

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
Y METALURGIA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO
DE ANTOCIANINA A PARTIR DE LA GRANADA PARA
ALIMENTOS (Púnica granatum L.)**

Tesis para Obtener el Título de Ingeniera Química

Presentada por:

Bach. Viviana LUDEÑA CAMPOS

Asesor :

Ing. Gabriel Arturo CERRON LEANDRO

Co - Asesor:

Ing. Bernardo ENCISO LÓPEZ

AYACUCHO-PERÚ

2017

DEDICATORIA:

En primer lugar quiero dedicar este trabajo de investigación a Dios
Por darme la fortaleza.

A mis abuelos que me cuidan desde el cielo. Y son los ángeles que
Guían mi camino. A mis padres Cirila y Dionisio, por darme todo su amor y por
siempre creer en mí.

A mi novio Eddi Erik, por su amor y por hacer que este largo camino sea
más fácil.

A todas las personas que estuvieron presentes a lo largo de esta travesía.
A todos ellos gracias, por su amor, comprensión y ayuda.

AGRADECIMIENTO

Al cerrar un capítulo tan importante y trascendente en nuestras vidas, recordamos cuanto hay que agradecer. Han sido muchas las personas que han participado de forma directa e indirecta en este proyecto.

Por ello en primer lugar me gustaría agradecer a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme aceptado ser parte de ella y haberme abierto su seno científico para poder estudiar mi carrera, a mi familia por su paciencia, dedicación y amor, a mis profesores por apoyarme y creer en mí pese a mis errores, a mis amigos del Área control de Calidad por motivarme y apoyarme en los buenos y malos momentos, a la empresa GlobeNatural Internacional S.A. por permitirme realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones, a la Ing. María Isabel, Ing. Jorge Vargas, Ing. Eduardo Báez y a mi asesor Ing. Gabriel Arturo Cerrón Leandro y al Ing. Bernardo Enciso López, por brindarme toda su ayuda y asesoría que fueron parte clave en la culminación de mi tesis.

A todas muchas gracias por ayudarme a hacer de este sueño una realidad.

INDICE GENERAL

	Pág.
CAPITULO I: MARCO TEORICO	1
1.1 ANTECEDENTES	1
1.1.1 Nacionales	1
1.1.2 Internacionales	1
1.2 LA GRANADA (<i>Púnica granatum</i> L.)	2
1.2.1 Taxonomía	2
1.2.2 Etimología	2
1.2.3 Origen y aspectos históricos	2
1.2.4 Generalidades	3
1.2.5 Características de la granada	3
1.2.6 Variedades de granada	6
1.2.7 Composición fisicoquímica de la granada	7
1.2.8 La granada como alimento funcional	8
1.2.9 Granada y salud	9
1.2.10 Producción y comercialización de granada en el Perú	10
1.3 ANTOCIANINAS	11
1.3.1 Estructura química	11
1.3.2 Antocianina de la granada	12
1.3.3 Factores que afectan la estructura de las antocianinas	13
1.3.4 Compuestos fenólicos	15
1.4 LOS COLORANTES	18
1.4.1 Clasificación de los colorantes	19
1.4.2 Problemas en la utilización de colorantes sintéticos	18

1.4.3	Colorante de la granada	19
1.4.4	Medida de color	19
1.4.5	Degradación de color	21
1.5	EXTRACCIÓN DE COLORANTE	22
1.5.1	Factores que afectan la extracción	23
1.5.2	Secado por atomización	24
1.5.3	Envasado	24
1.6	ANTIOXIDANTE	25
1.6.1	Beneficios de los antioxidantes	26
1.6.2	Actividad antioxidante	27
1.6.3	Propiedades anticancerígenas y antitumorales	27
1.7	MERCADOS	28
CAPITULO II: MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES		30
2.1	MATERIA PRIMA	30
2.1.1	Variedad empleada	30
2.1.2	Muestreo	31
2.1.3	Caracterización de la materia prima	32
2.2	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	32
2.2.1	Materiales	32
2.2.2	Reactivos	33
2.2.3	Equipos	33
2.3	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA ANTOCIANINA	34
2.3.1	Lavado de materia prima	35
2.3.2	Troceado	35
2.3.3	Desgranado	36

2.3.4	Triturado	36
2.3.5	Extracción	36
2.3.6	Filtración	37
2.3.7	Concentración del extracto	38
2.3.8	Lavado	39
2.3.9	Extracción alcohólica	39
2.4	ESTUDIO DE DEGRADACIÓN TÉRMICA	39
2.5	ESTUDIO DE DEGRADACIÓN POR ALMACENAMIENTO	40
2.6	APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	40
2.7	CARACTERIZACIÓN ANALÍTICAS	41
2.7.1	Sólidos solubles	41
2.7.2	pH	41
2.7.3	Concentración de antocianina	41
2.7.4	Perfil de antocianina	43
2.7.5	Rendimiento de extracto de antocianinas totales	43
2.7.6	Degradación de antocianina	44
	CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1	RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	45
3.1.1	Variables en la extracción	45
3.1.2	Aplicación de los parámetros óptimos	47
3.2	ESTUDIO DE DEGRADACIÓN TÉRMICA	49
3.3	ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE ANTOCIANINA DURANTE EL ALMACENAMIENTO	50
3.3.1	Método espectrofotométrico	50
3.3.2	Método colorimétrico	54

3.3.3	Método visual	56
3.4	APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINA EN LA INDUSTRIAALIMENTARIA	57
3.4.1	Aplicación en agua	57
3.4.2	Aplicación en gaseosa	58
3.4.3	Aplicación en yogurt	59
3.4.4	Aplicación en masa de azúcar	59
3.5	CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTO FINAL	60
CAPITULO IV: PROPUESTAS DEL PROCESO PRODUCTIVO		61
4.1	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO SELECCIONADO	61
4.2	DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO	62
4.1	FLUJOGRAMA DE BALANCE DE MATERIA	63
CONCLUSIONES		64
RECOMENDACIONES		65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		66
ANEXOS		71
Anexo 1. Certificado de análisis		72
Anexo 2. Especificación técnica		73
Anexo 3. Análisis Solventes residuales		74
Anexo 4. Análisis Metales pesados		75
Anexo 5. Análisis Sulfitos		76
Anexo 6.Reglamentode unión europea - Antocianinas		77

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1.1 Composición fisicoquímica de la granada	5
Tabla N° 1.2 Granada, estimación de la producción y distribución Mundial 2011 / 2012, en TM.	29
Tabla N° 2.1 Variables estudiadas de extracción sólido-líquido de antocianina	37
Tabla N° 3.1 Variables para optimizar la extracción acuosa	45
Tabla N° 3.2 Resultados de aplicación de variables óptimos	47
Tabla N° 3.3 Parámetros para extracción de antocianinas de granada	48
Tabla N° 3.4 Degradación térmica de antocianinas	49
Tabla N° 3.5 Lectura inicial espectrofotométrico (t = 0)	51
Tabla N° 3.6 Lectura espectrofotométrica (t = 0,5 mes)	51
Tabla N° 3.7 Lectura espectrofotométrica (t = 1 mes)	52
Tabla N° 3.8 Lectura espectrofotométrica (t = 6 meses)	53
Tabla N° 3.9 Lectura espectrofotométrica (t = 1 año)	54
Tabla N° 4.1 Resultados de la extracción de antocianinas de granada	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 La granada y sus diferentes partes	7
Figura 1.2 Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas	12
Figura 1.3 Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH	14
Figura 1.4 Compuestos del ácido fenólico	15
Figura 1.5 Compuestos flavonoides	16
Figura 1.6 Estructura molecular de la punicalagina	16
Figura 1.7 Estructura molecular de la punicalina	17
Figura 1.8 Estructura molecular de la pedunculagina	17
Figura 1.9 Clasificación de los colorantes	18
Figura 1.10 Diagrama cromático (proyectacolor, 2011)	20
Figura 2.1 Granada de la variedad Elche Mollar	31
Figura 2.2 Cultivo de granada de la variedad Elche Mollar, pisco – Ica	31
Figura 2.3 Transporte de las granadas	32
Figura 2.4 Diagrama de flujo de obtención de los extractos de antocianina	34
Figura 2.5 Granada de la variedad Elche Mollar seleccionadas y lavadas	35
Figura 2.6 Granada de la variedad Elche Mollar troceadas	35
Figura 2.7 Granada de la variedad Elche Mollar desgranadas y el residuo	36
Figura 2.8 Extracto acuoso y residuo después de la filtración	38
Figura 2.9 Concentración del extracto	38
Figura 2.10 Extracción alcohólica de antocianinas	39
Figura 3.1 Variables para optimizar la extracción acuosa	46
Figura 3.2 Resultados de aplicación de variables óptimas	48
Figura 3.3 Degradación térmica de antocianinas	49
Figura 3.4 Lectura inicial espectrofotométrico (t = 0)	51

Figura 3.5 Lectura espectrofotométrico (t = 0,5 mes)	52
Figura 3.6 Lectura espectrofotométrico (t = 1,0 mes)	52
Figura 3.7 Lectura espectrofotométrico (t = 6 meses)	53
Figura 3.8 Lectura espectrofotométrico (t = 1 año)	54
Figura 3.9 Lectura en sistema CIELAB degradación de antocianina	55
Figura 3.10 Evaluado en forma visual degradación de antocianina	56
Figura 3.11 Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en agua	57
Figura 3.12 Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en agua	57
Figura 3.13 Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en gaseosa	58
Figura 3.14 Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en gaseosa	58
Figura 3.15 Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en yogurt	59
Figura 3.16 Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en yogurt	59
Figura 3.17 Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en masa de azúcar	59
Figura 3.18 Lectura sistema CIELAB de aplicación en masa de azúcar	60
Figura 4.1 Obtención de los extractos de antocianina	62
Figura 4.1 Flujograma de balance de materia	63

RESUMEN

Actualmente existe interés en las antocianinas debido a sus beneficios potenciales para la salud por su actividad antioxidante y su utilización como colorante natural en la industria alimentaria. Se pueden extraer de vegetales y frutas, como por ejemplo las granadas.

En este trabajo de tesis se investigó el estudio del proceso de obtención de antocianinas a partir de granada y el uso de los extractos obtenidos en un producto alimentario.

En primer lugar, se determinó la influencia de las principales variables de proceso en la obtención de antocianinas de granada: temperatura, pH y tiempo de extracción, en medio acuoso como solvente, manteniendo una relación granada/solvente 3:1 kg/kg. Los valores óptimos para las variables de proceso fueron: pH 2.3, temperatura 60 ± 1 °C y tiempo de extracción 20 min (tiempo más pequeño de los ensayos). En estas condiciones el rendimiento fue de 70,36%(extracto acuoso). Valores superiores e inferiores de dichas variables de proceso resultaron en un menor rendimiento.

La disminución del rendimiento con el incremento de pH y temperatura, se debe a una degradación del catión flavilio, ya que éste es deficiente en electrones dando lugar a formación de chalcona bastante inestable.

A partir de las condiciones óptimas se obtuvieron extractos acuosos de antocianina, que fueron concentrados en una columna de intercambio iónico, los productos de la concentración se denominaron extracto de antocianina concentrada, el cual una parte de éste se procedió a atomizar, obteniéndose un producto final en polvo.

Posteriormente, la otra parte se realizó un estudio de degradación de las antocianinas presentes en el extracto concentrado. Por un lado, se determinó la sensibilidad de los extractos al calentamiento a diferentes temperaturas de tratamiento (65, 75,85 y 90 °C). Por otro lado, se estudió también la degradación por el tiempo de almacenamiento a tres temperaturas (10, 23 y 35 °C). A partir de los resultados experimentales obtenidos, se observó que la degradación de

antocianinas en el extracto concentrado aumento con el incremento de la temperatura tanto en las experiencias de calentamiento como en las de almacenamiento distorsionando de perfil. Por ello, para su uso industrial, se debe considerar que lo más conveniente al utilizar estos extractos en productos que si requieren un tratamiento térmico, las temperaturas y los tiempos de tratamiento sean lo más reducidos posible. En caso de tener que almacenar los extractos, la temperatura a utilizar debería ser de 5 - 10°C para que la degradación de estos pigmentos-antioxidantes fuera lo más baja posible.

En conclusión, respecto al método de extracción, la extracción sólido líquido fue la más adecuada debido a la mayor sencillez y rapidez del proceso, rendimiento más elevado y mayor estabilidad de las antocianinas.

Posteriormente, al "extracto obtenido" en las condiciones óptimas (extracción sólido- líquido), se utilizó para la aplicación en agua, gaseosa, yogurt, leche y masa de azúcar.

A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis, se considera que podría ser viable tecnológicamente el desarrollo de alimentos funcionales mediante la aplicación de extracto de antocianina procedente de granada mediante la técnica de esta manera se conseguiría dar una salida a los excedentes de granada fresco y además desarrollar nuevos productos con características funcionales.

INTRODUCCION

Este trabajo está enfocado al aprovechamiento integral del fruto de la planta de granada ya que se extrae el colorante de los frutos. La importancia del colorante de la granada se debe a que contiene antocianinas, las mismas que son consideradas un importante antioxidante y puede ser utilizado como un aditivo natural para alimentos.

En la gran mayoría de las ocasiones para caminar hacia nuestro futuro es necesario mirar primero hacia nuestro pasado. Un ejemplo claro es la granada, uno de los primeros cultivos que domesticó el hombre y que su presencia en la cultura e historia españolas se hace patente incluso en escudos heráldicos como el del Reino de Granada en la época de los reyes católicos.

En la actualidad, este fruto ha cobrado importancia mundial por sus propiedades antioxidantes, mismas que le confieren propiedades farmacológicas anti-cancerígenas, antitumorales, antimicrobianas, antidiarreicas, hepatoprotectivas y para el control de enfermedades renales.

En la extracción sólido-líquido de la antocianina de granada se obtuvo y caracterizó los pigmentos antociánicos de los frutos de la Granada (*Púnica granatum L.*) para el uso como colorante de alimentos.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Problema General

¿Se puede obtener antocianina a partir de la granada (*Punica granatum*), y establecer qué características presentarán los colorantes antociánicos en la evaluación de su uso en alimentos?

Problemas específicos

1. ¿Cuáles serán los parámetros para la obtención de extracto de antocianina a partir de la granada (*Púnica granatum*)?
2. ¿Qué cantidad de colorantes antociánicos poseen los frutos de Granada (*Púnica granatum*)?
3. ¿Qué degradaciones presentaran las antocianinas presentes en el extracto obtenido con respecto a la temperatura?
4. ¿Qué características fisicoquímicas presentaran las antocianinas de granada, en los productos industriales según el reglamento (UE) N° 231/2012, COMISIÓN EUROPEA?
5. ¿Qué alteraciones organolépticas presentaran los alimentos coloreados con antociánicos de Granada (*Púnica granatum*)?

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtención y caracterización de los colorantes antociánicos de los frutos de la Granada (*Púnica granatum*) para el uso como colorante de alimentos.

Objetivos Específicos

1. Determinar los parámetros del proceso de obtención de antocianina a partir de la granada (*Púnica granatum*).
2. Determinar la cantidad de colorantes antociánicos de la granada (*Púnica granatum*).
3. Estudiar la degradación de antocianina presente en el extracto obtenido en función de la temperatura.
4. Determinar las características fisicoquímicas de las antocianinas de granada en los productos industriales según el reglamento (UE) N° 231/2012, COMISIÓN EUROPEA.
5. Determinar las alteraciones organolépticas presentes en los alimentos coloreados con pigmentos antociánicos de Granada (*Púnica granatum*).

JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Este trabajo de investigación proporciona un información teórico y experimental acerca de sobre las propiedades y ventajas de la granada como materia prima para la obtención de una colorante natural para alimentos. La granada contiene importantes antioxidantes gracias a su alto contenido natural en minerales, vitaminas y fito-químicos.

Las antocianinas de la granada contiene vitaminas, A, C, D, E, K, B1 (tiamina), B2 (riboflavina) y niacina. Es importante fuente mineral de potasio, fósforo, hierro, azufre, silicio, cinc y calcio. Contiene además ácido cítrico, málico, pelágico, punícico y omega 5. También diferentes polifenoles, con una gran capacidad capadora de radicales libres, como la punicalagina. Y un alto porcentaje de antocianinas, que le otorgan el característico color rojo.

Con esta tesis se busca dar valor agregado, a un producto que no tiene un valor comercial relativamente bajo en la actualidad, dando oportunidad a los que cultivan esta fruta, mejorar sus ingresos económicos y calidad de vida.

Por otro lado, la necesidad de buscar nuevas fuentes de generación de recursos económicos es urgente para ayudar a la población especialmente de los sectores rurales del país a salir de la pobreza en la que se encuentran.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Nacionales

En la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, el 2015 se ha desarrollado una tesis de prefactibilidad para obtener antocianinas a partir del maíz morado.

PÉREZ SAUÑI, Hugo Fernando (2014), en la tesis “Utilización de la antocianina del maíz morado (*Zea mays L.*) y stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en la elaboración de un producto tipo mermelada y su aceptabilidad, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú”, tiene como objetivo utilizar la antocianina extraída para la elaboración de un producto tipo mermelada y su aceptabilidad.

1.1.2 Internacionales

MARINA ZAPATA, Luz (2014), Tesis Doctoral “Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria”, presentado en la Universidad Politécnica de Valencia, España”, tiene como objetivos el estudio del proceso de extracción de antocianinas y el uso de los extractos obtenidos en un producto alimentario.

HERAS I., ALVIS A., ARRAZOLA G. (2013), “Optimización del proceso de extracción de antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (*Solana melonera L.*)”, Universidad de Córdoba, Colombia, tuvo como

objetivos de esta investigación optimizar el proceso de extracción de antocianinas obtenidas de berenjena (*Solanum melongena L.*), y evaluar su capacidad antioxidante.

1.2 LA GRANADA (*Púnica granatum L.*)

1.2.1 Taxonomía

Reino : *Plantae*
División : *Magnoliophyta*
Clase : *Magnoliopsida*
Orden : *Myrtales*
Familia : *Lythraceae*
Subfamilia: *Punicoideae*
Género : *Púnica*
Especie : *Púnica granatum*

1.2.2 Etimología

El nombre genérico *Púnica*, proviene del latín *Punicum* y alude a los fenicios, activos impulsores de su cultivo, mientras que *granatum*, el epíteto específico, deriva del adjetivo latino *granatus*, que significa “con abundantes granos”. En la antigua Roma se denominaba al granado como *Punicum arbos* (árbol *púnico*), y al fruto como *Malum granatum* (manzana granada), *Opunicum Malum* (manzana *púnica*).

1.2.3 Origen y Aspectos Históricos

Este árbol es originario de la región que abarca desde Irán hasta el norte de los Himalayas en la India, fue cultivado y naturalizado en toda la región del Mediterráneo incluida Armenia, desde la antigüedad. Muy apreciado en las zonas desérticas, ya que está protegido de la desecación por su piel gruesa y coriácea, lo que permitía que las caravanas pudieran transportar su fruta grandes distancias, conservando sus apreciadas cualidades. Testimonios de su consumo se recogen en todos los documentos antiguos.

Hipócrates recomendaba el jugo de la granada contra la fiebre y como fortificante contra la enfermedad. Los antiguos egipcios eran enterrados con granadas. Los babilonios creían que masticar sus granos antes de las batallas los hacía invencibles. Los romanos conocieron la granada gracias a los fenicios que la trajeron de Fenicia (aproximadamente en el actual Líbano) a Roma, de ahí su nombre científico de *Púnica*. La Biblia hace referencia en numerosas ocasiones a este fruto, y siempre en su defensa.

