
- HERAS, Irina; ALVIS, Armando y ARRAZOLA, Guillermo. Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (*Solana melonera* L.). En: Informacion Tecnologica. 2013, vol. 24, no. 5, p. 93-102.
- HERAZO, Irina, Obtención y estabilización de antocianinas de Berenjena (*Solanun melongena* L.) mediante microencapsulacion y su evaluacion como compuesto funcional en la industria alimentaria. Tesis presentada en opción al Título Académico de Máster en Ciencia Agroalimentaria con énfasis en Ciencias de los Alimentos. Berástegui: Universidad de Córdoba. Facultad de ingenierás, 2015. p. 18 -78.
- HERNÁNDEZ, Ángel. Tratado de nutricion/Nutrition Treatise: Nutricion humana en el estado de salud/Human Nutrition in Health Status. 2 ed. España: s.n., 2010.
- HERNÁNDEZ, Jose. Cromatografía Liquida de Alta Eficacia. En: Enfermedades Hepáticas Autoinmunes S.l.: 2007.
- HSIEH, Peggy y OFORI, Jack. Innovations in food technology for health. En: Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2007, vol. 16, no. S1, p. 65-73.
- IBAÑES, Francisco; TORRE, Paloma y IRIGOYEN, Aurora. Aditivos Alimentarios. En: Universidad Pública de Navarra. 2003, p. 1-10.
- IBARZ, Albert; PAGÁN, Jordi y GARZA, Salvador. Kinetic models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. En: Journal of Food Engineering. 1999, vol. 39, no. 4, p. 415-422.
- ICONTEC, 2006. *NTC 805 Productos Lácteos. Leches Fermentadas*. 2006. S.l.: s.n.
- IMRAM, Nazlin. The role of visual cues in consumer perception and acceptance of a food product. En: Nutrition & Food Science. 1999, vol. 99, p. 224–230.

- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIONES, 2006. *Norma Técnica Colombiana NTC 805 productos lácteos. Leches fermentadas*. 2006. 4 ed. Bogotá D.C.: s.n.
- JACKMAN, Robert y SMITH, Jeff, Anthocyanins and betalains. En: G.A.F. HENDRY y J.D. HOUGHTON (eds.), En: *Natural Food Colorants*. Boston, MA: Springer US, 1996. p. 244-309. ISBN 978-1-4615-2155-6.
- JANISZEWSKA, Emilia. Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. En: *Food Research International*. 2017, vol. 99, p. 891-901.
- JING, Pu y GIUSTI, Monica. Effects of extraction conditions on improving the yield and quality of an anthocyanin-rich purple corn (*Zea mays* L.) color extract. En: *Journal of Food Science*. 2007, vol. 72, no. 7, p. 363-368.
- KAMEL, Mervat y EL-LETHEY, Heba. The Potential Health Hazard of Tartrazine and Levels of Hyperactivity, Anxiety-Like Symptoms, Depression and Anti-social behaviour in Rats. En: *Journal of American Science*. 2011, vol. 7, no. 6, p. 1211-1218.
- KIRCA, Ayşegül; ÖZKAN, Mehmet y CEMEROĞLU, Bekir. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. En: *Food Chemistry*. 2006, vol. 101, no. 1, p. 212-218.
- KLINJAPO, ROUNGDAO y KRASAEKOOPT, WUNWISA. *Flavor in Confectionery Products*. S.I.: Elsevier Inc., 2018. ISBN 9780128115183.
- LAKSHMI, Chaitanya. Food Coloring: The Natural Way. En: *Research Journal of Chemical Sciences*. 2014, vol. 4, no. 2, p. 2231-606.
- LALEH, G. et. al. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four *Berberis* species. En: *Pakistan Journal of Nutrition*. 2006, vol. 5, no. 1, p. 90-92.
- LEÓN, Angel et. al. Estudio de la toxicidad del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en ratas tratadas por vía oral durante 30 días. En: *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 2015, vol. 2, no. 2, p. 272-278.
- MACDOUGALL, Douglas. *Colour in food: improving quality*. Cambridge: Woodhead Publ, 2002.

