

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**Extracción y Caracterización del Colorante del Fruto Almendra de la India
(*Terminalia catappa*)**

T E S I S

Por:

GLORIA ANGÉLICA LÓPEZ VALDEZ

Presentada como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Abril 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

"ANTONIO NARRO"

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Extracción y Caracterización del pigmento del fruto Almendra de la India
(*Terminalia catappa*)

TESIS

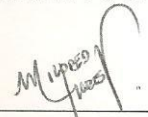
Presentada por:

GLORIA ANGÉLICA LÓPEZ VALDEZ

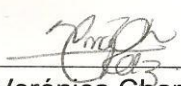
Que se somete a consideración del H. Jurado Examinador como Requisito Parcial
para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

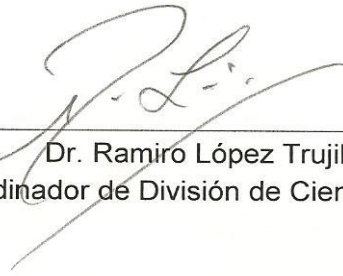

M.C. María Hernández González
Presidente


M.C. Mildred Flores Verástegui
Sinodal


Dra. Catalina Pérez Berumen
Sinodal


Dra. Verónica Charles Rodríguez
Suplente




Dr. Ramiro López Trujillo
Coordinador de División de Ciencia Animal

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.

Abril 2012

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, **mi Alma Mater**, por haberme dado la oportunidad de Estudiar una Licenciatura y darme el derecho de luchar por ser una mejor persona y lograr mis objetivos en el mundo ¡Mil gracias!

Al **Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, así como a los profesores que lo integran, por sus pequeñas o amplias aportaciones que me brindaron durante mi estancia en esta Universidad así como por las atenciones mostradas durante mi formación y el desarrollo de la presente investigación.

A la **M.C. María Hernández González**, por compartirme una parte del amplio conocimiento que tiene, muchas gracias por el tiempo que dedico a la presente investigación, así como por los consejos que me brindo en clases y como persona, pero sobre todo por la amistad brindada en todos estos días que hemos pasado juntas. Mil gracias por haber hecho posible mi sueño.

A la **M.C. Mildred**, por compartirme parte de sus conocimientos y sabiduría que día con día ha cultivado con sus experiencias en la vida, gracias por ayudarme a hacer posible la elaboración de esta investigación y brindarme la confianza que hizo posible tener una buena comunicación. Gracias maestra Mildred.

A la **Dra. Catalina Pérez Verume** y la **Dra. Verónica Charles Rodríguez**, por el apoyo y tiempo brindado para hacer posible esta investigación. Gracias y que Dios las bendiga.

A **mis grandes amigos**: Saira Lizbeth, María Guadalupe, Karla Fernanda, Bertha, German Cuapio, Jesús Inocente, Erick Diego, Iván Isaí, Jorge Siller, Daniel Siller, Paul Cristian, Ulises Solís, Ever; a cada uno gracias por haberme brindado su cariño y confianza y, por ayudarme a ignorar la soledad gracias.

DEDICATORIA

A **Dios** por iluminarme con el milagro mas gran de este mundo la vida; por permitirme concluir una más de mis metas trazadas en esta nueva etapa que hoy concluye; y sin más, el comienzo de un largo caminar.

A mis padres:

Sra. Gloria Valdez Vázquez

Ing. Enrique López Bernal

Por compartir esta gran aventura conmigo y por creer en mí; por sus consejos y por enseñarme que la humildad y la voluntad son parte de los laureles que coronan el éxito. ¡Gracias papis, los amo!

A mis hermanos **Graciela Guadalupe, José Enrique, Pedro Javier, Luis Enrique, Bill Eduardo, Manuel Isaac, Paloma Itzel, Blanca Zeltzin**; por su amistad y apoyo, por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos y que nos han marcado día con día. Hoy ustedes forman parte de un éxito más. Los quiero mucho hermanitos.