Por tener la granada gran cantidad de pepitas, era considerada en la antigüedad como un símbolo de fertilidad y fecundidad. Era atributo de Hera, Deméter y Afrodita. En Roma era habitual que las novias llevaran un tocado de ramas de granado. Tiene especial relevancia en el mito de Perséfone y Hades.

La granada forma parte del escudo de la ciudad de Tacna, al sur del Perú. Desde 1492 una granada forma parte del escudo de España. También del de Colombia. Son los únicos estados del mundo con una granada en sus emblemas nacionales. Granada, antigua capital del Reino Nazarí de Granada en la Edad Media, es el nombre de la actual ciudad española, así como de su provincia. Su fruto está incluido en el escudo de armas de la ciudad. (Lansky y Newman, 2007).

1.2.4 Generalidades

El fruto fue traído a América por misioneros españoles durante la conquista y logro adaptarse en algunas zonas principalmente cálidas y áridas de Estados Unidos y México.

El árbol, denominado granado generalmente se adapta a climas de tipo mediterráneo, generando un fruto sumamente jugoso. Es un arbusto de follaje abundante que posee tronco de ramas torcidas y levemente espinosas. Las hojas son color verde, alargadas, con superficie lisa y brillante, levemente onduladas.

Las flor es acampanada y lustrosas conformada por 5 a 8 pétalos color naranja brillante (Morton, 1987).

1.2.5 Características de la granada

La granada es una fruta ligera, con contenido moderado en calorías y un contenido en agua es muy alto, puesto que supera el 80 % de su peso.

A) Macronutrientes de la granada

- **Carbohidratos de la granada:**

A nivel de macronutrientes, mayormente está constituida por carbohidratos, en concreto azúcares. Sin embargo, como tiene un menor contenido en azúcares que la mayoría de las frutas, puede ser de ayuda en dietas para adelgazar.

- **Proteínas y Grasas de la granada:**

Tiene un contenido bajo tanto en proteínas como en grasas.

- **Fibra:**

Por su contenido en fibra, podría pensarse que la granada resulta ideal para el tratamiento del estreñimiento, sin embargo debemos pensar que el nivel de taninos de esta fruta es muy elevado por lo que es una fruta más bien adecuada para las personas con diarrea.

B) Micronutriente de la granada

A nivel de micronutrientes, tiene especial relevancia su contenido en potasio, vitamina C, vitamina A, vitamina B9 y Minerales.

Por su contenido en potasio, interviene en las transmisiones nerviosas del sistema nervioso y muscular, y en la regulación del equilibrio hídrico de las células, para que se mantenga correctamente.

Por su contenido en vitaminas C, tiene propiedades cicatrizantes para los tejidos, ayuda a las defensas, además de ayudar a mantener cartílagos y el colágeno.

Por su contenido en vitamina A, tiene propiedades reparadoras cicatrizantes para los tejidos, ayuda a las defensas, además de ayudar a mantener cartílagos y el colágeno.

Por su contenido en vitamina B9, ayuda a un buen crecimiento y desarrollo del cuerpo. También contiene otros minerales como calcio fosforo, magnesio, selenio, zinc, cobre, hierro, sodio, vitaminas del grupo B y vitaminas E, pero en menor proporción los cuales se muestra en la tabla N° 1.1.

Tabla N° 1.1: Composición fisicoquímica de la granada

Nutriente	Unidades	Valor por 100g
Proximal		
Agua	g	77,93
Energia	kcal	83
Proteina	g	1,67
Lipidos totales (grasa)	g	1,17
Cenizas	g	0,53
Carbohidratos (por diferencia)	g	18,7
Fibra dietaria total	g	4
Azucar totales	g	13,67
Minerales		
Calcio	mg	10
Hierro	mg	0,3
Magnesio	mg	12
Fosforo	mg	36
Potasio	mg	236
Sodio	mg	3
Zinc	mg	0,35
Cobre	mg	0,158
Manganeso	mg	0,119
Selenio	mcg	0,5
Vitaminas		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	10,2
Tiamina	mg	0,067
Riboflavina	mg	0,053
Niacina	mg	0,293
Acido pantoténico	mg	0,377
Vitamina B-6	mg	0,075
Folato total	mcg	38
Colina total	mg	7,6
Vitamina E, alfa-tocoferol	mg	0,6
Vitamina K	mg	10,4
Lipidos		
Ácidos grasos saturados	g	0,12
Ácidos grasos monosaturado	g	0,093
Ácidos grasos polisaturado	g	0,079

Fuente: USDA (2009)

1.2.6 Variedades de la granada

Según Taipe (2012), indica que las variedades de granada cultivadas en el Perú son las siguientes:

a) Wonderfull – California

Es la variedad más cultivada y exportada en el Perú, es un árbol de tamaño mediano, fruto grande (promedio 500 g), su madurez se da en la primera semana de abril, el color de los arilos es rojo oscuro con un alto contenido de jugo, su sabor es agridulce y tiene un alto rendimiento por encima de las 40 TM/ha.

b) Mollar de Elche

Es un árbol de tamaño mediano así como su fruto (400 g), su madurez en el Perú se da la segunda semana de marzo, el color de los arilos es rojo oscuro y su tamaño es mediano, su sabor es dulce y el periodo de almacenamiento es corto.

c) Acco & Shani

Es un árbol de tamaño mediano con un fruto de tamaño medio (300 g) madura, en el Perú, la segunda semana de febrero, tiene arilos de color rojo, tamaño mediano y sabor dulce y es segunda variedad más cultivada en el Perú.

d) Emeq

Es un árbol de tamaño mediano y fruto medio (400 g), su madurez en el Perú se da la segunda semana de Enero, tiene arilos de color rojo, tamaño mediano y sabor dulce, tiene un rendimiento de 30 TM/ha.

e) Kamel

Es un árbol de tamaño grande y fruto mediano (300 g), su madurez se da en la segunda semana de marzo, posee arilos de color rojo intenso, tamaño mediano y sabor dulce, tiene un rendimiento de 30 – 40 TM/ha.

f) Purple

Es un árbol de tamaño pequeño, fruto de tamaño medio (300 g), su madurez se da segunda semana de mayo, la corteza es de color negro purpura, posee arilos

de color rojo púrpura, tamaño mediano y sabor dulce, el rendimiento es de 30 TM/ha.

1.2.7 Composición Fisicoquímica de la granada.

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes como corteza, membranas carpelares, arilos y semillas. El producto más importante derivado de la granada es el zumo, sin duda el producto más estudiado con multitud de referencias en la literatura científica tanto española como internacional.



Fuente: (Sanchez C., Carbonell A. 2011)

Figura Nº 1.1: La granada y sus diferentes partes

Alrededor del 50 % del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas carpelares, que son una fuente importantísima de compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas y minerales principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio. Por lo que, los productos nutracéuticos y condimentos alimentarios elaborados a partir de extractos de corteza y membranas carpelares pueden ser una fuente importante de todos estos compuestos, si se han procesado de modo correcto.

La parte comestible de la granada representa alrededor del 50 % del peso total de una granada y a su vez consiste en un 80 % de arilo (parte carnosa) y un 20

% de semilla (parte leñosa). La composición de los granos de granada es la siguiente: agua (85 %); azúcares (10 %), principalmente fructosa y glucosa; ácidos orgánicos (1,5 %), principalmente ácido ascórbico, cítrico y málico; compuestos bio-activos tales como polifenoles y flavonoides (principalmente antocianinas).

Los granos de granada son una fuente importante de lípidos, ya que las semillas contienen una cantidad de ácidos grasos que oscilan entre el 12 y el 20 % de su peso total (peso seco).

1.2.8 La Granada como Alimento Funcional

El concepto de alimento funcional es complejo y puede referirse tanto a si sus componentes son o no nutrientes, si afectan o no de manera positiva sobre el organismo, o si promueven un efecto fisiológico o psicológico más allá del meramente nutricional (Andreu Sevilla, 2008)

Entre los alimentos funcionales destacan:

- Los que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimentaria.
- Los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como fitoquímicos u otros antioxidantes,
- Los probióticos que contienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos.

Según lo expuesto y los diversos estudios realizados sobre la composición química de la granada y más recientemente acerca de sus efectos sobre la salud, podemos considerar a la granada como un alimento funcional (Melgarejo P. 2010).

Los antocianos son los compuestos considerados responsables del color rojo de las granadas; la importancia de estos compuestos fenólicos radica en su acción antioxidante que protege frente a los radicales libres y retrasa el proceso de envejecimiento de las células. La actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides ha sido demostrada en distintos estudios. Se estima que un 10 % de la capacidad antioxidante del zumo de granada se debe a la presencia de estos polifenoles, los antocianos (Melgarejo P. 2010).

La capacidad antioxidante del zumo de granada es tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde (Melgarejo P. 2010).

Resulta de gran importancia la composición en ácidos grasos esenciales (linolénico y araquidónico) y especialmente por su contenido en ácidos grasos poli-insaturados. Los ácidos grasos poli-insaturados juegan un papel muy importante como compuestos preventivos de enfermedades cardiovasculares y de algunos otros problemas de corazón, debido a que este tipo de ácidos grasos reducen considerablemente los niveles de LDL colesterol (colesterol malo).

El ácido púnico tiene efectos anti-aterogénicos. Los elagitaninos pueden ser transformados en urolatinas; la urolatina A podría ser el compuesto anti-inflamatorio más activo relacionado con de la ingesta de granada. En el colon los procesos anti-inflamatorios podrían deberse a la fracción no metabolizada de los elagitaninos (Gil MI, Tomas Barberan, 2000).

La punicalagina es el polifenol de mayor peso molecular conocido, que se hidroliza en ácido elágico y se metaboliza en el tracto intestinal generándose urolitinas. Las punicalaginas son los compuestos que presentan mayor capacidad antioxidante o captadora de radicales libres y son responsables de aproximadamente el 50 % de esta actividad en el zumo de granada, seguida de otros taninos hidrolizables (33 % de la actividad total), y en menor medida del ácido elágico (3 %) (Gil M.I, Tomas Barberan, 2000).

Las principales propiedades funcionales de las punicalaginas son.(Sánchez C., Carbonell A., 2011).

- Poderoso efecto antioxidante.
- Actividad anticancerígena.
- Efecto protector del sistema cardiovascular.

1.2.9 Granada y Salud

La granada (*Púnica granatum* L.), fruto antiguo, místico y distintivo, fue alabado en la antigüedad en diferentes escritos tales como la Biblia, el Torá judío y el Talmud de Babilonia como una fruta sagrada con poderes sobre la fertilidad, la abundancia y la buena suerte. También destaca en ciertas ceremonias, arte y

mitología de los egipcios y los griegos y fue el emblema personal del emperador romano Máximo.

Además de estos usos históricos, la granada se utiliza en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades en distintos tipos de medicina. La medicina Ayurveda (medicina hindú) considera la granada como un fármaco adecuado para el tratamiento de parásitos, diarrea, úlceras y considera que tiene carácter depurativo. La granada sirve también como remedio para la diabetes en la medicina Unani que se practica en la India. El enorme interés que existe en la actualidad sobre las bondades medicinales y nutricionales de la granada comenzó en el año 2000 y desde ese momento se han generado más de 200 referencias en las que se describen los efectos beneficiosos sobre la salud de la granada y sus productos derivados. Sin embargo, en el periodo desde 1950 a 1999 sólo se generaron unas 25 publicaciones científicas sobre esta temática.

1.2.10 Producción y comercialización de granada en Perú

La agro-exportación peruana cuenta desde el 2013 con un nuevo gremio, Pro-Granada, una asociación de productores y exportadores de granada, creado con el fin de impulsar la producción y comercialización de esta fruta en los mayores mercados del mundo.

El Perú tiene actualmente unas 1,500 hectáreas de granados con un rendimiento de 30 a 40 kg/árbol en plena producción, si bien en años anteriores las áreas crecían constantemente, se ha notado una desaceleración como consecuencia de la falta de nuevos mercados hacia donde exportar la fruta. Es más, la producción actual está llegando a saturar los mercados existentes (Europa y Medio Oriente) al punto que, en los próximos dos años, los precios colapsarían si no se abren nuevos destinos.

El Perú exportó en la campaña del 2013 más de US\$ 16 millones de dólares y las proyecciones de crecimiento para los próximos años son enormes, tanto por la creación de su propio gremio como por los avances tecnológicos y nuevas variedades tempranas que se explotarán.

En el 2007 se exportó US\$ 1,1 millón, US\$ 11,6 millones en el 2011, lo que representó un crecimiento promedio de 80% anual en ese período.

Se prevé que al cierre del 2016 las exportaciones de Granada lleguen a US\$ 45 millones anuales.

1.3 ANTOCIANINAS

Las antocianinas son colorantes con características químicas de glucósidos.

Generalmente, son de color rojo, rosado, azul y violeta, solubles en agua y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, formadas por una molécula de antocianidina (aglucón) que se une a una fracción de carbohidrato a través de un enlace glucosídico (Zeiger et al., 2006).

Las antocianidinas más importantes son la pelargonidina, la cianidina, la delphinidina, la peonidina, la petunidina y la malvidina. Generalmente una misma antocianidina forma interacciones diferentes clases de carbohidratos para formar diferentes antocianinas (Fennema, 1985).

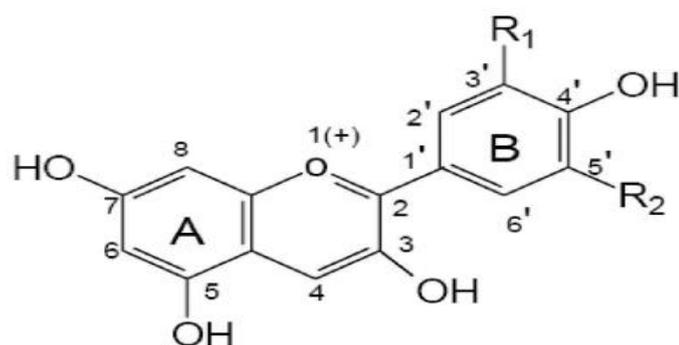
El color de las antocianinas depende de la cantidad de grupos hidroxilo (-OH) y metoxilo (-OCH₃) que se encuentran en el anillo B de cada antocianina (Zeiger, 2006), esto se muestra en la figura N° 1.2.

1.3.1 Estructura Química

Las antocianinas son glucósidos, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3C. Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (Figura N° 1.2).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón, 2008).

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad.



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

Figura N° 1.2: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (Durst Wrolstad, 2001).

1.3.2 Antocianina de la Granada

Los antocianos son considerados responsables del color rojo de las granadas y de sus semillas, siendo éste un atributo de calidad importante. El color rojo depende de la concentración en antocianos que éstas contengan y del tipo de antociano. En el granado se han identificado 6 antocianinas (figura 1.2), como los responsables del color del zumo de la granada: delfinidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido; cianidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido (Du *et al.*, 1975). La presencia de estos compuestos fenólicos radica en su acción antioxidante (protegen frente a los radicales libres retrasando el proceso de envejecimiento de las células), aspecto muy estudiado durante los últimos años en gran cantidad de frutos, entre los que se incluye la granada. La actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides ha sido demostrada (Espín *et al.*, 2000), lo que hace que un 10% de la capacidad antioxidante del

zumo de granada se deba a la presencia de estos polifenoles. La capacidad antioxidante del zumo de granada es tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde (Gil et al., 2000).

Estos compuestos también pueden utilizarse como colorantes naturales, adicionándolos a otros alimentos.

1.3.3 Factores que afectan la estructura de las antocianinas

Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas. La estructura de éstas puede verse afectada en cualquier etapa de un proceso tecnológico, como por ejemplo un proceso de extracción de antocianinas de un material vegetal, como así también durante un tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene. A continuación se exponen los factores más relevantes que afectan a la estabilidad de las antocianinas.

A) Efecto del pH

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad. A $\text{pH} < 4$ predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas. A pH entre 4 - 5 se observan las especies pseudobase carbinol que es incolora y por encima de pH 5 vuelven a adquirir colores intensos en la gama de los azules, verdes y amarillos, gracias al predominio de conformaciones neutras o aniónicas con una fuerte conjugación. (Moldovan et al., 2012; Castañeda-Ovando et al., 2009a; Garzón, 2008), como se muestra en la figura N°1.3.

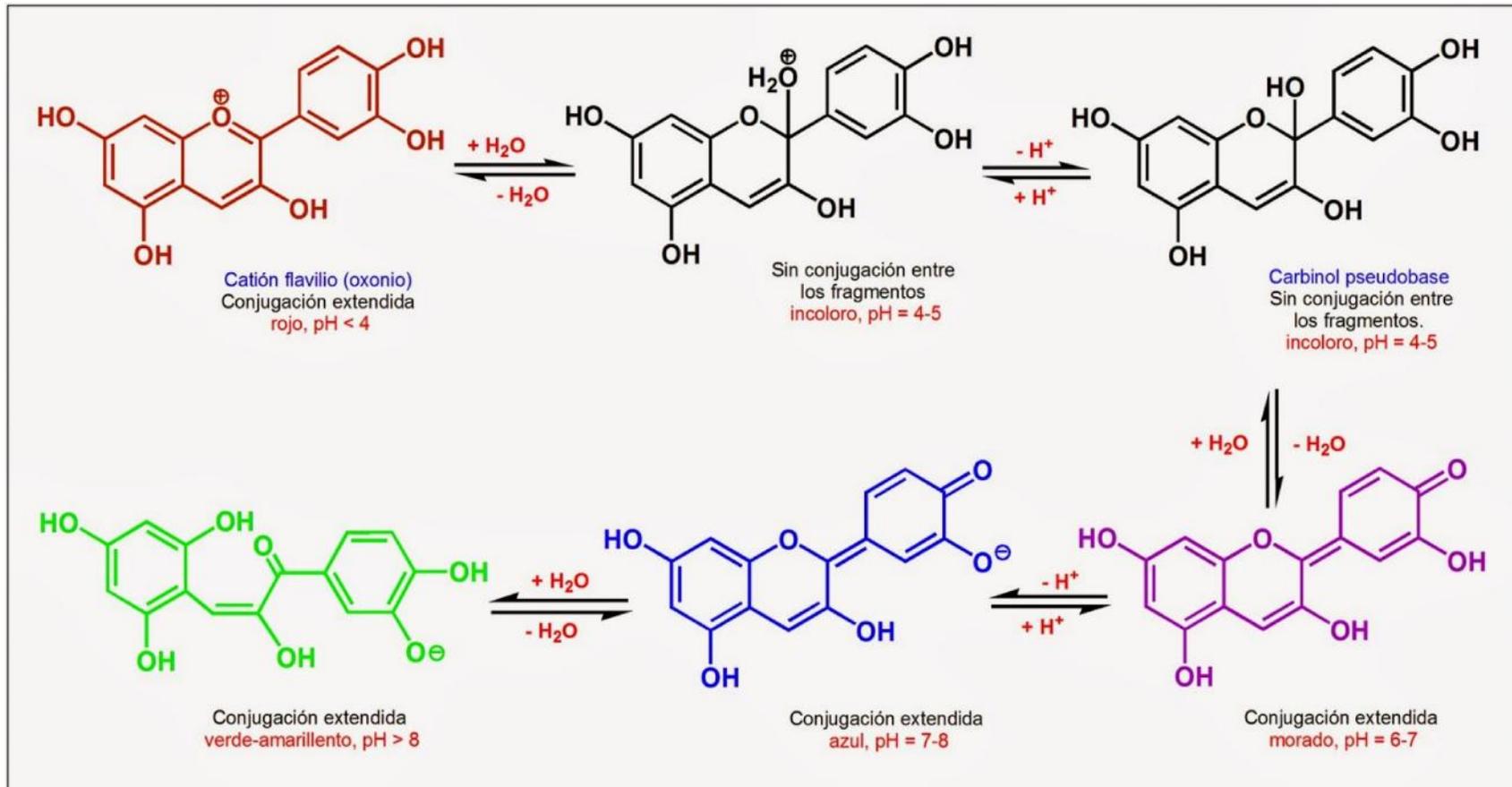


Figura N° 1.3: Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde $R_1 = \text{HO-Glúcido}$, R_2 Y $R_3 = \text{HO-Metilo}$ (Castañeda-Ovando et al., 2009).