- MACEVOY, Bruce, 2015. Modern color theory (concepts). . [Consulta: 9 junio 2018]. Disponible en: <https://www.handprint.com/HP/WCL/color18a.html>.
- MALIEN, Céline; DANGLES, Olivier Oliver y AMIOT, Marie. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001, vol. 49, no. 1, p. 170-176.
- MARCANO, Deanna y MASHISA, Hasegawa. Fitoquímica orgánica. 2 ed. Caracas, Venezuela: s.n., 2002.
- MARTIN, Jeisson y CASTAÑEDA, Julian. Análisis de la clorofila de spinacia oleracea y cuantificación de albumina de espagueti utilizando espectrofotometría. En: UGCiencia. 2017, vol. 22, no. 1, p. 99.
- MARTÍNEZ, Francisco, Diseño de un Colorímetro Triestímulo a partir de una Cámara CCD-RGB. S.l., 2011. s.n.
- MÍNGUEZ, María; PÉREZ, Antonio y HORNERO, Dámaso, 2005. *Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples "colorantes" naturales*. 2005. S.l.: s.n.
- MONTES, Cristina et. al. Application of tristimulus colorimetry to optimize the extraction of anthocyanins from Jaboticaba (*Myrcia Jaboticaba* Berg.). En: Food Research International. 2005, vol. 38, no. 8-9, p. 983-988.
- MPIANA, Pius et. al., Effect of anthocyanin extracts from *Justicia matammensis* and *Justicia laxa* on sickle cells. En: Anthocyanins, Structure, Biosynthesis and Health benefits (Series: Biochemistry Research Trends, Nutritional and Diet Research Progress). 1 ed. S.l.: Nova Science Publishers, Inc, 2014. p. 111-124.
- OBÓN, J.M. et. al. Production of a red-purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. En: Journal of Food Engineering. 2009, vol. 90, no. 4, p. 471-479.
- ORTEGA, Eduar. Usos tradicionales de las plantas de la Orinoquia colombiana. En: UG- Ciencia. 2015, vol. 21, p. 16-28.
- ORTIZ, Rolffy et. al. Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schldl (Acanthaceae). En: Journal of Ethnopharmacology. 2012, vol. 143, no. 2, p. 455-462.

- PARRA, Ricardo. Review: Bacteria ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. En: Facultad de Ciencias Agropecuarias. 2010, vol. 8, no. 1, p. 93-105.
- PARRA, Ricardo. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. En: Open Journal Systems. 2011, vol. 63, no. 2, p. 5669-5684.
- PATIL, Nital et. al. Evaluation of microscopic structure of Justicia wynaadensis and the stability of its color extracted by using conventional and microwave extraction method. En: Journal of Food Science and Technology. 2015, vol. 52, no. 10, p. 6455-6464.
- PAULO, Filipa y SANTOS, Lúcia. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. En: Materials Science and Engineering. 2017, vol. 77, p. 1327-1340.
- PAVÓN, Leopoldo et. al. Storage stability of the natural colourant from Justicia spicigera microencapsulated in protective colloids blends by spray-drying. En: International Journal of Food Science and Technology. 2011, vol. 46, no. 7, p. 1428-1437.
- RAJAT, Sarin et. al. Nutraceuticals: a review. En: International Research Journal of Pharmacy. 2012, vol. 3, no. 4, p. 95-99.
- REVELO, Danilo, Microencapsulación de tomate de árbol rojo (*Solanum betaceum* cav.) mediante spray drying para aplicación en productos lácteos. Tesis de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. Bogotá D.C.; Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias, 2014. p. 44-74.
- REYES, Lou y CISNEROS, Luis. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). En: Food Chemistry. 2007, vol. 100, no. 3, p. 885-894.
- RIVERA, Víctor y MAGRO, Edurne. Bases de la alimentación humana. La Coruña: Netbiblo, 2008.
- ROCA, Paula et. al. Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota—a review. En: Journal of Physiology and Biochemistry. 2017, vol. 74, no. 1, p. 69-83.
- RODRIGUEZ, Delia. Natural food pigments and colorants. En: Current Opinion in Food Science. 2016, vol. 7, p. 20-26.