A mis suegros la **Sra. Angelina López López** y el **Sr. Mariano López López** y a mis cuñadas **Mariana López López** y **Verónica López López**; por el apoyo incondicional que hasta el día de hoy me han brindado, por el cariño y por sus consejos, mil gracias.

Con mucho amor y cariño dedico este trabajo a mi esposo **Francisco Javier López López** y a mi princesita **Samaria Daniela López López** que aunque no he podido compartir todos los momentos de felicidad con mi niña, nuestro señor sabe que ella representa lo más importante en este mundo para mí; que la amo con todo mi corazón y que por ella hoy concluyo una más de mis metas esperando ser una mejor persona tanto en lo social como en lo laboral. ¡Te amo mi niña hermosa!

Y a ti mi amor gracias por comprenderme y apoyarme en los buenos y malos momentos que hemos pasado juntos; y claro muchas gracias por soportarme. Te amo y gracias por el regalo más grande que me has dado. ¡Mi princesa!

¡A cada uno de ustedes que Dios los Bendiga!

ÍNDICE

	Página
Índice	VI
Índice de figuras.....	VIII
Índice de cuadros	IX
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. Objetivos	14
1.1.1. Objetivos Generales.....	14
1.1.2. Objetivos Específicos	14
1.2. Hipótesis	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. Colorantes	15
2.1.1. Uso de colorantes	15
2.1.2. Clasificación.....	16
2.1.2.1. Colorantes sintéticos.....	17
2.1.2.2. Colorantes naturales	18
2.2. Carotenoides	20
2.2.1. Clasificación.....	21
2.2.1.1. Hidrocarburos.....	21
2.2.1.2. Compuestos oxigenados	22
2.2.2. Métodos de extracción para carotenoides	22
2.3. Flavonoides	24
2.3.1. Antocianinas	25
2.3.1.1. Estructura de las antocianinas.....	26
2.3.1.2. Espectro de absorción.....	27
2.3.1.3. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas	28
2.3.1.4. Métodos de extracción de antocianinas.....	30

2.3.2.	Caracterización de antocianinas	31
2.3.3.	Cuantificación de antocianinas	32
2.3.4.	Antocianinas como colorantes naturales	33
2.4.	Almendo de la India (<i>Terminalia catappa L.</i>)	33
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1.	ETAPA 1. Obtención y condiciones de la muestra	40
3.1.1.	Preparación de la muestra seca	40
3.1.2.	Preparación de la muestra fresca	41
3.2.	ETAPA 2. Extracción del colorante	41
3.2.1.	Extracción por solventes orgánicos en fruto seco	41
3.2.2.	Extracción por solventes orgánicos en fruto fresco	42
3.3.	ETAPA 3. Caracterización del colorante	43
3.3.1.	Eliminación del solvente por evaporación	43
3.3.2.	Espectro infrarrojo	44
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1.	ETAPA 1. Obtención y condiciones de la muestra	45
4.1.1.	Preparación de la muestra seca	45
4.1.2.	Preparación de la muestra fresca	45
4.2.	ETAPA 2. Extracción del colorante	46
4.2.1.	Extracción por solventes orgánicos en fruto seco	46
4.2.2.	Extracción por solventes orgánicos en fruto fresco	47
4.2.3.	Selección del solvente con mayor concentración de colorante	47
4.2.4.	Análisis del solvente con respecto al tiempo de extracción	48
4.3.	ETAPA 3. Caracterización del colorante	50
5.	CONCLUSIONES	55
6.	ANEXOS	56
7.	LITERATURA CITADA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de los colorantes.....	16
2	Estructura base del grupo flavínico	24
3	Estructura química de los principales flavonoides	25
4	Estructura básica de las antocianinas	27
5	Estructura de antocianinas a diferentes pH's	29
6	Hojas y flores del almendro.....	36
7	Fruto del almendro.....	36
8	Fruto seco.....	36
9	Evaporación del solvente.....	43
10	Extracción del pigmento en fruto seco en diferentes solventes: agua (1), alcohol (2), acetona (3), éter (4) y hexano (5)	46
11	Medias de concentración en base a diferentes solventes.....	47
12	Medias de concentración en base al solvente / tiempo	49
13	Extracto obtenido de la evaporación	51
14	Espectro infrarrojo de la muestra en alcohol	51
15	Espectro infrarrojo de la muestra en acetona.....	52
16	Comparación de los espectros que presentan los mismos compuestos	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros	Página
1	Colorantes sintéticos más utilizados por la Unión Europea (UE)18
2	Colorantes naturales de uso más frecuente que están autorizados en la UE20
3	Sustituyentes de las antocianinas27
4	Métodos de extracción de antocianinas30
5	Clasificación taxonómica.....34
6	Compuestos presentes en almendro de la india (<i>Terminalia Catappa L.</i>) ..37
7	Condiciones para hacer posible la evaporación del solvente.....43
8	Longitud de onda a la cual absorbe el colorante46
9	Resultados del solvente apropiado para la extracción analizados mediante t-Student ($P \leq 0.05$)48