B) Efecto de la temperatura

La temperatura es otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas, durante el procesamiento y el almacenamiento las antocianinas son destruidas por efecto del calor (Cuevas et al., 2008). El aumento de la temperatura produce la pérdida de una molécula de azúcar en la posición 3 y como consecuencia la ruptura del anillo y como efecto la formación de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

1.3.4 Compuestos Fenólicos

A) Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

Los compuestos fenólicos se pueden dividir en moléculas simples y polímeros de éstas de mayor peso molecular. Entre los primeros cabe destacar a los flavonoides como los compuestos más importantes de este subgrupo; siendo los antocianos los compuestos más representativos y responsables del color característico de la granada. Dentro de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular destacan los ácidos fenólicos y dentro de ellos el ácido gálico y el ácido elágico, se muestra en figura N°1.4 y 1.5.

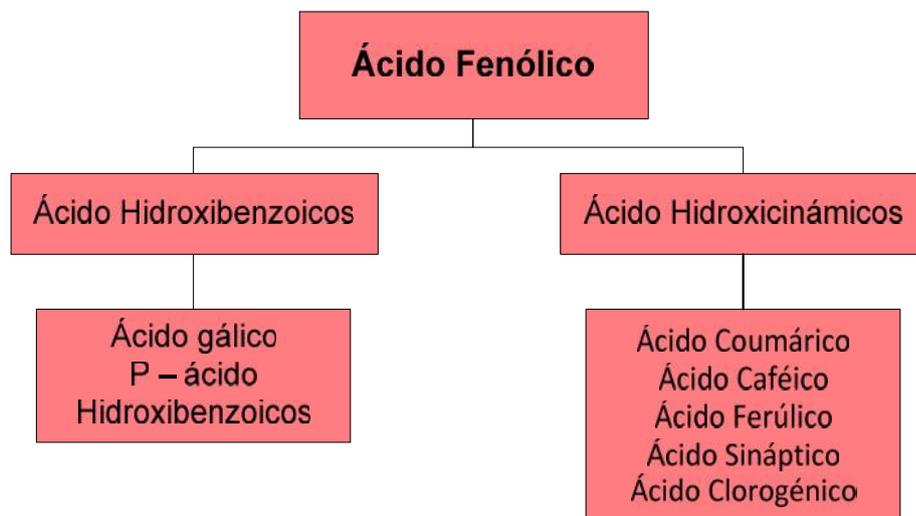
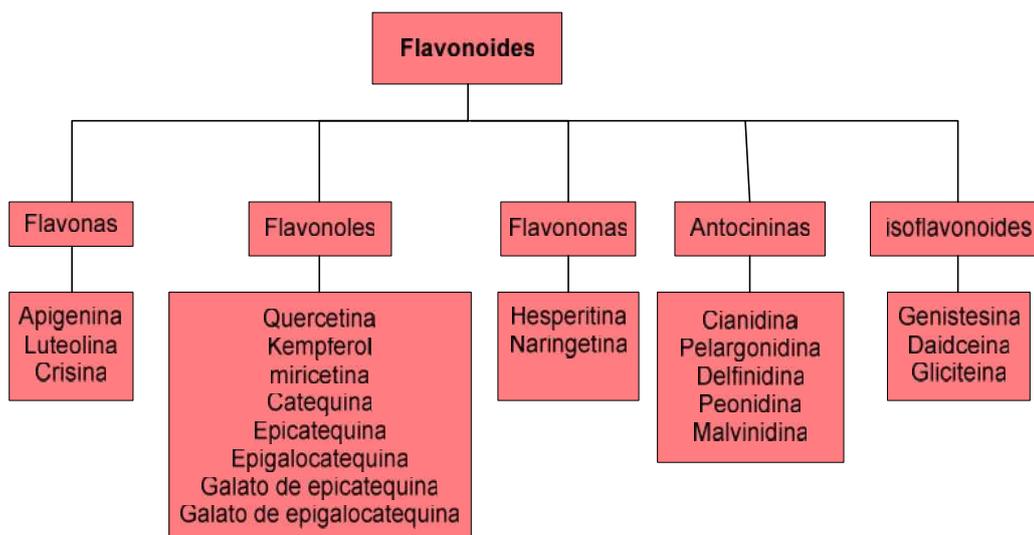


Figura N° 1.4 Compuestos del ácido fenólico.



Fuente: (Sanchez C., Carbonell A. 2011).

Figura N° 1.5 Compuestos flavonoides.

B) Compuestos fenólicos de alto peso molecular

Los taninos son los polifenoles más característicos de alto peso molecular. La piel de granada es rica en taninos hidrolizables, principalmente punicalina, pedunculagina y punicalagina (Satomi H., Umemura K., Ueno A., Hatano T., Okuda T. y Noro T., 1993).

- **Punicalagina:** Las punicalaginas también son el principal componente responsable de la actividad antioxidante del jugo de la granada.

Fórmula molecular: $C_{48}H_{28}O_{30}$. Masa molar: 1084.71 g/mol

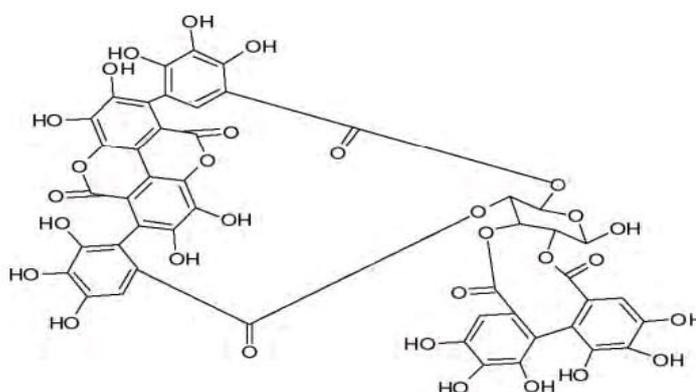


Figura N° 1.6: Estructura molecular de la punicalagina.

- **Punicalina:** La molécula contiene un componente de ácido galagico enlazado a una glucosa.

Fórmula molecular: $C_{34}H_{22}O_{22}$. Masa molar: 782.52 g/mol

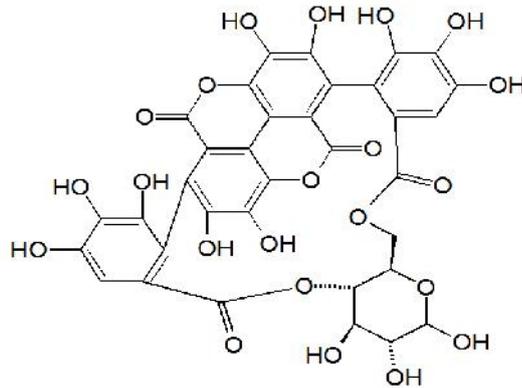


Figura N° 1.7: Estructura molecular de la punicalina.

- **Pedunculagina:** Se puede encontrar en el pericarpio de los granados (*Púnica granatum*). Se trata de altamente activos inhibidores de la anhidrasa carbónica. Es un isómero de Terflavin B. Puede ser sintetizado

Fórmula molecular: $C_{34}H_{24}O_{22}$. Masa molar: 784.54 g/mol

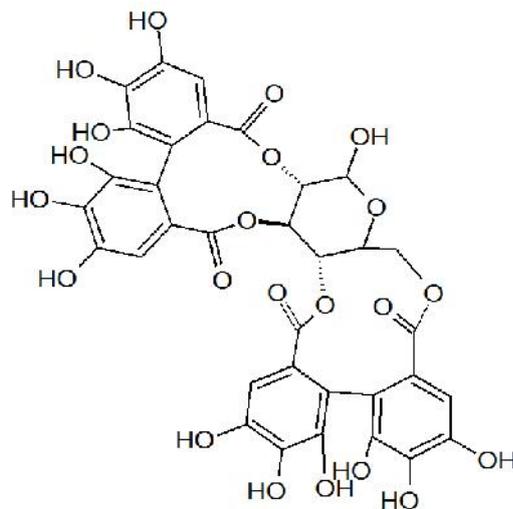


Figura N° 1.8: Estructura molecular de la pedunculagina.

1.4 LOS COLORANTES

1.4.1 Clasificación de los Colorantes

Existen diversas maneras de clasificar a los colorantes, con base en su naturaleza u origen (naturales o artificiales), por su grupo cromóforo (radical que le confiere un determinado color), como se puede ver en la figura N°1.9,(Quintero, 2002).

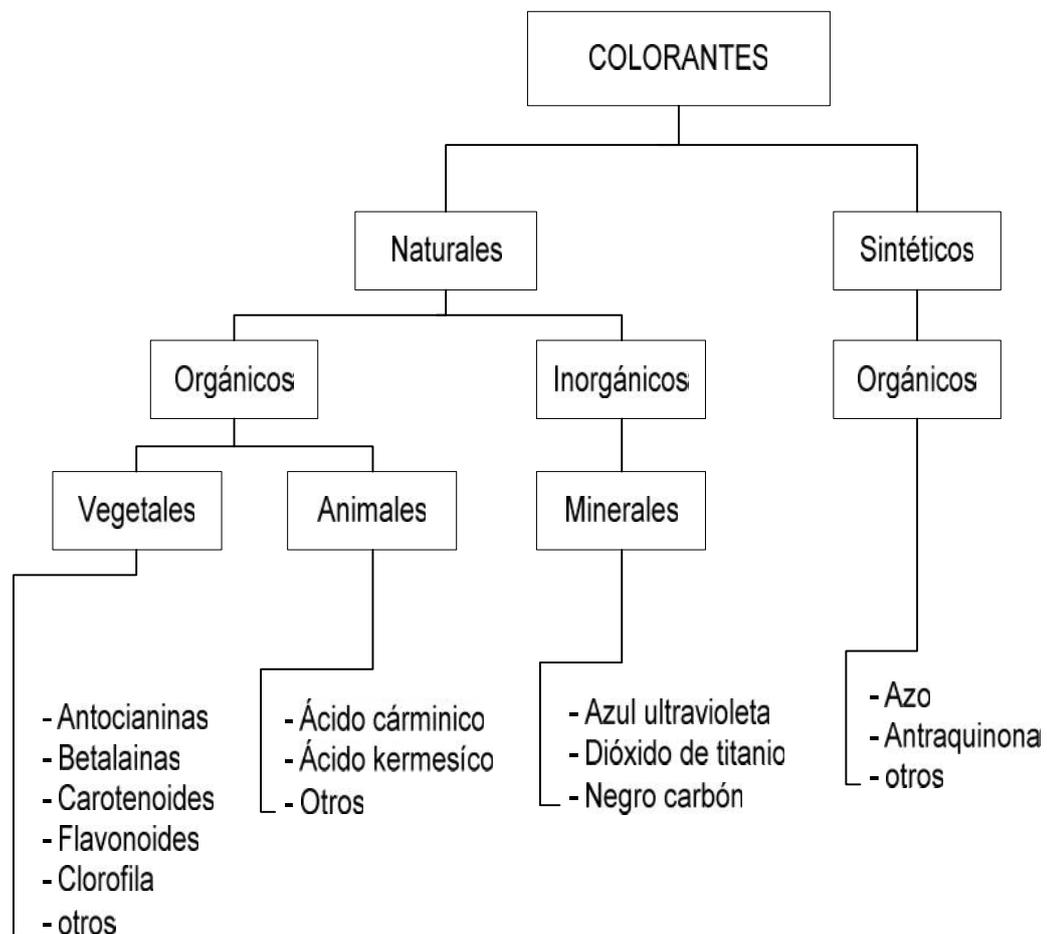


Figura N°1.9: Clasificación de los colorantes (Quintero, 2002)

1.4.2 Problemas en la utilización de colorantes sintéticos

Los colorantes sintéticos presentan diversas ventajas sobre los naturales; sin embargo, muchos causan problemas para la salud. Como ejemplo se puede citar el “amarillo mantequilla”, utilizado hace tiempo para colorear este alimento,

posteriormente se restringió su uso debido a sus efectos carcinogénicos (Grupo Latino, 2007).

En 1906 Bernard Hesse, analizó en Estados Unidos aquellos colorantes utilizados en la industria de los alimentos y encontró que de una lista de 80 diferentes colorantes, 30 de ellos nunca habían sido probados en su seguridad, 26 tuvieron resultados diversos y ocho fueron considerados de alto riesgo para la salud (Corrales, 2001).

La FDA (Food and Drug Administration o Agencia de Drogas y Alimentos), en la Cláusula Delaney de 1958, determinó cierto riesgo de cáncer para algunos colorantes sintéticos, estableciendo que no puede utilizarse ningún tipo de aditivo si se demuestra que al ser ingerido por el hombre o por algún animal induce cáncer.

Por medio de esta cláusula se prohíben los colorantes: Azul N° 6, Rojo N°10, 11, 12, 13, Amarillo N° 1 y por otro lado se prohíben para alimentos: Rojo N°2, Violeta N° 1, Grafito y Anaranjado B (Lisco, 2000).

Actualmente sólo existen nueve colorantes sintéticos aceptados bajo fuerte restricciones en su utilización y de acuerdo con la FDA sólo 8 de éstos pueden ser comercializados (Corrales, 2001).

1.4.3 Colorante de la granada

El granado contiene seis importantes antocianinas delphinidin 3-glucósido (2,19-16,29 mg / L), delphinidin 3,5-diglucósido (2,36-63,07 mg / L), pelargonidina 3-glucósido (0,26-1,36 mg / L), 3,5 - diglucósido de pelargonidina (0,01 - 8,11 mg / L), cianidin - 3 - glucósido (5,78 - 30,38 mg / L) y cianidin - 3,5 - diglucósido (4,39 - 166,32 mg / L). Que son las que le dan el color característico a esta especie vegetal (Alighourchi, H., Barzegar, M. & Abbasi, S, 2008).

La antocianina que se encuentra en mayor proporción (superior al 70 %) es cianidina-3- glucósido, que es importante antioxidante (Cuevas et. al., 2008).

1.4.4 Medida del color

Uno de los sistemas para medir este atributo es el CIELAB, en el que se define un espacio en coordenadas rectangulares (L^* , a^* , b^*) junto con otro en coordenadas cilíndricas (L^* , H^* , C^*), (Jiménez y Gutiérrez, 2001; Calvo y Duran, 2002).

Este sistema tiene base en la teoría de la apreciación de los colores opuestos, esta dice que un color no puede ser amarillo y azul al mismo tiempo ni tampoco puede ser rojo y verde, esto se muestra en la figura N°1.10. (Iñiguez et. al., 1995).

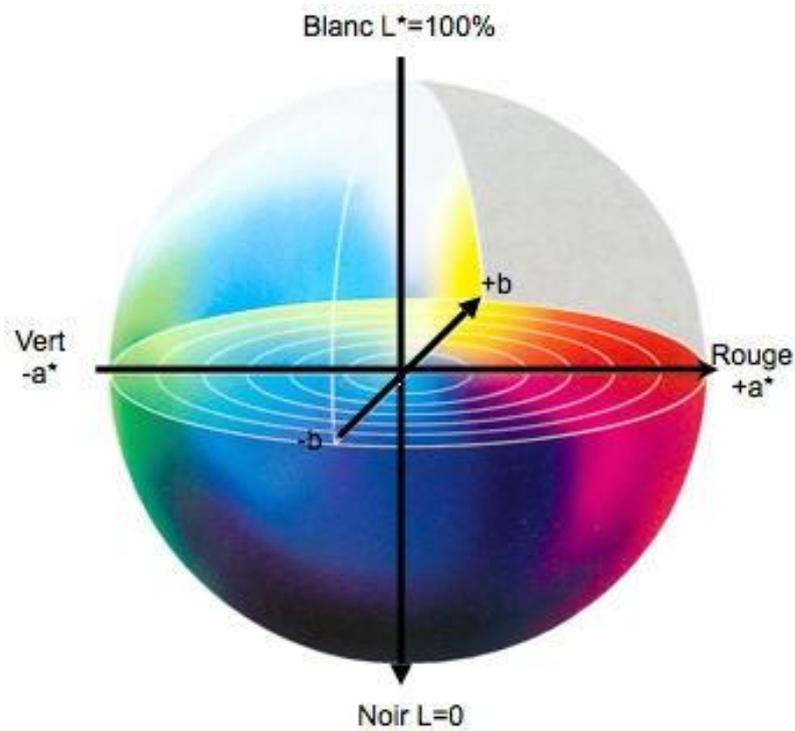


Figura N° 1.10: Diagrama cromático (proyectacolor, 2011)

El sistema CIELAB, trabaja con los valores triestimulo del sistema CIE (Iñiguez et. al., 1995).

Luminosidad (Value): Es considerado como la claridad u oscuridad de un color es decir el brillo que tengan los objetos, es resultado de la cantidad de luz

reflejada por dicho objeto, dicho de otra manera, cuanta luz es reflejada otra vez al ojo (Rosenstiel et. al., 2009).

Matiz (Hue): Es una propiedad que ayudan a clasificar a los colores en azules, verdes, amarillos, rojos, etc., físicamente esta característica tiene relación con la longitud de onda de una luz de espectro continuo (Carrasco, 2002).

Saturación (Chroma): Se considera como la intensidad del color o la cantidad de color puro que está mezclado con blanco. Es la medida en que un matiz está concentrado (Jiménez y Gutiérrez, 2001).

En la figura 1.10, se presenta el diagrama cromático, que simboliza el área donde tienen lugar todos los colores reales según la transformación CIELAB. En la parte central se encuentra el iluminante sobre el cual el eje vertical L^* marca el eje de la luminosidad del color cuyo valor va entre 0 a 100 %, en la mitad de dicho eje se forma un plano horizontal con los valores de las coordenadas a^* y b^* , un valor positivo en la coordenada colorimétrica a^* indica que hay un componente rojo y si es negativo indica que hay un componente verde, si la coordenada b^* es positiva significa que el color tiene componente amarillo mientras que si es negativo el color contiene azul (Íñiguez et. al., 1995).

1.4.5 Degradación de color

Los pigmentos enfrentan un problema, que es la degradación del color, la cual se puede presentar como consecuencia de la exposición a la luz (foto degradación), por acción de la temperatura efecto conocido como oxidación térmica o descomposición térmica. Cuando los alimentos se someten a elevadas temperaturas, el color de los mismos cambia entre tonalidades que van desde un ligero amarillo hasta un intenso café, debido las reacciones de caramelización que se producen en su interior (Badui, 1988).

La degradación de los pigmentos se debe especialmente a reacciones de oxidación las mismas que pueden ser o no enzimáticas. Los colorantes naturales pueden oxidarse estar en contacto con el oxígeno atmosférico, la luz, el calor. El efecto de la temperatura es muy importante, tanto que en ausencia de agua

(productos deshidratados) como en su presencia (productos hidratados), la temperatura siempre acelera la velocidad de la reacción de degradación (Fennema, 2000).

La acción de la luz en los colorantes produce su ruptura y como consecuencia de esto se forman compuestos incoloros de bajo peso molecular. Estas reacciones presentan un efecto significativo en la industria de alimentos, debido a que los colorantes pierden su color característico. Los cambios de pH ya sean a pH ácidos o alcalinos, provocan isomerizaciones de ciertos dobles enlaces, que deben considerarse en la manipulación de pigmentos (Schwartz, 1998).