- SABOYA, Marcela, Extracción química de antocianinas del fruto açaí colombiano (Euterpe oleracea Mart.). Tesis de grado Ingeniería de Alimentos. Bogotá D.C.: Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Facultad de ingeniería, 2017. p. 4-21.
- SALAS, Diana y TOVALINO, Stephanie, Obtención de antocianinas de papa nativa “yawar wayku” (Solanum stenotomum) para la elaboración de un colorante natural aplicable a alimentos. Tesis Profesional de Ingeniero Agroindustrial y Agronegocios. Lima: Universidad San Ignacio de Lotoya. Facultad de Ingeniería, 2018. 21 p.
- SALEEM, Nida; UMAR, Zahida y KHAN, Seema. Survey on the Use of Synthetic Food Colors in Food Samples Procured From. En: The Journal of Tropical Life Science. 2013, vol. 3, no. 1, p. 1-7.
- SÁNCHEZ, Damián Manayay et. al. Cinética de la diferencia de color y croma en el proceso térmico de pulpa de mango (Mangifera indica L.) variedad Haden. En: Scientia Agropecuaria. 2013, vol. 4, p. 181-190.
- SEPÚLVEDA, Gabriela et. al., 2009. *Antioxidant activity and content of phenolic compounds and flavonoids from Justicia spicigera*. 2009. S.l.: s.n.
- SLOAN, Elizabeth. Top Food trends. En: Food technology. 2008, p. 22-42.
- SOLYMOSI, K. et. al. Food colour additives of natural origin. En: In Colour additives for foods and beverages. 2015, p. 3-34.
- SPENCE, Charles et. al. Does food color influence taste and flavor perception in humans? En: Chemosensory Perception. 2010, vol. 3, no. 1, p. 68-84.
- STEYN, W.J. et. al. Anthocyanins in vegetative tissues a proposed unified function in photoprotection. En: New Phytologist. 2002, vol. 155, no. 3, p. 349-361.
- TSUDA, Takanori et. al., 2006. Adiponectin expression promoter. US 2006/0234957A1. US 2006/0234957A1.
- VEGA, Elisa et. al. Actividad antibacteriana y antifúngica de Justicia spicigera. En: Revista Latinoamericana de Química. 2012, vol. 40, no. 2, p. 75-82.
- VILLACREZ, Jose, Desarrollo de microencapsulados por spray drying a partir de frutos de mora de castilla (Rubus glaucus Benth). Tesis de grado Master en

Ciencias-Química. Bogotá D.C.:Uniiversidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, 2013. 92 p.

VILLAÑO, Débora; GARCÍA, Cristina y MENA, Pedro, Colors: Health Effects. En: B. CABALLERO, P.M. FINGLAS y F. TOLDRA (eds.), En: Encyclopedia of food and health. Oxford: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016. p. 265-272. ISBN 978-0-12-384947-2.

WILSKA, Jadwiga y KORZUCHOWSKA, Anna. Anthocyanins and chlorogenic acid copigmentation - Influence on the colour of strawberry and chokeberry juices. En: European Food Research and Technology. 1996, vol. 203, no. 1, p. 38-42.

WORLD PLANTS, 2018. Catalogue Of Life. . [Consulta: 10 noviembre 2018]. Disponible [en: http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/0e6d999b85ff5a75b775de0c425a1de8](http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/0e6d999b85ff5a75b775de0c425a1de8).

WROLSTAD, Ronald; DURST, Robert y LEE, Jungmin. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. En: Trends in Food Science and Technology. 2005, vol. 16, no. 9, p. 423-428.

YANG, Zhendong et. al. Optimization extraction of anthocyanins from purple corn (Zea mays L.) cob using tristimulus colorimetry. En: European Food Research and Technology. 2008, vol. 227, no. 2, p. 409-415.