RESUMEN

La presente investigación se realizó con el objetivo de extraer y caracterizar el pigmento presente en el fruto almendra de la india (*Terminalia catappa*). Observando las características del fruto y la pigmentación que presenta, se establecieron dos posibles compuestos que podrían ser los responsables de esa coloración, los cuales se establecieron como carotenoides y antocianinas.

La extracción del pigmento se evaluó en fruto seco y fresco mediante el uso de diferentes solventes; etanol grado analítico y como segunda opción acetona, evaluando ésta en diferentes concentraciones de 10%, 5% y 2.5% en solución acuosa. La extracción del pigmento solo se puede realizar en fruto fresco, siendo la acetona en concentración de 10% la que presenta mayor concentración del pigmento. No podemos afirmar que este es el mejor extractor ya que al contacto con el oxígeno y en cierto tiempo tiende a perder la coloración por la inestabilidad que presenta este compuesto. El alcohol presentó menos concentración del pigmento, pero a diferencia de la acetona.

Éste mantiene la coloración sin modificaciones. La muestra se caracterizó mediante espectroscopía infrarroja FT-IR (ATR), donde se puede observar la región espectral más importante dentro de los $1700 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ la cual permite la absorción de los infrarrojos de los dobles enlaces (C=C) y el pico dentro de los $1640 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ donde ocurre un estiramiento de los dobles del carbonilo; los cuales son característicos de los compuestos de tipo flavínico, por tal motivo no se puede afirmar que el colorante obtenido pertenece al grupo de las antocianinas teniendo en cuenta que también presentan características de tipo flavona y chalcona por lo que se necesitan realizar pruebas específicas para cada una de las muestras y aseverar a que compuesto pertenece el colorante de este fruto.

Palabras clave: Pigmento, Almendro de la India (*Terminalia Catappa*), carotenoides, antocianinas, Espectroscopía Infrarroja FT-IR (ATR).

1. INTRODUCCIÓN

El color de los alimentos es un atributo que tiene mucha influencia dentro del juicio del consumidor. Gracias a su fácil percepción por los sentidos del hombre es la primera propiedad que causa impresión en términos de su forma, textura y color; siendo este último uno de los factores más importantes responsables de la aceptación o rechazo de los alimentos. El aspecto de un alimento es la primera clave de su identificación y con frecuencia predice el grado de satisfacción o placer que se obtendrá al comerlo, de no ser así, las variaciones en la intensidad de color pueden sugestionar al consumidor desconfiando de su calidad (Badui, 1993, Desdosier, 1993).