1.5 EXTRACCION DE COLORANTE

Además de las consideraciones relativas a la estabilidad, debe tenerse en cuenta que el aprovechamiento tecnológico de un producto también depende de su extractabilidad. La extracción de los pigmentos a partir de los tejidos vegetales suele realizarse con solventes orgánicos, Los solventes empleados para el proceso depende de la naturaleza de los pigmentos y su polaridad (Ibarz, 2005).

La extracción sólido-líquido, es una operación unitaria básica que consiste en la separación de uno o varios componentes presentes en una fase sólida, para esto se utiliza una fase líquida o un solvente (Ibarz, 2005).

Para la extracción de pigmentos a partir de los vegetales, se debe tomar en cuenta las siguientes condiciones:

- El rendimiento o recuperación máxima de los colorantes para un óptimo aprovechamiento de la materia prima.
- Concentración de los extractos, lo que incide en el menor gasto de solvente por unidad de peso de la materia prima. También hay que considerar el ahorro en las operaciones de filtración y concentración.
- Baja o nula toxicidad del solvente empleado, para facilitar la seguridad del personal que participa en el proceso y porque el producto final está destinado para el consumo humano (Quintero et. al., 2002).

1.5.1 Factores que afectan la extracción

A) Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas influye en la extracción de diferentes maneras, ya que los sólidos de tamaño pequeño tienen una mayor superficie de contacto con el líquido y la distancia de difusión entre el soluto y el solvente es menor por lo tanto la cantidad de soluto transferido es más alto (Ullauri, 2010).

B) Solvente

El solvente escogido debe ser altamente selectivo, de baja viscosidad que circule libremente (Ibarz, 2005), pero conforme la extracción transcurre, la cantidad de soluto aumentará y el gradiente de concentración disminuye, incrementando progresivamente la viscosidad (Ullauri, 2010). Generalmente se utiliza etanol para la extracción de los principios activos de las plantas, sin embargo el agua es considerada el solvente universal por su capacidad de extracción en fase sólido-líquido (Ullauri, 2010).

C) Temperatura

A medida que se incrementa la temperatura la extracción es mejor pero si el rango de temperatura está entre 60 y 70 °C el rendimiento no aumenta de forma significativa por lo que es más importante encontrar un equilibrio en el cual se reduzca el gasto de energía y el tiempo de extracción (Centeno, 2003).

D) Agitación del sistema

La transferencia de materia entre un líquido en movimiento y un sólido es importante en una gran variedad de aplicaciones de procesamiento biológico. La agitación del sistema sólido-líquido es importante porque aumenta la difusión y como consecuencia la transferencia de masa aumenta desde las partículas sólidas al líquido o solución y de esta forma también se evita sedimentaciones (Ullauri, 2010).

E) Tiempo de extracción

Es considerado como un factor de menor incidencia en la extracción del colorante, pero a nivel industrial donde se trabaja con grandes volúmenes será un factor muy importante en los costos de operación ya que un largo en el tiempo de producción baja la rentabilidad (Centeno, 2003).

1.5.2 Secado por atomización

El proceso de secado por atomización es una operación básica que consiste en la transformación de una suspensión o disolución en un material seco particulado, mediante la atomización del primero en un medio caliente y seco.

El secado por atomización de gotas es utilizado en muchas aplicaciones industriales de los sectores cerámico, químico, alimentario, farmacéutico (Rosa Mondragón, J. Enrique Julia, Antonio Barba, Juan Carlos Jarque, 2013).

1.5.3 Envasado

El envasado es considerado un aspecto importante en la conservación y el procesamiento de los alimentos, razón por la cual es primordial pensar en el envasado desde que se inicia a desarrollar un producto, no solo por el aspecto técnico sino por los costos que este puede generar (Brennan, 2008).

A) Envasado en atmósfera modificada

El envasado en atmósfera modificada (MAP) es un procedimiento que consiste en la sustitución del aire del interior del envase por una determinada mezcla de gases antes de su cierre (Brennan 2008). Se utiliza esta técnica para no utilizar aditivos para la conservación de los alimentos, los gases que se utilizan para en este proceso son el nitrógeno (N_2), oxígeno (O_2) y anhídrido carbónico (CO_2) o una mezcla de estos gases (Armendaris, 2002).

El método que elimina el oxígeno del aire sustituyéndolo por nitrógeno tiene muchas ventajas, no modifica la estructura química del producto, no hay modificaciones en el producto (Madrid et. al., 2003).

El nitrógeno no tiene sabor ni color y es poco soluble. No forma nuevos productos y no ocasiona pérdida de sustancias volátiles por arrastre, ya que es muy puro (impurezas inferiores a 500 volúmenes por millón) (Madrid *et al.*, 2003).

Es un método eficaz ya que elimina del 90 al 95 % del oxígeno disuelto, el sistema es económico, ya que la inversión es muy reducida y el consumo de nitrógeno es de aproximadamente 1 litro por litro de producto (Madrid *et al.*, 2003).

B) Envasado al vacío

El envasado al vacío es la técnica más simple y sencilla de modificar la atmósfera en el interior del empaque. El envasado al vacío es útil para eliminar la mayor cantidad de bacterias nocivas, aumentando el tiempo de duración del producto durante el almacenamiento, ya que estas bacterias necesitan de oxígeno para su crecimiento normal (Ranken, 2003; Guevara, 2010).

El envasado al vacío aísla al producto del contacto con el exterior con lo que se elimina la posibilidad de cualquier tipo de contaminación, también se descarta la deshidratación del producto y la oxidación del mismo (Armendáris, 2002).

El envasado al vacío se realiza en un film de baja permeabilidad al oxígeno y el sellado después de realizar la evacuación del aire, si el vacío se realiza bajo condiciones favorables la concentración del oxígeno puede estar debajo del 1 %, (López, 2004).

1.6 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes dificultan la posibilidad que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con otras moléculas presentes, en un organismo, la acción del antioxidante es perder de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas de lípidos, proteínas, ADN, etc. (Venereo, 2002).

Los aditivos antioxidantes se usan para conservar los alimentos retardando el deterioro, para disminuir la decoloración o rancidez que se da como consecuencia de la oxidación (Cubero *et al.*, 2002).

Para la neutralización de los radicales libres, existen antioxidantes endógenos y exógenos.

Los endógenos: son las enzimas con capacidad antioxidante que no se consumen al reaccionar con los radicales libres y son dependientes de sus cofactores tales como el cobre, el hierro, el zinc, el magnesio y el selenio (Halliwell y Whiteman, 2004).

Los antioxidantes exógenos: provienen de la dieta y a diferencia de las enzimas se consumen al reaccionar con los radicales libres y deben ser reemplazados. Estos se dividen según la zona donde actúan. Los que ejercen su acción a nivel de la membrana lipídica son: la vitamina E, los carotenos, los polifenoles o flavonoides, el ubiquinol 10. Los que actúan en medio acuoso: el ácido ascórbico.

1.6.1 Beneficios de los antioxidantes

La acción de los antioxidantes sobre la salud es impedir la oxidación de moléculas biológicas, facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias ayudando a reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno; formar complejos que atenúan las reacciones producidas por radicales libres y desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades derivadas del estrés oxidativo (Lahoz *et al.*, 2000).

Con respecto al cáncer, se ha encontrado la posible relación fisiopatológica entre dicha enfermedad y las alteraciones encontradas en el metabolismo de los lípidos, por lo que los antioxidantes son considerados una forma de prevención para diferentes tipos de cáncer (Pita *et al.*, 2000).

Se ha asociado una reducción en la incidencia de enfermedades degenerativas en aquellas personas que han incrementado en el consumo de frutas y

vegetales, debido al elevado contenido de diferentes antioxidantes presentes en éstos alimentos, los que neutralizan la acción de los radicales libres, razón por la cual juegan un papel importante en la prevención de estas enfermedades, logrando un efecto positivo en la salud pública (Keith *et al.*, 2001).

1.6.2 Actividad Antioxidante

El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración más baja comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato. Los radicales libres se definen como especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo cual las hace altamente inestables y reactivas (Halliwell y Whiteman, 2004).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos depende del número y de la posición de los grupos hidroxilos, de la cantidad de electrones donadores que contenga el anillo estructural, y de la capacidad que tiene el grupo aromático de resistir el desapareamiento de electrones (Kuskoski *et al.*, 2004).

1.6.3 Propiedades Anticancerígenas y Antitumorales

Hong (2008), demostró que el zumo y los extractos procedentes de la granada son potentes inhibidores del crecimiento celular, siendo incluso más potentes que algunos polifenoles considerados de modo aislado; sugiriendo un efecto sinérgico con los fitoquímicos presentes en la granada y sus extractos.

Kohno (2004), demostró que la administración de aceite procedente de la semilla de la granada en la dieta inhibió la incidencia y la multiplicación de los adenocarcinomas de colon en ratas. La inhibición de tumores de colon mediante el aceite de la semilla se asocia al incremento de ácidos linolénicos conjugados en la mucosa del colón y en el hígado.

Hay evidencias científicas que demuestran que el zumo de granada suprime la expresión COX- 2 inducida por TNF- , la vía NF- B y la activación de Akt. Puede que ciertos componentes bioactivos presentes en el zumo de granada, tales como antocianinas y flavonolas, puedan ser las responsables del aumento de la actividad antiproliferativa de las células cancerígenas describieron la gran

actividad antiproliferativa del zumo de granada sobre diversas líneas celulares tumorales con una gran inhibición del orden del 30 hasta el 100 %. El zumo de granada, el ácido elálgico y la punicalagina indujeron la apoptosis (forma de muerte celular que está regulada genéticamente) de las células HT- 29 del colon, sin embargo, en las células HCT116 del colon únicamente contribuyeron a la apoptosis el ácido elálgico y las punicalaginas y no el zumo de granada.

Por lo tanto, los extractos de piel de granada ricos en estos compuestos (ácido elálgico y punicalaginas) parecen ser un tratamiento de futuro para el tratamiento del cáncer de colon.

1.7 MERCADOS

El principal mercado de la granada peruana es Holanda (Países Bajos), cuyas compras alcanzaron los US\$4,3 millones en el 2001. Desde este destino el producto se distribuye a supermercados del este de Europa. Otro mercado destacado es Rusia, al cual se exportaron granadas por un valor de US\$2,7 millones en el 2011.

Actualmente hay varios países que están impulsando el desarrollo productivo de esta fruta, entre los que se encuentran Estados Unidos y España en el hemisferio norte así como Argentina, Chile y Sudáfrica en el sur.(Rojas, 2016).

Las exportaciones peruanas de granada superaron los cuatro millones de dólares en el 2009, lo que significó un aumento de 90 % en relación al año previo, aumentando a 12 los destinos en el exterior, anunció la Comisión de Promoción del Perú para la Exportación y el Turismo (Promperú).

La demanda de granada y jugos concentrados de granada se ha incrementado en los últimos años debido al mayor interés de los consumidores por adquirir productos sanos y nutritivos. En este caso, la principal característica es su capacidad antioxidante y el alto contenido de vitaminas, especialmente de la C.

Tabla Nº 1.2. Granada, estimación de la producción y distribución mundial

2011 / 2012, en TM.

Origen	Produccion	Exportacion	Consumo Interno	Industria
China	1600000	s/i	s/i	s/i
India	900000	35000	665000	200000
Irán	650000	130000	455000	65000
Turquía	200000	50000	120000	30000
España	120000	90000	15000	15000
EE.UU	110000	27000	41500	41500
Israel	88000	15000	58000	15000
Afganistán	75000	1800	62200	11000
Azerbaijan	66300	49000	1300	16000
Hemisferio Norte	3809300	397800	1418000	393500
Chile	10603	5652	1884	s/i
Peru	5510	4793	687	30
Sudafrica	3077	2308	758	11
Australia	2000	200	1800	s/i
Argentina	209	154	51	4
Hemisferio Sur	21399	13107	5180	45
Total Mundial	3830699	410907	1423180	393545

Fuente: IQconsulting “Memorias de Granada 2012”

En el mercado internacional se demanda la granada entera fresca, como arilos (granos) y en jugos concentrados, en éste último se demanda de dos tipos: el primero es a base de la fruta entera y se caracteriza por su elevado grado de acidez, el segundo se prepara con los arilos y a diferencia del anterior es más dulce.

Según información del Ministerio de Agricultura (Minag), las hectáreas cultivadas en Perú en el 2009 con granada fueron 176 y se obtuvo una producción de 1,086 toneladas métricas (TM). Las principales zonas productoras de este fruto son Ica (53 %), Lima (22 %) y La Libertad (8 %).

Finalmente, destacó el importante incremento de las hectáreas de cultivo en Tacna, Lambayeque y Ancash.

Las expectativas de crecimiento de las exportaciones de granada se basan en la creciente demanda por las “súper frutas” (denominación para aquellas frutas que poseen características más allá de los nutrientes básicos) y la tendencia hacia el consumo de productos elaborados a base de ingredientes naturales.

CAPITULO II

MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Los trabajos experimentales de la presente investigación se han realizado en los laboratorios de investigación y desarrollo de la empresa Globenatural Internacional S.A.C., ubicado en Los Pantanos de Villa, Chorrillos, Lima.

2.1. MATERIA PRIMA

2.1.1 Variedad empleada

La materia prima utilizada en la investigación ha sido la granada (*Púnica granatum L.*) de la variedad Elche Mollar, procedente de Pisco - Ica, por ser la de mayor producción en la zona y la que se deteriora con facilidad por lo que su tratamiento post cosecha tiene que ser muy cuidadoso. Por otra parte, esta variedad presenta una mayor concentración de antocianinas totales, lo que constituye un gran potencial para la obtención de extractos ricos en este componente. La figura N° 2.1, muestra una fotografía de esta variedad.



Figura N° 2.1: Granada de la variedad Elche Mollar.

2.1.2 Muestreo

Las muestras han sido tomadas directamente de los campos de cultivo de Pisco – Ica pertenecientes a las cosechas de los años 2015, 2016. En la figura N° 2.2, se muestra uno de los campos en los que se recolectaron granadas para la realización del presente estudio.



Figura N° 2.2: Cultivo de Granada de la variedad Elche Mollar Pisco – Ica.

Las granadas utilizadas en el presente estudio, después de su cosecha fueron almacenadas en cajas de cartón (como se muestra en la Figura N° 2.3 y transportadas a temperatura ambiente, hasta los laboratorios de Globenatural. El tiempo transcurrido del momento de la recolección y la realización de los trabajos experimentales ha sido de una semana, cuidando que los frutos utilizados conserven sus características.



Figura N° 2.3: Transporte de las granadas variedad Elche Mollar.

2.1.3 Caracterización de la Materia Prima

Se caracterizaron las antocianinas totales presentes en la materia prima, para ello se mezcló en Erlenmeyer de 250mL, 100 g de granos de granada, previamente triturados con un extractor de jugos, más la solución acuosa de extracción considerada, luego se agitó en una cocina eléctrica con agitador al abrigo de la luz y el aire para evitar la degradación de las antocianinas. Posteriormente, en la mezcla se determinó la concentración, pH y humedad de antocianinas totales con el equipo espectrofotométrico.

2.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

A continuación se muestra la relación de materiales de vidrio, reactivos y equipos empleados en la investigación, todos proporcionados por la empresa Globenatural cuya vasta experiencia en la extracción, producción es reconocida a nivel nacional e internacional.

2.2.1 Materiales

- Vasos de precipitado 50 mL ,150 mL y 2000mL
- Fiolas 25mL, 50 mL y 100mL
- Pipeta 5mL, 10mL
- Matraz 125 mL, y 250mL
- Tubos de ensayo
- Filtro malla n° 325 de 45 µm
- Frascos de plástico de 30 mL
- Embudo
- Luna de reloj

2.2.2 Reactivos

- Agua (d)
- Etanol 96%, pureza
- Ácido clorhídrico 2N
- Ácido fosfórico

- Ácido cítrico anhidro
- Citrato de sodio
- Fosfato de sodio
- Hidróxido de sodio
- Fosfato ácido de sodio
- Solvente solución acuoso
- Buffer pH 1,0, 3,0, 4,5, 7,0, 8,0

2.2.3 Equipos

- Extractor de jugos marca Continental Electric modelo CE 22332 (China).
- Balanza digital marca CHIMADZU Serie ELB (JAPON) de 5000 g + 0,05 g de capacidad.
- Balanza analítica OHAUS CP224C, sensibilidad 0,001g, capacidad máxima 220g.
- Agitador magnético ISOLAB MAGNETIC BARS GmbH, 6*20 mm.
- Cocina con agitador marca VELD SEIENTIFICA, capacidad 0- 370°C Heating y 0-10 stirrer.
- Espectrofotómetro SHIMADZU UV – 1800.
- Termómetro Pt100 marca DBGM (Germany).
- pH-metro Orión Instruments S.A. modelo GLP 21-22 (España).
- Cronómetro de laboratorio marca Marienfeld (Alemania).
- Refrigeradora.

2.3 OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE LA ANTOCIANINA

Tomando en consideración la extracción de antocianinas en forma general, se ha adecuado el siguiente procedimiento para la granada lo que muestra en la Figura N° 2.4.

DIAGRAMA DE FLUJO

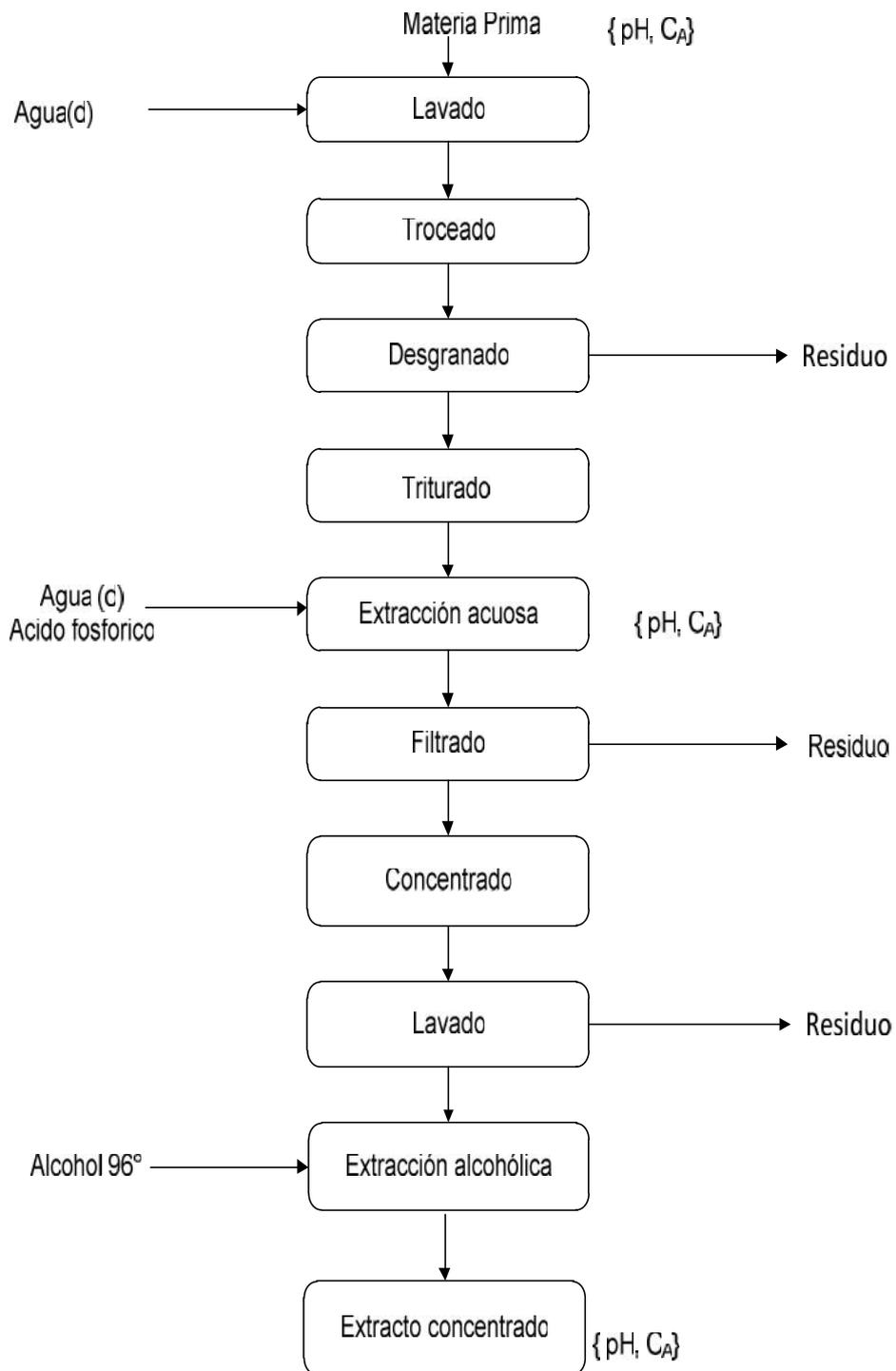


Figura N° 2.4: Diagrama de flujo de obtención de los extractos de antocianina.