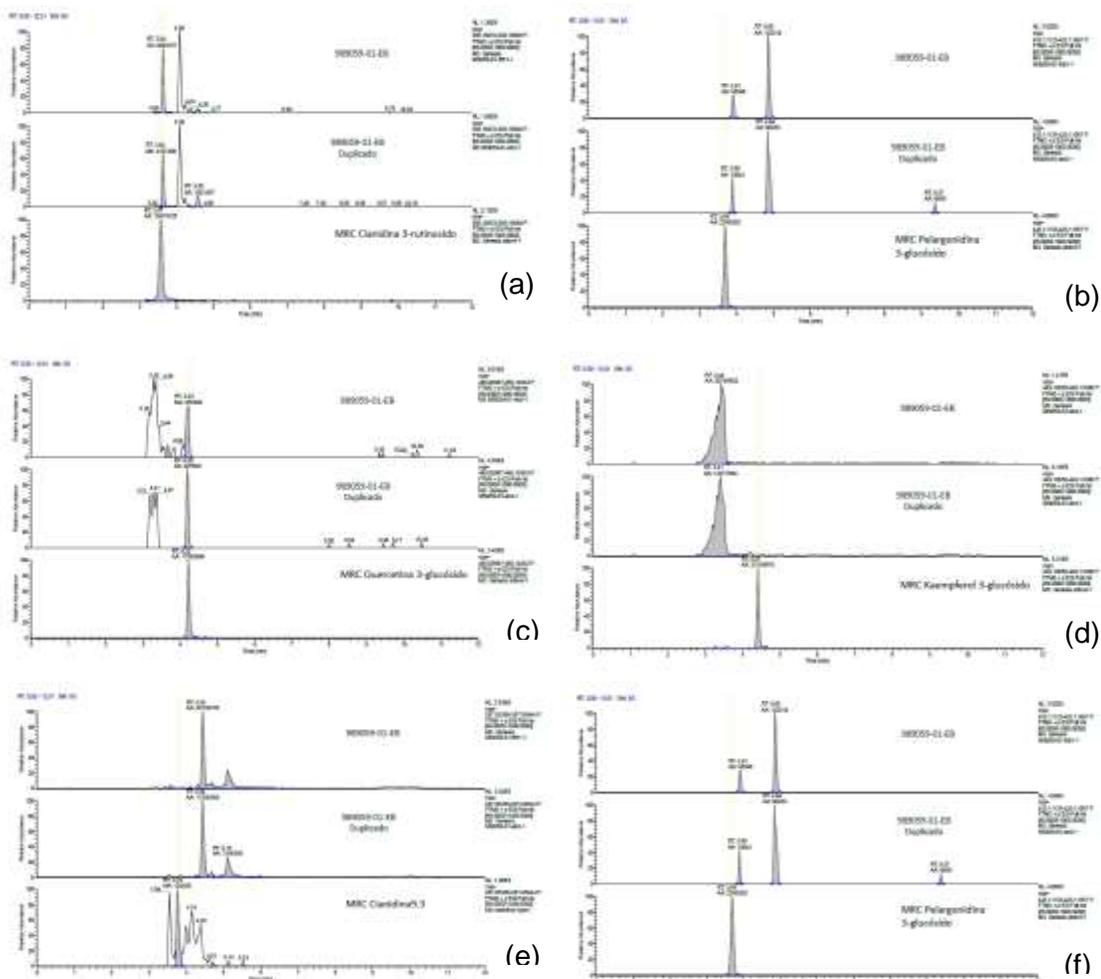
ZAPATA, Luz et. al. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. En: Ciencia Docencia y Tecnologia. 2014, vol. 25, no. 49, p. 166-192.

## ANEXOS

### Anexo A. Obtención del extracto, pruebas con disolventes



### Anexo B. Fragmentograma de masas obtenido por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS



(a) Cianidina 3-rutinósido, (b) Pelargonidina 3-glucósido, (c) Quercetina 3-glucósido, (d) Kaempferol 3-glucósido, (e) Cianidina, (f) Pelargonidina.