Los pigmentos vegetales, pueden dividirse en dos grandes grupos, en base a su solubilidad:

- a) Solubles en agua: antocianinas y antoxantinas, que se encuentran en el jugo vacuolar.
- b) Solubles en solventes orgánicos: clorofilas "a" y "b" y carotenoides (rojo, naranja y amarillo), que se encuentran en las granas y tilacoides de los cloroplastos (Lallana, 2003).

La industria alimentaria utiliza una serie de sustancias, mejor conocidas como colorantes que tienen como función primordial impartir alguna coloración en particular o simplemente resaltar la que por la naturaleza de las materias primas y, en su caso, de los procesos tecnológicos se tiene en el producto final. Los aditivos que son utilizados como sustancias colorantes pueden ser obtenidos por síntesis química en la industria (colorantes sintéticos) o provenir de fuentes naturales como los vegetales (colorantes o pigmentos naturales) (Salas, 2003).

En los últimos tiempos los colorantes sintéticos han sido cuestionados debido a sus efectos toxicológicos, inclusive algunos han sido eliminados de algunas legislaciones, tal es el caso del rojo No. 3 o eritrosina el cual se demostró que puede llegar a causar un mal funcionamiento de la tiroides (Vázquez, 2001). Lo anterior ha

aumentado la tendencia que tienen los consumidores, sobre todo en los países desarrollados, a consumir alimentos con un mínimo o nulo contenido de sustancias sintéticas; ello ha provocado que el uso de colorantes naturales haya ido en aumento y en sustitución de los sintéticos. Para abastecer la creciente demanda de colorantes naturales sin problemas de legislación, se procede a la extracción de los pigmentos presentes en los tejidos vegetales o animales por medio de diferentes métodos como son el uso de variados solventes, enzimas, soluciones alcalinas, etc. Cada método presenta sus limitantes y ventajas según el rendimiento a obtener y que propicie ganancias ante su extracción (Salas, 2003).

El grupo natural que reviste la mayor importancia dentro de los compuestos naturales coloreados son los flavonoides, no solo por presentar una gama amplia de diversas coloraciones, sino también porque últimamente se les atribuye un sin número de características funcionales beneficiosas para la salud. Este grupo se divide en: antocianinas, isoflavonas, auronas, flavonas, flavanonas, flavonoles, chalconas, flavandioles y dihidroflavonoides.

Las antocianinas son metabolitos secundarios de gran interés debido a varios factores entre los que destacan: una amplia gama de diversas coloraciones como la azul, roja y violeta, y una gran solubilidad en agua, potenciales beneficios a la salud humana y una inexistente toxicidad. En la actualidad, la demanda de colorantes de naturaleza antociánica es muy alta. Los requerimientos más importantes provienen de la industria alimenticia, debido a que en varios países de la Unión Europea, Sudeste Asiático y Latinoamérica su empleo no presenta restricciones (Cartoya, Reynaldo, 2001).

La extracción de colorantes naturales como anteriormente se menciona se puede realizar a partir de diferentes tejidos vegetales, tal es el caso del fruto del almendro de la india (*Terminalia catappa*), cuyo fruto presenta una coloración roja-violeta característica del grupo de las antocianinas. Lo que orienta que por las características que presenta este fruto es posible extraer el colorante, presentando

una alternativa más dentro de los colorantes utilizados en la industria alimentaria, además de ayudar en la salud de los consumidores.

Siendo este fruto poco consumido por los habitantes de la región y teniendo una mayor aplicación en la alimentación ganadera. El valor principal del árbol de la almendra es de ornamento y de sombra. Su posibilidad de uso como colorante se basa en el encendido color de su follaje antes de la caída de las hojas, por la simetría estratificada de sus ramas y por su forma placentera a la vista, y debido a que crece en una variedad de suelos y en relleno de construcción. Es favorecido en especial cerca del mar debido a que puede soportar el rocío salino (John, 1989).