2.3.1 Lavado de Materia Prima

La materia prima se procedió al lavado bajo un chorro de agua potable para eliminar las impurezas que pueden afectar en el proceso como se muestra en la Figura N° 2.5.



Figura N° 2.5: Granada de la variedad Elche Mollar seleccionadas y lavadas.

2.3.2 Troceado

Posteriormente las granadas se trozaron en cuatro partes para poder retirar el producto valioso como se muestra en la Figura N° 2.6.



Figura N° 2.6: Granada de la variedad Elche Mollar Troceadas.

2.3.3 Desgranado

La granada se desgrano a un recipiente, en esta etapa se obtiene materia prima comestible y el residuo Figura N° 2.7.



Figura N° 2.7: Granada de la variedad Elche Mollar desgranadas y el residuo.

2.3.4 Triturado

A continuación, las granadas desgranadas se trituraron en un extractor de jugos. En esta etapa se toman muestras para determinar la concentración de antocianinas y pH correspondiente.

2.3.5 Extracción

La muestra triturada previamente pesada es sometida a una extracción sólido-líquido, de acuerdo a los siguientes pasos.

A. Variables para optimizar la extracción acuosa

En la primera prueba experimental se ha determinado la influencia de la temperatura, pH, y tiempo sobre el proceso de extracción acuosa. Se utilizó como solvente agua, con gotas de ácido fosfórico en un rango de pH de 2 a 2,5, y una relación másica de materia prima y solvente de 3/1 (300 g de muestra/100 g de agua), tomando como referencia la experiencia de Globe Natural en extracción de antocianinas y de acuerdo a la intensidad de color del extracto.

Las variables de proceso estudiadas fueron:

- Temperatura: 23 a 80 °C.
- pH: 2,0 a 3,5.
- Tiempo de extracción: 14 a 60 min.

El número total de pruebas experimentales realizadas fueron 10 de acuerdo a la Tabla N° 2.1.

Tabla 2.1: Variables estudiadas de extracción
Sólido – Líquido de antocianinas.

Temperatura °C	pH	Tiempo min.
23	2,0	60
23	3,5	30
45	2,3	35
45	3,5	45
55	2,3	35
55	3,4	25
60	2,3	20
60	2,5	18
60	3,5	15
80	2,3	14

B. Aplicación de las variables óptimas

Luego de haber encontrado las variables óptimas, se ha procedido a la extracción acuosa del producto en mayor cantidad (15 kg de muestra/5 kg de agua) empleando un recipiente de mayor capacidad. El extracto acuoso obtenido se ha empleado para las siguientes etapas del proceso.

2.3.6 Filtración

El extracto obtenido de la etapa anterior se ha filtrado empleando una malla N° 325 de 45 µm, como se muestra en la Figura N° 2.8. Una muestra de la solución filtrada es empleada para la determinación de la concentración de antocianinas y el pH correspondiente.



a. Extracto acuoso

b. Residuo

Figura N° 2.8: Extracto acuoso y residuo después de la filtración.

2.3.7 Concentración del extracto.

En la etapa de concentración primero se procedió a pesar el extracto filtrado, luego se pasó por una columna concentradora de intercambio iónico aniónico, el colorante queda retenido en la columna concentradora y sale solo agua con baja concentración de colorante.

El tiempo para esta operación varía entre 2-3 horas, hasta que la columna concentradora termine de atrapar todo el colorante. La Figura N° 2.9. Muestra el sistema empleado para esta etapa.



Figura N° 2.9: Concentración del extracto.

2.3.8 Lavado

Una vez terminada la etapa de concentración, se procedió a realizar el lavado con agua desionizada empleando un chorro lento para eliminar los sólidos insolubles que aún permanecen en la columna.

2.3.9 Extracción alcohólica

La recuperación del colorante contenido en la columna concentradora se realizó disolviendo el colorante con etanol de 96 %, para ello, primero se vierte el alcohol, por la parte superior de tal manera que la salida del caudal sea entre 2-3 mL por minuto como se muestra en la Figura N° 2.10. Finalmente se determina la concentración del extracto concentrado en porcentaje de antocianinas totales presentes.



Figura N° 2.10: Extracción alcohólica de antocianinas.

2.4 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN TÉRMICA

La degradación térmica del colorante es un factor importante para determinar el rango de temperatura de extracción y aplicación industrial, ya que las antocianinas son muy sensibles a la temperatura y pueden perder con facilidad sus características fisicoquímicas y antioxidantes.

El procedimiento experimental para determinar la degradación térmica es el siguiente:

- Se tomó 10 mL de extracto concentrado de antocianina en unos tubos de ensayo provisto con una tapa.
- Se calentó las muestras contenidas en un vaso precipitado con agua de 250 mL. En una cocina controlada a las temperaturas de 65, 75, 85 y 90 °C por 30 min.
- Se retiró las muestras de calentamiento de cada temperatura estudiada para enfriar a la temperatura ambiente hasta alcanzar el equilibrio térmico.
- Luego se determinó el porcentaje de degradación de antocianinas de cada muestra.

2.5 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN POR ALMACENAMIENTO.

La influencia de la temperatura de almacenamiento del extracto concentrado de antocianinas, ha sido realizada con la finalidad de determinar el tiempo de vida útil del producto.

Para realizar esta prueba se procedió de la siguiente manera:

- Se tomó muestras de 20 mL de extracto concentrado en frascos de plástico provisto de una tapa.
- Se almacenó las muestras contenidas en los frascos tapada a una temperatura controlada de 10, 23 y 35°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).
- Se retiró las muestras contenidas en los frascos para evaluar los perfiles de las antocianinas a 0,5, 1, 6, 12 meses.

2.6 APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La aplicación de las antocianinas han sido evaluados en los siguientes alimentos: Agua, gaseosa, yogurt, leche, proteína de soya y masa de azúcar para caramelos.

2.7 CARACTERIZACIÓN DE ANTOCININA DE GRANADA.

A continuación se describen las caracterizaciones realizadas a las diferentes muestras.

2.7.1 Sólidos totales

La determinación de la cantidad de sólidos totales se efectuó introduciendo el extracto de 2,0 g aprox. en una estufa a una temperatura de 120°C durante 20 minutos. Los resultados se expresaron en porcentaje en peso.

2.7.2 pH

La medida del pH se realizó con un pH-metro Thermo Scientific, previamente calibrado con soluciones tampones estandarizados de pH 4, 7 y 10.

2.7.3 Concentración de Antocianinas

La concentración de antocianinas en las distintas etapas del proceso desde la materia prima hasta el producto final se ha determinado de acuerdo al siguiente procedimiento denominado método del pH diferenciado:

A. Preparación de buffers:

Buffer pH 1,0: Se preparó 1,864 g cloruro de potasio en 980 mL de agua, ajustar a pH 1,00 \pm 0,05 con ácido clorhídrico Q.P. diluir a 1000 mL con agua y homogenizar.

Buffer pH 4,5: Se preparó 32,84 g acetato de sodio en 960 ml de agua, ajustar a pH 4,50 \pm 0,05 con ácido clorhídrico Q.P. diluir a 1000 ml con agua y homogenizar.

B. Preparación de solución muestra a pH 1,0: se procedió a pesar 3,5 – 5,5 g aproximadamente de muestra extracto y llevar a un matraz volumétrico de 25 mL. Enrazar con buffer pH 1,0 y homogenizar.

C. Preparación de solución muestra a pH 4,5: se procedió a pesar 3,5 – 5,5 g aproximadamente de muestra extracto y llevar a un matraz volumétrico de 25 mL. Enrazar con buffer pH 4,5 y homogenizar.

Las soluciones muestras deben ser homogenizadas y luego filtradas con filtro de membrana SARTORIUS de 0.45µm de tamaño de poro.

D. Lectura de la absorbancia de cada solución muestra a pH 1,0 y a pH 4,5.

Condiciones Espectrofotométricas.

Equipo : Espectrofotómetro UV-Vis

Celda de cuarzo : 1,0 cm

Longitud de onda : 510 nm y 700 nm

Blanco : Para lecturas a pH 1,0 usar el buffer 1,0. Para lecturas a pH 4,5 usar el buffer 4,5.

CÁLCULOS:

Para obtener las absorbancias de antocianina:

En base a las absorbancias obtenidas, se procedió a realizar las restas de las absorbancias como indica en la ecuación 2.1.

$$A = (A_1 - A_2)_{\text{pH}=1} - (A_1 - A_2)_{\text{pH}=4.5} \quad 2.1$$

Donde:

A : Absorbancia de la antocianina.

A₁ : Es la absorbancia leída a una longitud de onda de 510 nm.

A₂ : Es la absorbancia leída a una longitud de onda de 700 nm.

E. Determinación de concentración.

$$C_A = \frac{A \times PM \times F_D \times 10}{\epsilon \times L \times W_g} \quad (2.2)$$

Dónde:

C_A : Concentración de antocianinas totales (%).

A : Absorbancia de la antocianina.

PM : Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol.

W_g : Peso de la muestra.

F_D : Factor de dilución.

ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900.

L : Longitud de paso de celda, 1cm.

2.7.4 Perfil de antocinina

El perfil de antocininas se determinó en el equipo Espectrofotometro de acuerdo a la siguiente procedimiento.

- Se Pesó 1,0 g de la muestra de antocianina en una luna de reloj.
- Se trasvazó a una fiola de 100 ml con solución etanólica.
- Se procedió a leer el perfil en el espectrofotometro.

2.7.5 Rendimiento de extracto de antocianinas totales.

El rendimiento de extracción de antocianinas totales se determinó como el porcentaje de extracción de antocianinas totales extraídas de una determinada cantidad de granada, mediante la siguiente expresión:

$$R_A = \frac{M_E \times C_E}{M_G \times C_G} \times 100 \quad (2.3)$$

Dónde:

R_A : Rendimiento de extracción de antocianinas totales (%).

M_E : Masa del extracto (g).

C_E : Concentración de antocianinas totales en el extracto (%).

M_G : Masa de granada (g).

C_G : Concentración de antocianinas totales en las granadas (%).

2.7.6 Degradación de antocianina

$$D_A = \frac{C_0 - C}{C_0} \times 100 \quad (2.4)$$

Dónde:

D_A : Degradación de antocianinas totales (%).

C : Concentración de antocianinas para cualquier tiempo (%).

C_0 : Concentración inicial de antocianinas (%).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESUMEN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

3.1.1 Caracterización de materia prima

En el presente trabajo se caracterizó la materia prima, granada desgranada, previamente trituradas con un extractor de jugos, posteriormente se homogenizo a la mezcla y se analizó la concentración, pH, y humedad como antocianinas totales, obteniendo como resultado de 0,03% de concentración, 94,79% de agua y 2,78 de pH.

3.1.2 Variables para optimizar la extracción acuosa

Como primer paso se estudiaron la influencia de las variables: temperatura de extracción (23 a 80°C), pH (2,0 a 3,5) y tiempo de extracción (14 a 60 min). El solvente utilizado fue una solución acuosa ácida y la relación másica de materia prima/solvente fue de 3:1. Las pruebas experimentales se realizaron de acuerdo a las variables de la extracción de antocianinas, las que se muestran en la Tabla N ° 3.1 y Figura N° 3.1, como respuesta para evaluar la eficacia de los tratamientos, se consideró el rendimiento de extracto de antocianina.

Tabla N°3.1: Variables para optimizar la extracción acuosa.

Temperatura (°C.)	pH	Tiempo (min.)	R _A (%)
23	2	60	39,68
23	3,5	30	43,65
45	2,3	35	47,62
45	3,5	45	39,68
55	2,3	35	59,52
55	3,5	25	51,59
60	2,3	20	70,29
60	2,5	18	62,22
60	3,5	15	30,48
80	2,3	14	14,98

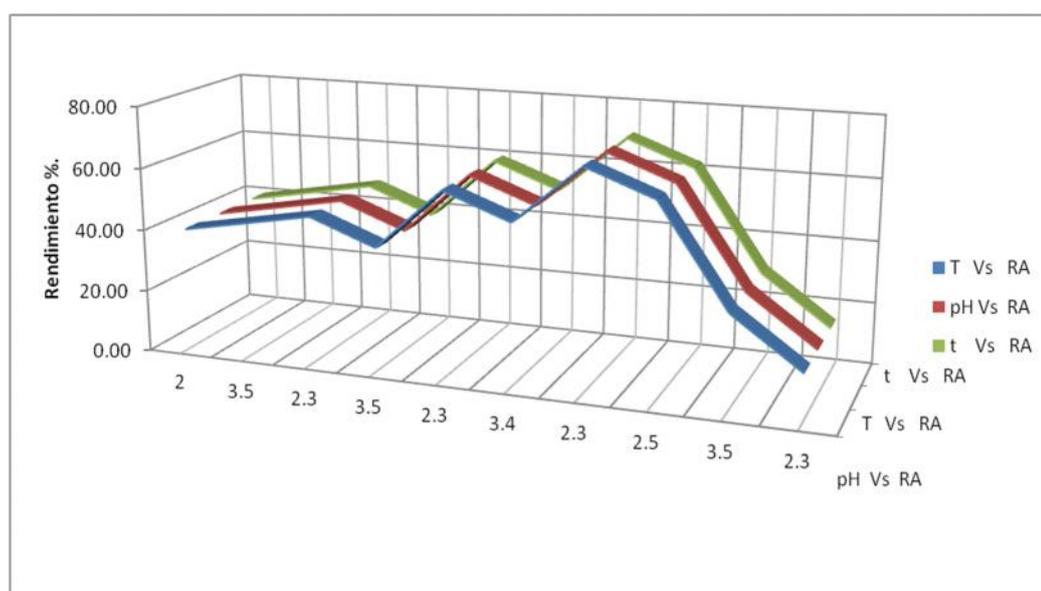


Figura N° 3.1: Variables para optimizar la extracción acuosa.

Del análisis de la Tabla N° 3.1 y la figura N° 3.1 se observa que la temperatura, el pH y tiempo de extracción influyen en el rendimiento de extracción de antocianina. El rendimiento de la extracción aumenta con el incremento de la temperatura hasta los 60°C y luego disminuye a medida que la temperatura aumenta.

La influencia del pH en la extracción de antocianinas ha sido estudiada en el rango de 2 a 3,5 por la experiencia en el manejo de colorante una extracción a un pH muy bajo podría afectar a las características sensoriales del producto en el que fuera añadido. Mientras que a un pH mayores que 2,3 se produce una degradación de las antocianinas, esto también se muestra en la Figura N° 3.1.

La temperatura es otra de las variables que influye en la extracción de antocianinas. Por lo que, el rango de temperatura durante la extracción ha sido considerada en el rango de 23 y 80°C. No se ha considerado temperaturas menores a 23° C porque la extracción es muy lenta ni mayores a 80° C por la degradación de la antocianina.

El tiempo durante el proceso de extracción es una variable determinante para la optimización del proceso de extracción y depende de la temperatura y el pH, como se muestra Figura N° 3.1.

De los resultados obtenidos se desprende que el mayor rendimiento obtenido es de 70,29% a la temperatura de 60°C, a un pH de 2,3 y un tiempo de extracción de 20 minutos por lo que son consideradas estas como los parámetros óptimos del proceso de extracción de antocianinas a partir de la granada.

3.1.3 Aplicación de los parámetros óptimas

En esta etapa de extracción de la antocianina se realizó aplicando las variables óptimas, tomando los resultados de la primera experiencia, para cumplir con uno de los objetivos de la investigación fue obtener un extracto de antocianinas concentrada para evaluar su potencial utilización en la industria alimentaria.

La extracción se ha realizado a una temperatura 60°C (± 1), pH 2.3 y tiempo 5 a 60 min., empleando 15 kg de materia prima y 5 kg de agua.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 3.2 y la figura 3.2. En ésta prueba al igual que la anterior se obtuvo la concentración de 0.018% de antocianina en extracto acuoso y un rendimiento de 70,36% en la extracción de la antocianina acuosa.

Tabla N°3.2: Resultados de aplicación de variables óptimos a una T= 60°C

T : °C	t: min	C _A (%)
60	5	0.017
	10	0.018
	15	0.018
	20	0.018
	25	0.018
	30	0.018
	35	0.018
	40	0.018
	45	0.018
	50	0.018
	55	0.018
	60	0.018

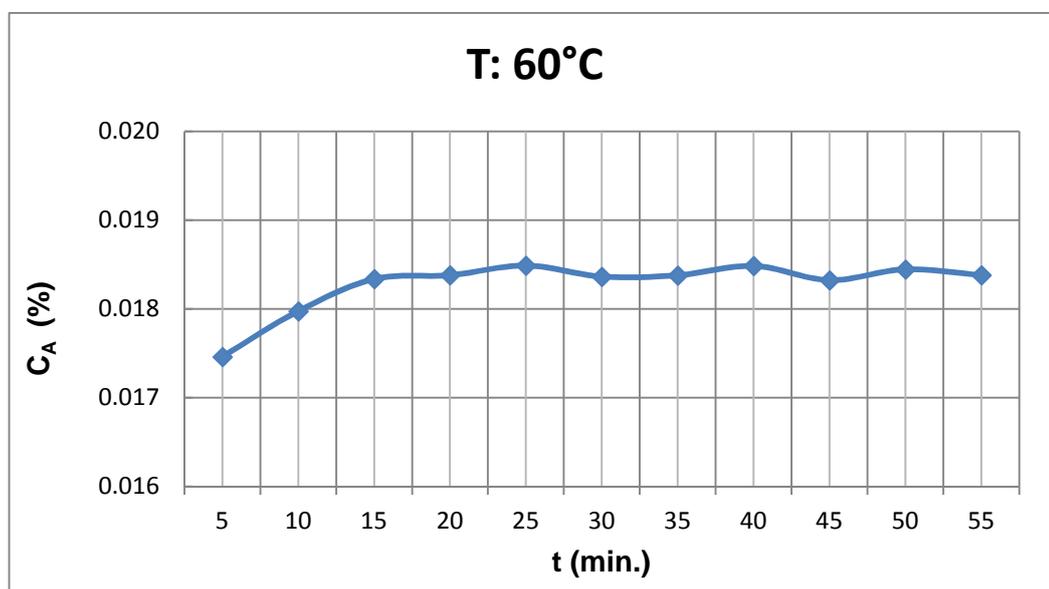


Figura N°3.2. Resultados de aplicación de variables óptimos.