	<b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>CÓDIGO: FO-DOC-97</b>		
		<b>VERSIÓN:</b> 02	<b>PÁGINA:</b> 59 de 72	
	<b>PROCESO DOCENCIA</b>		<b>FECHA:</b> 02/09/2016	
	<b>FORMATO AUTORIZACION DE DERECHOS</b>		<b>VIGENCIA:</b> 2016	

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### AUTORIZACIÓN

Yo GUILLERMO ANDRÉS PARRADO CASTRO mayor de edad, vecino de Villavicencio, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 1.121.888.247 de Villavicencio, actuando en nombre propio en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado *EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLORANTE DEL EXTRACTO DE Justicia secunda Vahl COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE COLORANTES AZOICOS EN LECHEs FERMENTADAS*, hago entrega del ejemplar y de sus anexos de ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a la **UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, con la finalidad de que se utilice y use en todas sus formas, realice la reproducción, comunicación pública, edición y distribución, en formato impreso y digital, o formato conocido o por conocer de manera total y parcial de mi trabajo de grado o tesis.

**EL AUTOR – ESTUDIANTE**, Como autor, manifiesto que el trabajo de grado o tesis objeto de la presente autorización, es original y se realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros; por tanto, la obra es de mi exclusiva autoría y poseo la titularidad sobre la misma; en caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, como autor, asumiré toda la responsabilidad, y saldré en defensa de los derechos aquí autorizados, para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia, se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor en Villavicencio - Meta, a los 30 días del mes de julio de dos mil diecinueve (2019).

EL AUTOR – ESTUDIANTE

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Guillermo Andrés Parrado Castro

C.C. No. 1.121.888.247

	<b>UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS</b>	<b>CÓDIGO: FO-DOC-97</b>		
		<b>VERSIÓN:</b> 02	<b>PÁGINA:</b> 60 de 72	
	<b>PROCESO DOCENCIA</b>		<b>FECHA:</b> 02/09/2016	
	<b>FORMATO AUTORIZACION DE DERECHOS</b>		<b>VIGENCIA:</b> 2016	

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

**AUTORIZACIÓN**

Yo KAROL GINETH PARDO PARDO mayor de edad, vecino de Villavicencio, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 1.121.929.265 de Villavicencio, actuando en nombre propio en mi calidad de autor del trabajo de tesis, monografía o trabajo de grado denominado *EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD COLORANTE DEL EXTRACTO DE Justicia secunda Vahl COMO ALTERNATIVA DE SUSTITUCIÓN DE COLORANTES AZOICOS EN LECHEs FERMENTADAS*, hago entrega del ejemplar y de sus anexos de ser el caso, en formato digital o electrónico (CD-ROM) y autorizo a la **UNIVERSIDAD DE LOS LLANOS**, para que en los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia, con la finalidad de que se utilice y use en todas sus formas, realice la reproducción, comunicación pública, edición y distribución, en formato impreso y digital, o formato conocido o por conocer de manera total y parcial de mi trabajo de grado o tesis.

**EL AUTOR – ESTUDIANTE**, Como autor, manifiesto que el trabajo de grado o tesis objeto de la presente autorización, es original y se realizó sin violar o usurpar derechos de autor de terceros; por tanto, la obra es de mi exclusiva autoría y poseo la titularidad sobre la misma; en caso de presentarse cualquier reclamación o acción por parte de un tercero en cuanto a los derechos de autor sobre la obra en cuestión, como autor, asumiré toda la responsabilidad, y saldré en defensa de los derechos aquí autorizados, para todos los efectos la Universidad actúa como un tercero de buena fe.

Para constancia, se firma el presente documento en dos (2) ejemplares del mismo valor y tenor en Villavicencio - Meta, a los 30 días del mes de julio de dos mil diecinueve (2019).

**EL AUTOR – ESTUDIANTE**

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Karol Gineth Pardo Pardo

C.C. No. 1.121.929.265