El extracto obtenido se ha concentrado en una columna de intercambio iónico obteniéndose un concentrado de 0,20 % de antocianina. Luego este concentrado se ha empleado para los estudios de degradación térmica y de almacenamiento,

y otra parte se ha secado por atomización para obtener producto como antocianina en polvo de una concentración de 5.0 de antocianina%.

Tabla N° 3.3: Variables para extracción de antocianinas de granada.

Extracción	Resultados
Materia Prima / Solvente	3/1 (Kg/kg)
Tiempo de extracción	20 min
Temperatura de extracción	60 °C
Concentración del extracto acuosa	0.018 %
Concentración del extracto concentrado	0.20 %
Concentración final antocianina en polvo	5.0%
Rendimiento en el extracto acuoso	70.36 %
Rendimiento en el extracto concentrado	60.49 %
Rendimiento final antocianina en polvo	52.00 %

3.2 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN TÉRMICA.

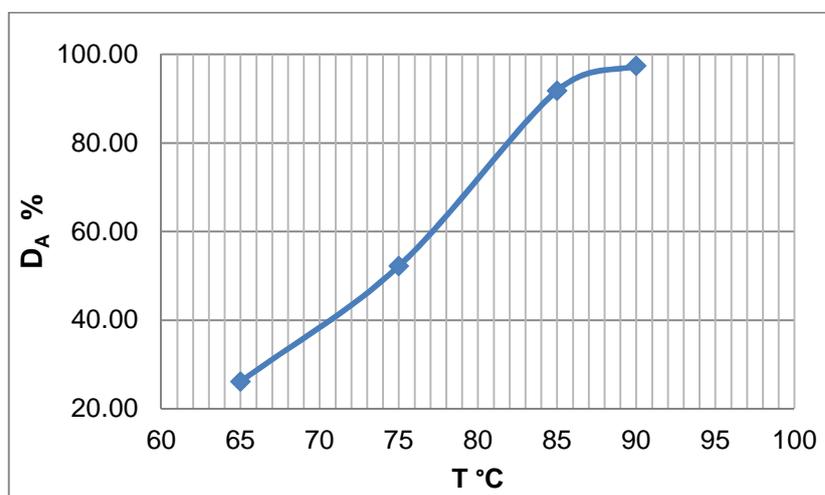
El interés de esta investigación ha sido evaluar la potencial aplicación de los extractos de antocianina como aditivo en la industria alimentaria ya sea como colorante o como colorante antioxidante en alimentos formulados. Cabe destacar que hay procesos tecnológicos que requieren temperaturas relativamente altas.

Por lo que, es necesario determinar la degradación de las antocianinas durante el calentamiento.

Para estudiar la sensibilidad a la temperatura de la antocianina extraída, se procedió a tomar muestras de 10mL a los que se sometieron a diferentes temperaturas durante 30 min. Los resultados mostraron que, para un tiempo de calentamiento máximo de 30 min. La degradación aumenta a medida que se eleva la temperatura, como se observa en la tabla N° 3.4 y la figura 3.3.

Tabla N°3.4: Degradación térmica de antocianinas.

T °C	D _A %
65	26.12
75	52.21
85	91.83
90	97.44



FiguraN°3.3: Degradación térmica de antocianinas.

Estos resultados concuerdan con lo afirmado por La leh et al. (2006), quienes señalaron que la temperatura es un factor que tiene un rol desestabilizante en la estructura molecular de las antocianinas, así mismo, Badui Dergal (2006) publicó que los tratamientos térmicos influyen marcadamente en la destrucción de las antocianinas.

3.3 ESTUDIO DE DEGRADACIÓN DE ANTOCIANINAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

El tiempo de almacenamiento de los aditivos alimenticios es importante para determinar la vida útil y condiciones de almacenamiento, porque es necesario determinar este parámetro para el extracto de antocianina por lo que es conveniente determinar en qué medida la concentración de antocianinas es

afectada por el tiempo y temperatura de almacenamiento. Para ese se ha utilizados tres métodos:

- Método espectrofotométrico
- Método colorimétrico y
- Método visual.

La muestra de concentrado empleada para los tres métodos ha sido de 20 mL. Las temperaturas de almacenamiento han sido de 10, 23 y 35 °C. ($\pm 1^\circ\text{C}$) en ausencia de luz y los tiempos de almacenamiento han sido de 0,5; 1; 6 y 12 meses.

3.3.1 Método espectrofotométrico:

Los resultados obtenidos por el primer método utilizando el espectrofotómetro UV-VIS se muestran en las tablas N°3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 y figuras N° 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9 en los que se observan los perfiles de antocianina, absorbancia versus longitud de onda, que muestran la degradación de antocianina por la distorsión de los perfiles. Al final de un año a una temperatura de 10 °C, el perfil se mantiene, mientras que para las temperaturas 23 y 35 °C, se ha degradado completamente.

Tabla N° 3.5: Lectura inicial espectrofotométrico (t = 0).

: mn	Abs.
400	0.181
444	0.229
488	0.400
532	0.819
576	0.361
620	0.020
700	0.002

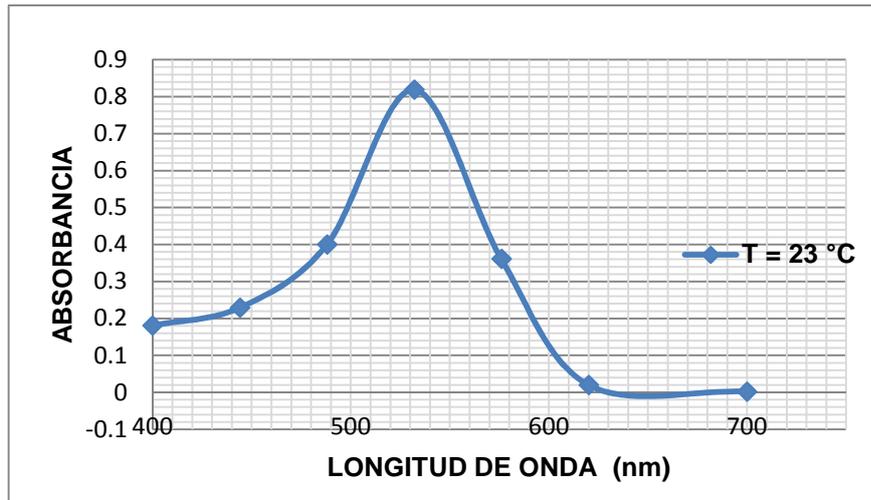


Figura N° 3.4: Lectura inicial espectrofotométrico (t = 0).

En la figura N° 3.4 Se mostró el perfil de antocianina inicial realizado a una temperatura ambiente, donde el pico máximo fue 532 nm, con una lectura de 0.819 de absorbancia.

Tabla N° 3.6: Lectura espectrofotométrico (t = 0,5 mes).

: nm	Abs		
	10 °C	23 °C	35 °C
400	0.222	0.255	0.22
444	0.272	0.225	0.259
488	0.442	0.436	0.398
532	0.711	0.559	0.398
576	0.277	0.282	0.215
620	0.031	0.018	0.023
700	0.005	0.014	0.004

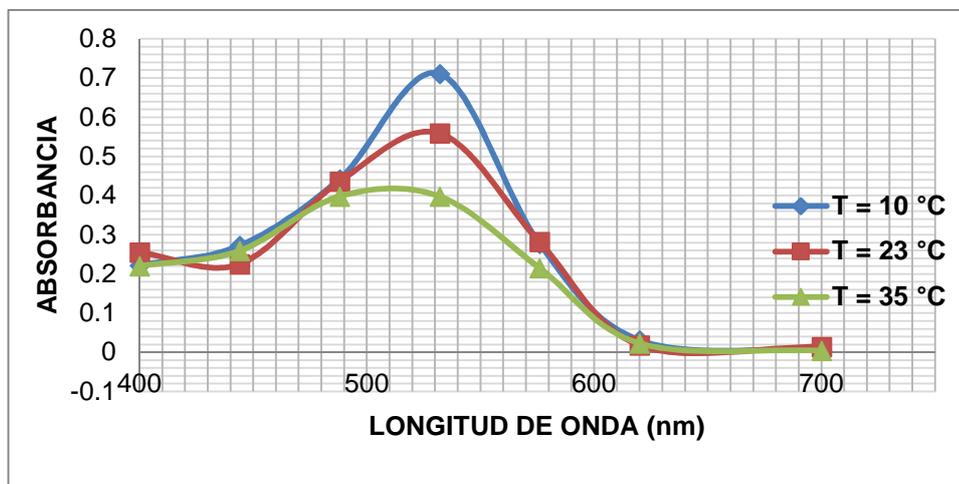


Figura N° 3.5: Lectura espectrofotométrico (t = 0,5 mes).

Según la figura N° 3.5, se observó que a 10 °C el pico de absorbancia es superior y estable en comparación con las temperaturas de 23 y 35 °C que se observa en la figura en mención.

Tabla N° 3.7: Lectura espectrofotométrico (t = 1 mes).

λ : nm	Abs		
	10 °C	23 °C	35 °C
400	0.217	0.231	0.204
444	0.230	0.264	0.259
488	0.447	0.351	0.268
532	0.7	0.227	0.163
576	0.304	0.048	0.034
620	0.041	0.013	0.007
700	0.013	0.008	0.001

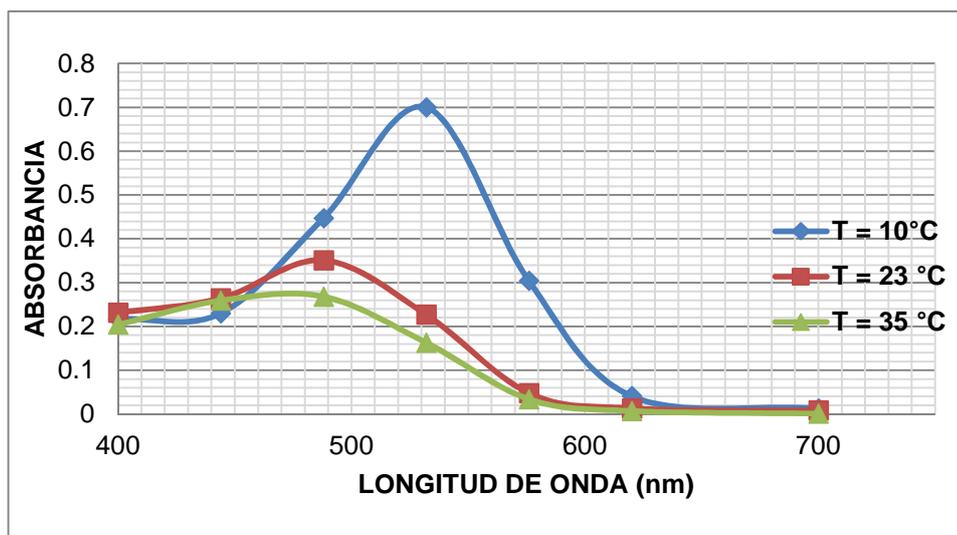
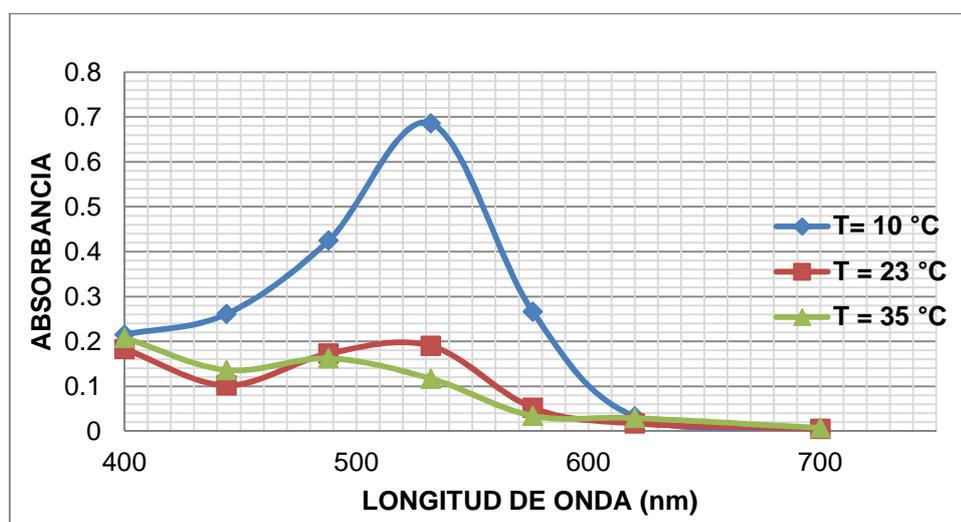


Figura N° 3.6: Lectura espectrofotométrico (t = 1,0 mes).

Según la figura N° 3.6, teniendo en cuenta el tiempo de 1 mes se observó que las absorbancias no varían significativamente, siempre y cuando se mantenga a una temperatura de 10 °C.

TablaN°3.8: Lectura espectrofotométrico (t = 6 meses).

: nm	Abs		
	10 °C	23 °C	35 °C
400	0.215	0.183	0.208
444	0.261	0.102	0.136
488	0.425	0.173	0.162
532	0.686	0.19	0.117
576	0.266	0.052	0.034
620	0.033	0.017	0.029
700	0.005	0.005	0.007



FiguraN°3.7: Lectura espectrofotométrico (t = 6 meses).

Según la figura N° 3.7, teniendo en cuenta el tiempo de 6 meses se observó que las absorbancias a una temperatura de 23 y 35 °C varían significativamente, mientras a una temperatura de 10 °C es casi estable.

Tabla N° 3.9: Lectura espectrofotométrico (t = 1 año).

: nm	ABSORBANCIA		
	10 °C	23 °C	35 °C
400	0.227	0.198	0.107
444	0.262	0.131	0.077
488	0.407	0.105	0.069
532	0.614	0.077	0.06
576	0.259	0.049	0.032
620	0.028	0.033	0.015
700	0.003	0.024	0.009

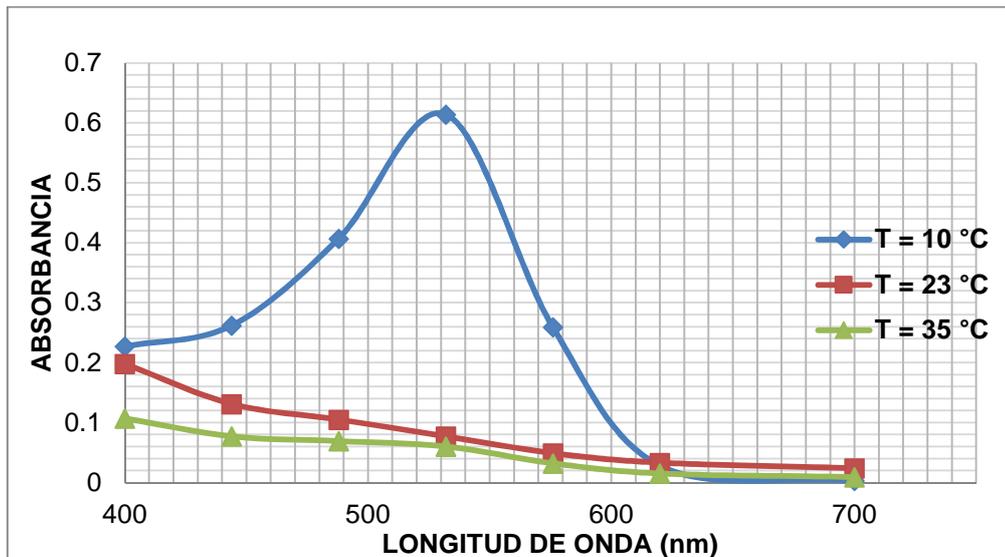


Figura N° 3.8: Lectura espectrofotométrico (t = 1 año).

Según la figura N° 3.7 se observó la degradación de la antocianina por la distorsión de los perfiles. Al final de un año a una temperatura de 10 °C, el perfil se mantiene, mientras que para las temperaturas 23 y 35 °C, se ha degradado completamente.

3.3.2 Método colorimétrico:

También la degradación se ha determinado por el método colorimétrico la degradación de la antocianina por la variación del color y la formación de precipitado. Los resultados son mostrados en la figura N° 3.9, en las que el color se distorsiona a medida que pasa el tiempo para las temperaturas de 23, 35 °C, mientras a 10 °C, el color se mantiene casi permanente hasta un año. Estas figuras muestran los resultados de esta prueba en forma numérica de acuerdo al sistema CIELAB de la figura N° 1.10. Diagrama cromático (Proyectacolor, 2011).

OnColor - [MEJORAR.wsv]
 File Standard Trial Report Options View Window Help

Standard: **GDA COLOR INICIAL** Trial 1: **GDA T: 10°C 0,5**
 D65 - 2° CIE L*a*b*

	Name		L*	a*	b*	C*	h°	DL*	Da*	Db*	DC*	DH*	DE*ab	
Std	GDA COLOR INICIAL		65.20	48.95	3.15	49.05	3.68							
1	GDA T: 10°C 0,5		65.18	48.94	3.16	49.04	3.69	-0.02	-0.01	0.01	-0.01	0.01	0.02	PASS
2	GDA T: 23°C 0,5		66.07	47.20	4.40	47.40	5.33	0.87	-1.75	1.25	-1.65	1.38	2.32	FAIL
3	GDA T: 35°C 0,5		66.43	46.93	3.33	47.05	4.06	1.23	-2.02	0.18	-2.00	0.32	2.37	FAIL
4	GDA T: 10°C 1		65.18	48.94	3.17	49.04	3.71	-0.02	-0.01	0.02	-0.01	0.02	0.03	PASS
5	GDA T: 23°C 1		66.94	45.44	4.93	45.71	6.19	1.74	-3.51	1.78	-3.34	2.07	4.30	FAIL
6	GDA T: 35°C 1		67.65	44.90	3.42	45.03	4.36	2.45	-4.05	0.27	-4.02	0.55	4.74	FAIL
7	GDA T: 10°C 6		65.19	48.95	3.19	49.05	3.73	-0.01	0.00	0.04	0.00	0.04	0.04	PASS
8	GDA T: 23°C 6		75.64	27.89	7.53	28.89	15.11	10.44	-21.06	4.38	-20.16	7.50	23.91	FAIL
9	GDA T: 35°C 6		79.90	24.65	4.77	25.11	10.95	14.70	-24.30	1.62	-23.94	4.45	28.45	FAIL
10	GDA T: 10 °C 12		65.15	48.91	3.20	49.01	3.74	-0.05	-0.04	0.05	-0.04	0.05	0.08	PASS
11	GDA T: 23 °C 12		86.65	6.79	17.28	18.57	68.55	21.45	-42.16	14.13	-30.49	32.37	49.37	FAIL
12	GDA T: 35 °C 12		94.60	0.38	6.43	6.44	86.62	29.40	-48.57	3.28	-42.61	23.54	56.87	FAIL

Figura N° 3.9: Lectura en sistema CIELAB degradación de antocianina 0.1/50 g agua acida.

3.3.3 Método visual:

El método visual se evaluó en agua acida a Ph 3,0 para ver la tonalidad del extracto por comparación a diferentes temperaturas de almacenamiento, como se muestra en la figura N° 3.10, se observó visualmente una diferencia muy significativa en el color.

Donde:

- Al final de un año a una temperatura de 10 °C, el color se mantiene.
- Para la temperatura de 23 °C el color fue marón precipitado.
- Mientras para temperatura de 35 °C, el color se ha degradado completamente.



Figura N° 3.10: Evaluado en forma visual degradación de antocianina 0.1/50 g agua acida.

3.4 APLICACIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINA EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

La adición de antocianinas como colorante alimentario, además de mejorar la apariencia es beneficiosa para la salud. Según los estudios de Shipp y Abdel-A al, 2010, y Aguilera Ortíz et al., 2011, los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales libres y actuar como agentes quimio protectores, también tienen propiedades antidiabéticas tales como control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores. Por lo tanto, estas propiedades de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano.

La evaluación de la aplicación del extracto de antocianina se ha realizado en agua, gaseosa, yogurt y masa de azúcar para caramelos. La cantidad de extracto fue 0.1 g en 50g de cada uno de los productos. Los resultados se muestran en las figuras N° 3.11, 3.12, 3.13, 3.14, 3.15, 3.16, 3.17 y 3.18.

3.4.1 Aplicación en agua.

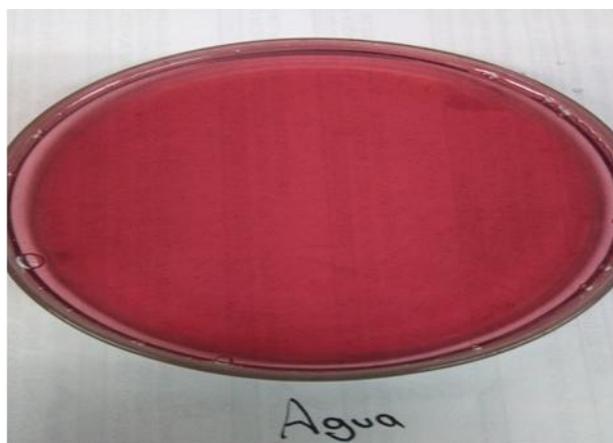


Figura N° 3.11: Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en agua.



Figura N° 3.12: Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en agua.

Según la figura N° 3.11 y 3.12 en la aplicación se observó una coloración rojo oscuro y por sistema CIELAB, se observó en L*: 59.18 trasparente, a*: 45.36 positivo tono rojo y b*: 8.64 positivo tono amarillo, el cual significa que es un color rojo amarillo transparente.

3.4.2 Aplicación en gaseosa.



Figura N° 3.13: Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en gaseosa



Figura N° 3.14: Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en gaseosa

Según la figura N° 3.13 y 3.14 en la aplicación se observó una coloración rojo claro y por sistema CIELAB, se observó en L*: 54.18 trasparente, a*: 55.24 positivo tono rojo intenso y b*: 16.83 positivo tono amarillo intenso, el cual significa que es un color rojo amarillo transparente intenso.

3.4.3 Aplicación en yogurt.



Figura N° 3.15: Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en yogurt

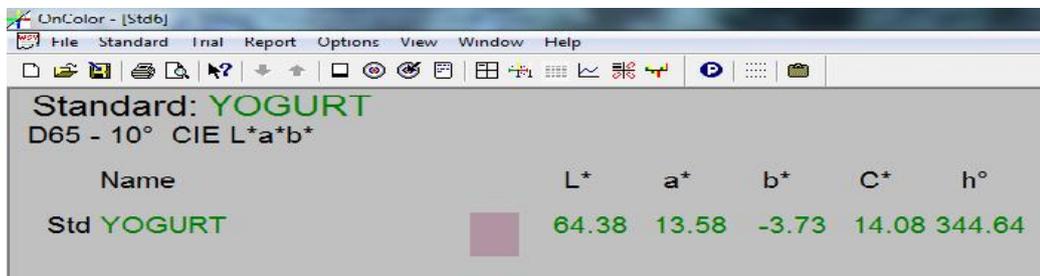


Figura N° 3.16: Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en yogurt

Según la figura N° 3.15 y 3.16 en la aplicación se observó una coloración morado claro y por sistema CIELAB, se observó en L*: 64.38 transparente, a*: 13.58 positivo tono rojo y b*: -3.73 negativo tono azul, el cual significa que es un color rojo - azul transparente.

3.4.4 Aplicación en masa de azúcar

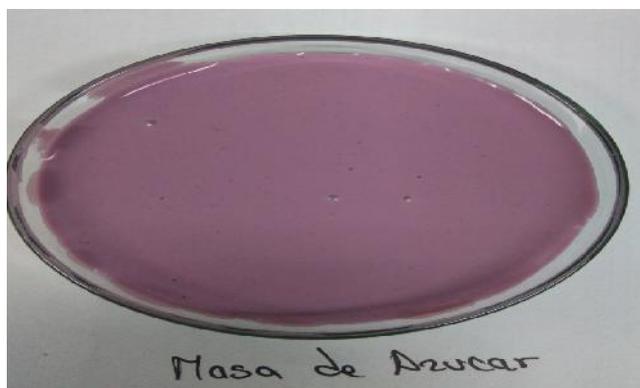


Figura N° 3.17: Aplicación de 0.1/50 g de antocianina en masa de azúcar



Figura N° 3.18: Lectura en sistema CIELAB de la aplicación en masa de azúcar

Según la figura N° 3.17 y 3.18 en la aplicación se observó una coloración morado oscuro y por sistema CIELAB, se observó en L*: 57.02 transparente, a*: 13.59 positivo tono rojo y b*:5.59 positivo tono azul, el cual significa que es un color rojo – azul transparente.

Por lo tanto, la coloración del producto final con antocianina de granada en las diferentes figuras depende del pH de cada uno.

3.5 CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL

Control de calidad del producto final se realiza certificado de calidad, en donde se detalla los análisis fisicoquímicos, microbiológicos, metales pesados y contenido de alcohol corresponde a evaluaciones periódicas por laboratorios externos, los cuales se muestran en anexos.

CAPITULO IV

PROPUESTA DEL PROCESO PRODUCTIVO

4.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO SELECCIONADO

Según los resultados obtenidos en cuanto a la extracción y estabilidad de los extractos, se dio un paso más para intentar conseguir un extracto de calidad comercial. En este caso, se buscó aplicar las variables óptimas encontradas. Operando de esta manera, se obtuvo un extracto concentrado cuya concentración de antocianinas totales fué de 0.20 %, mientras que en la materia prima inicial lo fue de 0.018%. Esto indica que con este proceso de extracción la concentración supero ampliamente la antocianinas presentes en granada fresca. Luego este concentrado se procedió a realizar secado por atomización para obtener el producto como antocianina en polvo de una concentración de 5,0%.

Tabla N° 4.1: Resultados de la extracción de antocianinas de granada.

Extracción	Resultados
Materia Prima / Solvente	15/5 (Kg/kg)
Tiempo de extracción	20 min
Temperatura de extracción	60 °C
pH de extracción	2,30
Concentración del extracto acuosa	0,018 %
Concentración del extracto concentrado	0,20 %
Concentración final antocianina en polvo	5,0%

4.2 DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO

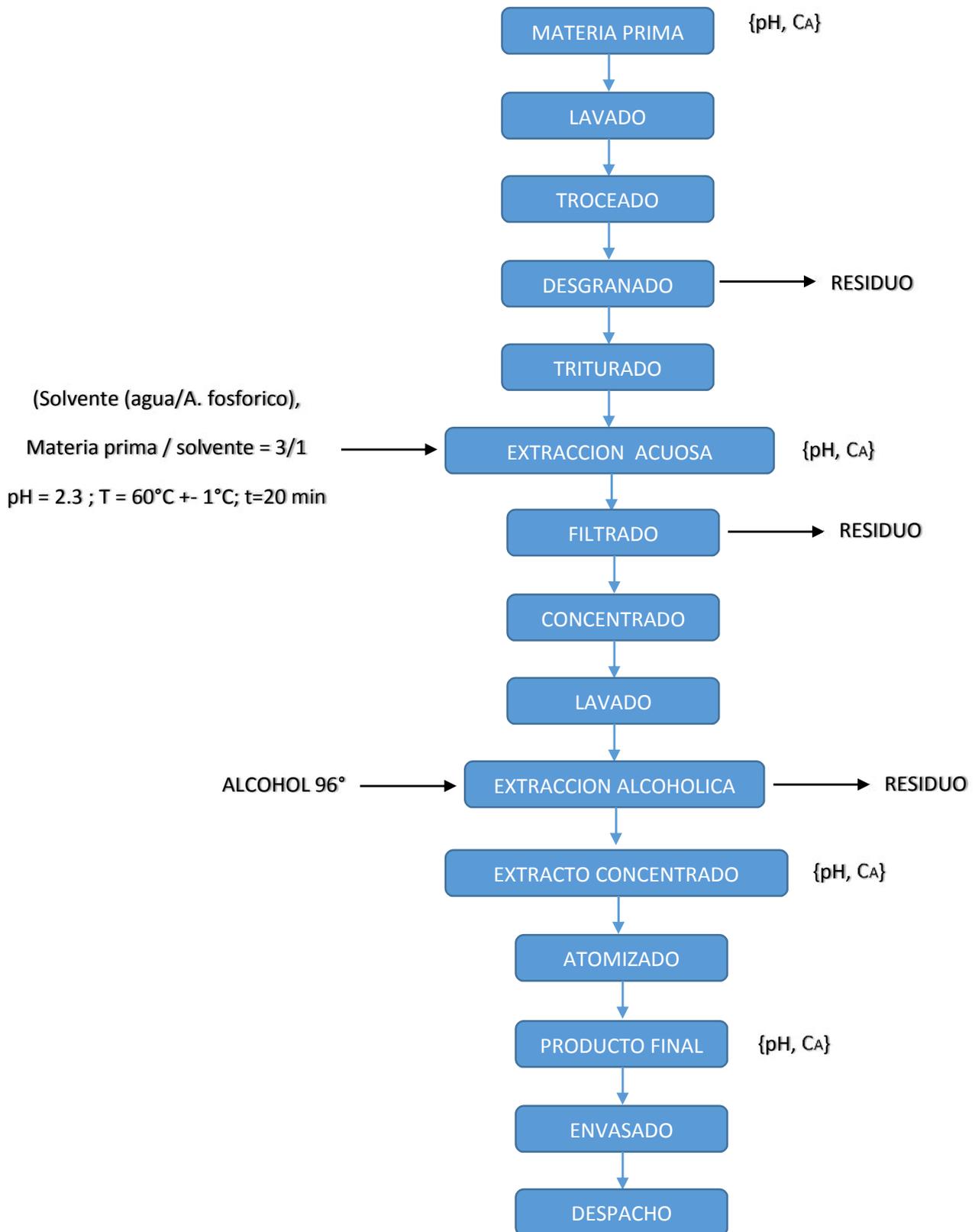


Figura N° 4.1. Obtención de los extractos de antocianina.

4.3 FLUJOGRAMA DE BALANCE DE MATERIA

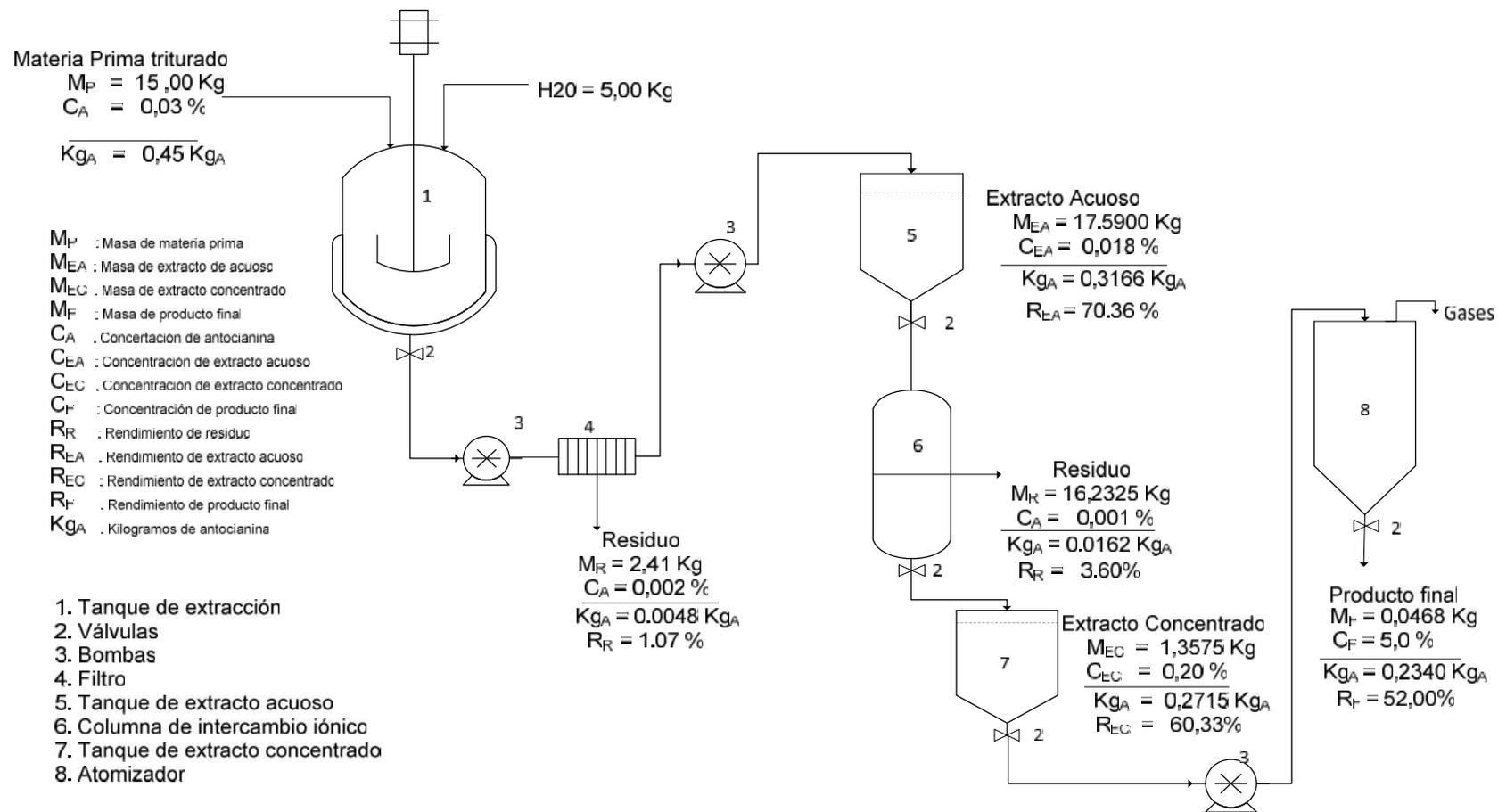


Figura N° 4.2. Flujoograma de balance de materia

CONCLUSIONES

1. La temperatura de extracción óptima fue de $60\pm 1^{\circ}\text{C}$, un tiempo de extracción de 20 min, a un pH 2,30 con un rendimiento de 70,36% en base a la materia como extracto acuoso y de antocianina 0,018 % de concentración. La caracterización de la muestra de extracto de antocianina de granada mediante colorimetría presenta una tendencia hacia el rojo y amarillo.
2. La cuantificación de la muestra de granada en estudio reportó 0,03% inicial (como materia prima), y 5,0% como producto final en concentración de antocianina en polvo con humedad de 5,05%.
3. La degradación de las antocianinas presentes en el extracto obtenido por extracción sólido-líquido aumentó con la temperatura y tiempo de calentamiento o de almacenamiento. Las antocianinas almacenadas en temperatura a 10°C fueron más estables frente a las temperaturas de 23°C y 35°C de almacenamiento por la destrucción de perfil de antocianina.
4. Según el reglamento (UE) N° 231/2012, COMISION EUROPEA, el producto final de antocianina de granada debe encontrarse dentro de la especificación indicadas incluyendo a los residuos de disolvente y metales pesados, tal como ocurre con el producto obtenido.
5. El pigmento de antocianina de granada no presenta alteraciones organolépticas, porque es añadido en pequeña porción, su función es mejorar los colores presentes naturalmente en los alimentos que son normalmente incoloros. Los aditivos de color también se utilizan para compensar los efectos de la pérdida de color durante el proceso de fabricación debido a la exposición a la luz, cambios en la temperatura, la humedad, y las condiciones de almacenamiento.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda estudiar la extracción del colorante y la estabilidad en el almacenamiento a otros valores de pH diferentes a los estudiados.
2. Evaluar la estabilidad del extracto colorante de antocianinas en el periodo de almacenamiento a las condiciones de pH en las cuales las antocianinas son más estables.
3. Investigar la obtención de antocianina con otros solventes diferentes a los empleados en este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alighourchi, H., Barzegar, M. & Abbasi, S. Eur., "European food research and technology", July 2008, volumen 227, issue 3, p. 881 – 887.
2. Andreu Sevilla AJ, Signes Pastor AJ, Carbonell Barrachina AA (2008). "La granada y su zumo. Producción, composición y propiedades beneficiosas para la salud". Al Eq. México, p. 234: 36-39.
3. Armendáris, J., 2002, "Procesos de cocina" Thomson editores Spain paraninfo, Madrid, España.
4. Badui, S., 1988, "Química de los Alimentos", Editorial Alhambra, p. 274-284, Distrito Federal, México.
5. Brennan, J., 2008, "Manual del procesado de los alimentos", Editorial Acribia SA, Zaragoza, España
6. Carrasco, C., 2002, "¿Qué es color? ¿Podemos medirlo? Junta de Andalucía. Andalucía-España.
7. Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. Food Chemistry, 113: ppp. 859–871.
8. Centeno, M., 2003, "Extracción, estabilización y evaluaciones analíticas del Camín" Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada, Instituto politécnico nacional, Mexico D.F, Mexico.
9. Corrales, M., 2001, "Nuevos aditivos en la alimentación". CARTIF (Boletín nº 3), España p. 5.
10. Cubero, N., Monteferrer, A. y Villalta, J., 2002, "Aditivos alimentarios" Colección tecnología de alimentos, Ediciones Mundi-prensa, Madrid, España.
11. Cuevas, E., Antezana, A. y Winterhalter, P., 2008, Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*zea mays*) Bolivariano". Universidad Mayor San Simón de Cochabamba, Bolivia.
12. Du C.T.; Wang P.L.; Francis, F.J. 1975. Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. J.Food Sci 40 417-418.
13. Durst, R. y Wrolstad, R., 2001, "Separation and characterization of anthocyanins by HPLC", Handbook of food Analytical Chemistry, New Jersey, USA, p.33, 45.

14. Espín, J.C., Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. and García-Viguera, C. 2000. Antocyaninbased natural colorants: a new source of antiradical activity for foodsruuff. *J. Agric. Food Chem*, p. 48: 1588-92.
15. Fennema, O., 1985, "Introducción a la ciencia de los alimentos" Editorial Reverte S.A., Vol. 2, Barcelona España.
16. Fennema, O., 2000, "Química de los alimentos". Editorial Acribia S.A, Zaragoza, España, p. 1095.
17. Garzón, GA. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13: 27–36.
18. Gil MI, Tomás Barberán (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. EE.UU.
19. Gil, M. Isabel; Tomás-Barberán, Francisco Hess-Pierce, B.; Holcroft D. M.; Kade, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and procesing. *J. of Agric. Food Chem*,p. 48: 4581-4589.
20. Grupo Latino, 2009, "Volvamos al campo, manual del ingeniero de alimentos" Editorial Grupo Latina, p. 159, Colombia.
21. Guevara, J., 2010, "Empacado de alimentos", Editorial Trillas, p.13, Distrito Federal, México.
22. Halliwell, B. y Whiteman, M., 2004, "Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in vivo and in Cell Culture: How Should you do it and what do the Results Mean?", *British Journal of Pharmacology*, p 142, 231-255.
23. Heras Irin, Alvis Armando, Arrazola Guillermo (2013)"Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera* L.)". Universidad de Córdoba. Colombia.
24. Hong MY, Seeram NP y Herber D. 2008. Pomegranate polyphenols d of androgen – synthesizing genes in human prostate cáncer cells over – receptor. *J Nut Biochem*, p. 19: 848 – 855.
25. Ibarz, A., Barbosa-Cánovas, G., 2005, "Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos" Editorial Mundi-Prensa S.A, Barcelona, España.

26. Iñiguez, M., Ortega, A., Rosales, A., Ayala, R. y Puras, P., 1995, "Estudio de color de los vinos tintos de la D.O.C. Rioja". Estación enológica de Haro, La Rioja, España.
27. Jiménez, A. y Gutiérrez, G., 2001, "Métodos para medir propiedades físicas e industriales de alimentos", 2da edición, Ed. Acribia, España, cap. 4 p. 330-332.
28. Jorge Taipe Rojas 2016. Gerente General Agrícola Wambra S.A.C. variedades de granada p. (26-32). "El cultivo del granado experiencia peruana".
29. Keith, M., Jebhoy, K., Langer, A., Kurian, R., Barr, A., O'Kelly, B. Y Sole, M., 2001, "A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure". American Journal of Clinical Nutrition, Vol 73, p. 219, 224.
30. Kohno H. Suzuki R, Yasui Y, et al. "Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats". Cancer Sci 2004, p. 95:481-6.
31. Kuskoski, E., Asuero, A., Garcia, M., Troncoso, A. y Fett, R., 2004, "Actividad antioxidante de los pigmentos antocianos" Departamento de análisis químico y Departamento de bioquímica, bromatología y toxicología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
32. La FDA (Food and Drug Administration o Agencia de Drogas y Alimentos), en la Cláusula Delaney de 1958.
33. Lahoz, C., Peña, R. y Mostaza, J., 2000, "¿Se deben de recomendar antioxidantes para la prevención cardiovascular?" Revista Clínica Española, Vol 4, España, p. 36, 41.
34. Lansky, E.P., Newman, R. A., 2007. "*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cáncer. Journal of Ethnopharmacology".p. 109(2), 177- 206.
35. Lisco, G., 2000, "Lista de aditivos, colorantes" <http://milk.sci.unizar.es/adit/colomant> (Octubre, 2010).
36. López, R., Casp, A., 2004, "Tecnología de mataderos", tecnología de los alimentos, Ed Mundi prensa, Mexico D.F, Mexico.
37. Madrid, A., Gómez, J., Santiago, F., Madrid, J. y Cenzano, J., 2003, "Refrigeración, congelación y envasado de los alimentos", Ed. Mundi Prensa, Madrid, España.

38. Marina Zapata, Luz (2014) "Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria". Universidad Politécnica de Valencia. España.
39. Melgarejo P. (2010). "El granado, su problemática y usos". I Jornadas nacionales sobre el granado. Elche mollar. España.
40. Moldovan B, David L, Chi bora C, Cimpoiu C. (2012). "Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent". *Molecules* 2012, 17: p. 11655-11666.
41. Morton J. 1987. "Pomegranate (*púnica granatum* L.) In: JF morton (ed.) fruits of Warm Climates". Julia F. Morton, Miami, FL, p. 352-355.
42. O.A. López – Mejía et al. / temas selectos de Ingeniería I-4 (2010): 64-73. "Granada (*púnica granatum*)". Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y ambiental, Universidad de las Américas, pueblas.
43. Origen y aspectos históricos. https://es.wikipedia.org/wiki/Punica_granatum.
44. Pérez Sauñi, Hugo Fernando (2014). "Utilización de la antocianina del maíz morado (*Zea Mays* L.) y *Stevia* (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) en la elaboración de un producto tipo mermelada y su aceptabilidad. Tesis Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú".
45. Promperu <http://www.andina.com.pe/agencia/noticia-exportaciones-granada-peruana>.
46. Proyectacolor., 2011, "el modelo CIE WYZ" http://www.proyectacolor.cl/aplicacion_-_del_-_color/modelos_-_de_-_color/modelo-cie/.
47. Quintero, R., Mariano, G. y Lopez, A., 2002, "Biotecnología alimentaria", Editorial Limosa, Mexico.
48. Ranken, M., 2003, "Manual de industrias de la carne" Ed Mundi prensa, Madrid, España.
49. REGLAMENTO (UE) N° 231/2012 DE LA COMISIÓN de 9 de marzo de 2012 por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo. E 163 ANTOCIANINAS, p.L83/54.

50. Rosa Mondragón, j. Enrique Julia, Antonio Barba, Juan Carlos Jarque, 2013. "El proceso de secado por atomización: formación de gránulos y cinética de secado de gotas", Vol 52, 4, p. 159-168.
51. Rosenstiel, F., F. e Fujimoto, J., 2009. "Descripción de color, proceso de replicación del color y estética"Prótesis fija contemporánea", Cuarta Edición, Elsevier España, Barcelona- España, p 711.
52. Sanchez C., Carbonell A. (2011). "La Fruta Granada Cultivada en España". Universidad Miguel Hernández. Departamento tecnológico Agroalimentario. España
53. Satomi H. Umemura K.; Ueno A.; Hatano T.; Okuda T.; Noro T. (1993). "Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of Punica granatum L". Biological & Pharmaceutical Bulletin, p. 787–790
54. Schwartz, S., 1998, "Pigment analysis. Food Analysis": Introduction Chemical analysis of foods Nº 6. Vol. 17: p. 846-847.
55. Ullauri, P., 2010, "Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido" Editorial Reciteia, Cali, Colombia.
56. USDA, 2009. "National Nutrient Database for Standard United States Department of Agriculture". [http:// www.nal.usda.gov/lnic/foodcomp/search](http://www.nal.usda.gov/lnic/foodcomp/search), accesada 10/02/10.
57. Venereo, J., 2002, "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes" Revista cubana de medicina militar, Cuba.
58. Wrolstad, R., 2004, "Anthocyanins pigments-bioactivity and coloring properties", Journal of Food Science, p. 419,421.
59. Zeiger, E. y Taiz, L., 2006, "Fisiología vegetal", Colección ciencia experimentales, Vol. 1, Castellon, España.

ANEXOS

CERTIFICADO DE ANÁLISIS

1. INFORMACION GENERAL

PRODUCTO : ANTOCIANINA DE GRANADA
LOTE N° : 16M001
PESO NETO : 30g
MUESTRA : INVESTIGACION Y DESARROLLO
FECHA DE FABRICACION : 12 de febrero del 2016
FECHA DE VENCIMIENTO : 12 de febrero del 2017

2. INFORMACION TECNICA

DESCRIPCION	ESPECIFICACIONES	RESULTADO
Apariencia	Polvo fino	Conforme
Color	Morado rojizo oscuro	Conforme
Concentración	De 5.0- 7.0% de antocianina	5.45%
Humedad	No mayor a 12%	5..05%
Mercurio (*)	No mayor a 1 mg/Kg	Conforme
Arsénico (*)	No mayor a 1 mg/Kg	Conforme
Cadmio (*)	No mayor a 1 mg/Kg	Conforme
Plomo (*)	No mayor a 2 mg/Kg	Conforme
Metales pesados (*)	No mayor a 40 mg/Kg	Conforme
Recuento total de microorganismos	No mayor a 1000 ufc/g	<10
Hongos	No mayor a 100 ufc/g	<10
Levaduras	No mayor a 100 ufc/g	<10
Detección de Salmonella	Ausente / 25g	Ausente

(*)Corresponde a evaluaciones periódicas, no por lote

12 de febrero del 2017



Ing. Maria Isabel Rojas Vargas

SUB GERENTE DE GESTION DE CALIDAD

ESPECIFICACIÓN TÉCNICA

1. **NOMBRE:** ANTOCIANINA DE GRANADA (EEC No: E 163)
2. **DESCRIPCION:** Es uncolorante natural para alimentos el cual se obtiene de las extracciones acuosas de la granada (*púnica granatum*) seguido de un proceso de concentración y secado posteriormente por atomización.
3. **ESPECIFICACIONES DEL PRODUCTO:**
 - Apariencia : Polvo fino, color morado rojizo oscuro.
 - Concentración : 5.0% - 7.0% de Antocianina.
 - Solubilidad : Soluble en agua hasta 0.8% (w/w) y en soluciones hidroalcohólicas.
 - pH (1%) : 2.0 – 3,5.
 - Estabilidad : pH : 2.0 - 4.0
Estable a la luz y al calor
 - Tonalidad : Rojo naranja a rojo vino (pH ácido).
4. **ESPECIFICACION FISICOQUIMICAS:**
 - Dióxido de sulfuro : Ausente
 - Arsenico : No mayor a 1 mg/Kg
 - Plomo : No mayor a 2 mg/Kg
 - Mercurio : No mayor a 1 mg/Kg
 - Cadmio : No mayor a 1 mg/Kg
 - Metales pesados (como Pb) : No mayor a 40 mg/kg
5. **ESPECIFICACIONES MICROBIOLÓGICAS:**
 - Recuento de Microorganismos Aerobios mesófilos : No mayor a 1000 ufc/g
 - Hongos : No mayor a 100 ufc/g
 - Levaduras : No mayor a 100 ufc/g
 - Detección de salmonella : Negativo / 25 g
6. **APLICACIONES:** El producto es usado en la industria alimentaria para la coloración refrescos, jugos, bebidas alcohólicas, dulces, caramelos, etc.
7. **EMPAQUES:** Tambores de cartón con doble bolsas interior de polietileno de 5, 25y 50 kg.
8. **ALMACENAJE:** Este producto debe ser almacenado en recipientes cerrados, protegidos de la luz y humedad excesiva, a temperaturas no mayores a 30° C
9. **VIDA ÚTIL:** 1 año, en condiciones adecuadas de almacenamiento.
10. **LEGISLACIÓN:** El producto cumple con las especificaciones de EEC – E163 de la Antocianina en el CODEX alimentario.

INFORME DE ENSAYO N° 3-02369/16

Pág. 1/1

Solicitante : **GLOBENATURAL INTERNATIONAL S.A.**
 Domicilio Legal : Alameda San Marcos N° 1455 Urb. Huertos de Villa – Chorrillos – Lima
 Producto Declarado : **ANTOCIANINA DE GRANADA**
 Cantidad de muestra : 01 muestra x 50 g.
Muestra proporcionada por el Solicitante
 Identificación de la muestra : **LOTE: 16M001**
 Forma de Presentación : En empaque aluminizado, sellado y conservado a temperatura ambiente.
 Fecha de recepción : 2016 – 03 – 15
 Fecha de inicio del ensayo : 2016 – 03 – 16
 Fecha de término del ensayo : 2016 – 03 – 21
 Ensayo realizado en : Laboratorio de Físico Química
 Identificada con : **H/S 16004242 (EXAI-05156-2016)**
 Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.

Ensayo	Resultados
Solventes Residuales	
Etolanol (mg/kg) LC = 120,96 mg/kg	< 120,96
Metanol (mg/kg) LC = 125,84 mg/kg	< 125,84

LC: Límite de cuantificación

Método:
Solventes Residuales: USP -35.2012, vol 1, pp 200/212. Disolventes residuales (por Cromatografía de gases)

OBSERVACIONES

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.
 Los resultados de los análisis no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

 Callao, 23 de Marzo de 2016
 JM

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. ROSA PALOMINO LOO
 C.I.P. N° 40302
 JEFE DE COORDINACIÓN DE LABORATORIOS

CALLAO

 Oficina Principal
 Av. Santa Rosa 601, La Perla - Callao
 T. (511) 319 9000

info@cerper.com - www.cerper.com

CHIMBOTE

 Av. José Carlos Mariátegui s/n
 Centro Cívico, Nuevo Chimbote
 T. (043) 311 048

PIURA

 Urb. Angamos A - 2 - Piura
 T. (073) 322 908 / 9975 63161

INFORME DE ENSAYO N° 3-02369/16

Pág. 1/1

Solicitante : **GLOBENATURAL INTERNATIONAL S.A.**
 Domicilio Legal : Alameda San Marcos N° 1455 Urb. Huertos de Villa – Chorrillos – Lima
 Producto Declarado : **ANTOCIANINA DE GRANADA**
 Cantidad de muestra : 01 muestra x 50 g.
Muestra proporcionada por el Solicitante
 Identificación de la muestra : **LOTE: 16M001**
 Forma de Presentación : En empaque aluminizado, sellado y conservado a temperatura ambiente.
 Fecha de recepción : 2016 – 03 – 15
 Fecha de inicio del ensayo : 2016 – 03 – 16
 Fecha de término del ensayo : 2016 – 03 – 21
 Ensayo realizado en : Laboratorio de Físico Química
 Identificada con : **H/S 16004242 (EXAI-05156-2016)**
 Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita.

Ensayos	Resultados
Arsénico (mg/kg) (LC = 0,06 mg/kg)	0,09
Plomo (mg/kg) (LC = 0,034 mg/kg)	< 0,034
Cadmio (mg/kg) (LC = 0,006 mg/kg)	< 0,006
Mercurio (mg/kg) (LC = 0,01 mg/kg)	< 0,01
Metales Pesados (expresados como Pb) (mg/kg) (LC= 20 mg/kg)	< 20

LC: Limite de cuantificación

Métodos:

Plomo, Cadmio, Mercurio y Arsénico: NOM – 117 – SSA1 – 1994: Bienes y servicios. Métodos de prueba para la determinación de cadmio, arsénico, plomo, estaño, cobre, hierro, zinc y mercurio en alimentos, agua potable y agua purificada por espectrometría de absorción atómica.

Metales Pesados (expresados como Pb): Food Chemicals Codex Third Edition 1981. Pág. 512-513.

OBSERVACIONES

Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.

Los resultados de los análisis no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

 Callao, 23 de Marzo de 2016
 JM

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. ROSA PALOMINO LOO
 C.I.P. N° 40302
 JEFE DE COORDINACIÓN DE LABORATORIOS

CALLAO
 Oficina Principal
 Av. Santa Rosa 601, La Perla - Callao
 T. (511) 319 9000

CHIMBOTE
 Av. José Carlos Mariátegui s/n
 Centro Cívico, Nuevo Chimbote
 T. (043) 311 048

PIURA
 Urb. Angamos A - 2 - Piura
 T. (073) 322 908 / 9975 63161

info@cerper.com - www.cerper.com

INFORME DE ENSAYO N° 3-09652/16

Pág. 1 / 1

Solicitante : **GLOBENATURAL INTERNATIONAL S.A**
 Domicilio Legal : Alameda San Marcos N° 1455 Urb. Huertos de Villa – Chorrillos - Lima
 Producto Declarado : **ANTOCIANINA DE GRANADA**
 Cantidad de muestra : 01 muestra x 50 g.
Muestra proporcionada por el Solicitante
 Forma de Presentación : En bolsa de polietileno, sellada y conservada a temperatura ambiente
 Identificación de la muestra : 16M001
 Fecha de recepción : 2016-03-15
 Fecha de inicio del ensayo : 2016-03-16
 Fecha de término del ensayo : 2016-03-21
 Ensayo realizado en : Laboratorio de Físico Química
 Identificada con : **H/S 14017111 (18991)**
 Validez del documento : Este documento es válido solo para la muestra descrita

Ensayo	Resultado
Sulfitos (exp. como mg SO ₂ /kg) (LC = 10 mg SO ₂ /kg)	< 10

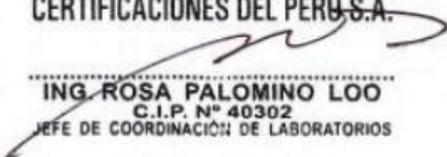
LC: Limite de cuantificación

Método:
Sulfitos: AOAC 990.28 c47, 19 th Ed. 2012. Sulfites in Foods. Optimized Monier-Williams Method.

OBSERVACIONES

 Prohibida la reproducción total o parcial de este informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.
 Los resultados de los análisis no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

 Callao, 23 de Marzo 2016
 DV

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. ROSA PALOMINO LOO
 C.I.P. N° 40302
 JEFE DE COORDINACIÓN DE LABORATORIOS

CALLAO

 Oficina Principal
 Av. Santa Rosa 601, La Perla - Callao
 T. (511) 319 9000 F: (511) 420 4128
 info@cerper.com - www.cerper.com

CHIMBOTE

 Av. José Carlos Mariátegui s/n Centro Civico
 Urb. Buenos Aires, Nuevo Chimbote
 T. (043) 311 048 F: (043) 314 620
 info@cerper.com - www.cerper.com

PIURA

 Urb. Angamos A - 2 - Piura
 T. (073) 322 908 / 9975 63161
 info@cerper.com - www.cerper.com

E 163 ANTOCIANINAS**Sinónimos****Definición**

Las antocianinas se obtienen mediante maceración o extracción con agua sulfitada, agua acidificada, dióxido de carbono, metanol o etanol a partir de las cepas de hortalizas y frutas comestibles, con su posterior concentración o purificación en caso necesario. El producto resultante puede transformarse en polvo en un proceso de desecado industrial. Las antocianinas contienen componentes comunes del material de origen, como antocianina, ácidos orgánicos, taninos, azúcares, minerales, etc., pero no necesariamente en las mismas proporciones que se encuentran en el material de origen. El etanol puede estar presente de forma natural como resultado del proceso de maceración. El agente colorante es la antocianina. Los productos se comercializan según la intensidad del color, determinada mediante análisis. El contenido en color no se expresa en unidades cuantitativas.

Índice cromático**EINECS**

208-438-6 (cianidina); 205-125-6 (peonidina); 208-437-0 (delfinidina); 211-403-8 (malvidina); 205-127-7 (pelargonidina); 215-849-4 (petunidina)

Denominación química

Cloruro de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavilio (cianidina)

Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3'-metoxi-flavilio (peonidina)

Cloruro de 3,4',5,7-tetrahidroxi-3',5'-dimetoxi-flavilio (malvidina)

Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-1-benzopirilio (delfinidina)

Cloruro de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-5'-metoxi-flavilio (petunidina)

Cloruro de 3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-1-benzopirilio (pelargonidina)

Fórmula química

Cianidina: $C_{15}H_{11}O_6Cl$

Peonidina: $C_{16}H_{13}O_6Cl$

Malvidina: $C_{17}H_{15}O_7Cl$

Delfinidina: $C_{15}H_{11}O_7Cl$

	Petunidina: C ₁₆ H ₁₃ O ₇ Cl	
	Pelargonidina: C ₁₅ H ₁₁ O ₅ Cl	
Peso molecular	Cianidina: 322,6	
	Peonidina: 336,7	
	Malvidina: 366,7	
	Delfinidina: 340,6	
	Petunidina: 352,7	
	Pelargonidina: 306,7	
Análisis	E _{1cm} ^{1%} 300 para el pigmento puro a 515-535 nm a pH 3,0	
Descripción	Líquido, polvo o pasta rojo púrpura, con un ligero olor característico	
Identificación		
Espectrometría	Máximo en metanol con 0,01 % de HCl concentrado	
	Cianidina: 535 nm	
	Peonidina: 532 nm	
	Malvidina: 542 nm	
	Delfinidina: 546 nm	
	Petunidina: 543 nm	
	Pelargonidina: 530 nm	
Pureza		
Residuos de disolventes	Metanol	No más de 50 mg/kg
	Etanol	No más de 200 mg/kg
Dióxido de azufre	No más de 1 000 mg/kg por porcentaje de pigmento	
Arsénico	No más de 3 mg/kg	
Plomo	No más de 2 mg/kg	
Mercurio	No más de 1 mg/kg	
Cadmio	No más de 1 mg/kg	

Pueden utilizarse lacas de aluminio de este color.