La importancia del estudio del fruto es muy prometedora, ya que en la actualidad no se tiene una gran gama de información acerca de éste y sus posibles aplicaciones a nivel industrial, siendo uno de los grandes motivos por el que las personas no tienen consciencia sobre la utilidad adecuada del fruto. Con esta investigación se pretende la obtención de un nuevo colorante obtenido a partir de una materia prima disponible que en la actualidad es poco explotada, ya que está considerado un desperdicio, de ahí la gran importancia de esta investigación además de proporcionarle un valor agregado a este recurso beneficiando la economía de la región generando nuevas expectativas de crecimiento.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

- Extraer y caracterizar el pigmento presente en el fruto Almendra de la India (*Terminalia catappa*).

1.1.2. Objetivos Específicos

- Extraer el pigmento del Almendro de la India (*Terminalia Catappa*) mediante el uso de diferentes solventes y tiempos.
- Establecer el tipo de solvente y tiempo adecuado para la óptima extracción del pigmento.
- Caracterizar el pigmento mediante espectroscopía infrarroja FT-IR (ATR).

1.2. HIPÓTESIS

H₀: El pigmento presente en el fruto del Almendro de la India (*Terminalia catappa*) es un carotenoide.

H_i: El pigmento presente en el fruto del Almendro de la India (*Terminalia catappa*) es una antocianina.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Colorantes

La primera sensación percibida en un alimento, que influye ante el consumidor es el color. Los alimentos naturales poseen un color que varían tanto con la estacionalidad de la materia prima como con los tratamientos tecnológicos aplicados en su procesado. Durante el proceso industrial de elaboración de productos alimenticios, se puede presentar en algunos casos una disminución o degradación del color original, así que con el fin de restablecer su apariencia original o estandarizar el color, es necesario la adición de colorantes. Para ello se pueden utilizar sustancias obtenidas de fuentes naturales o procesadas por métodos físicos o químicos (Desdodier, 1983, Mundo alimentario, 2007).

El color resulta uno de los factores más importantes responsables de la aceptación o rechazo de los alimentos, las variaciones en la intensidad de color pueden sugerir al consumidor, visualizando la idea de un mal proceso, o un alimento en mal estado (Desdodier, 1993).

2.1.1. Uso de los colorantes

El uso de colorantes naturales en la industria alimentaria ha captado una gran importancia sobre los colorantes sintéticos, proporcionando una ventaja muy importante sobre la salud de los consumidores.

Muchos de estos colorantes son utilizados principalmente para llamar la atención de los diferentes grupos de consumidores por ejemplo: los productos que van dirigidos al público infantil son coloreados de forma artificial, con la finalidad de llamar la atención de estos consumidores y lo principal hacerlo más atractivos, ya que es el colectivo que más se guía por la vista a la hora de comer. Se utilizan frecuentemente, a menudo en la elaboración de golosinas (Acta, Toxicológica, Argentina, 2003). La mayoría de los alimentos que se consumen día a día son

coloreados artificialmente, como se pueden mencionar: las bebidas, repostería, productos lácteos, cárnicos, etc., por lo que resulta de gran importancia el uso de colorantes que no presenten niveles de toxicidad para los consumidores. Por lo que hoy en día es muy importante volver a la tendencia de utilizar productos de origen natural y cuidar la salud de los consumidores.

2.1.2. Clasificación

La clasificación de los colorantes se puede realizar de diferentes formas, se pueden basar en su procedencia o fuente de origen, en su certificación o por el grupo cromóforo o el radical que provoca un determinado color en su apariencia óptica. De acuerdo a su origen se pueden clasificar en colorantes naturales y sintéticos, como lo muestra la figura 1. (García *et al.*, 1999, Mundo alimentario, 2007). Algunos colorantes artificiales han sido cuestionados en cuanto a sus efectos nocivos a la salud de los consumidores, por lo que las industrias hoy en día tienen una fuerte tendencia por lo natural y de cuidar la salud a través de la alimentación. Por esta razón los colorantes naturales cada día van ganando terreno en las preferencias de las industrias (Mundo alimentario, 2007).

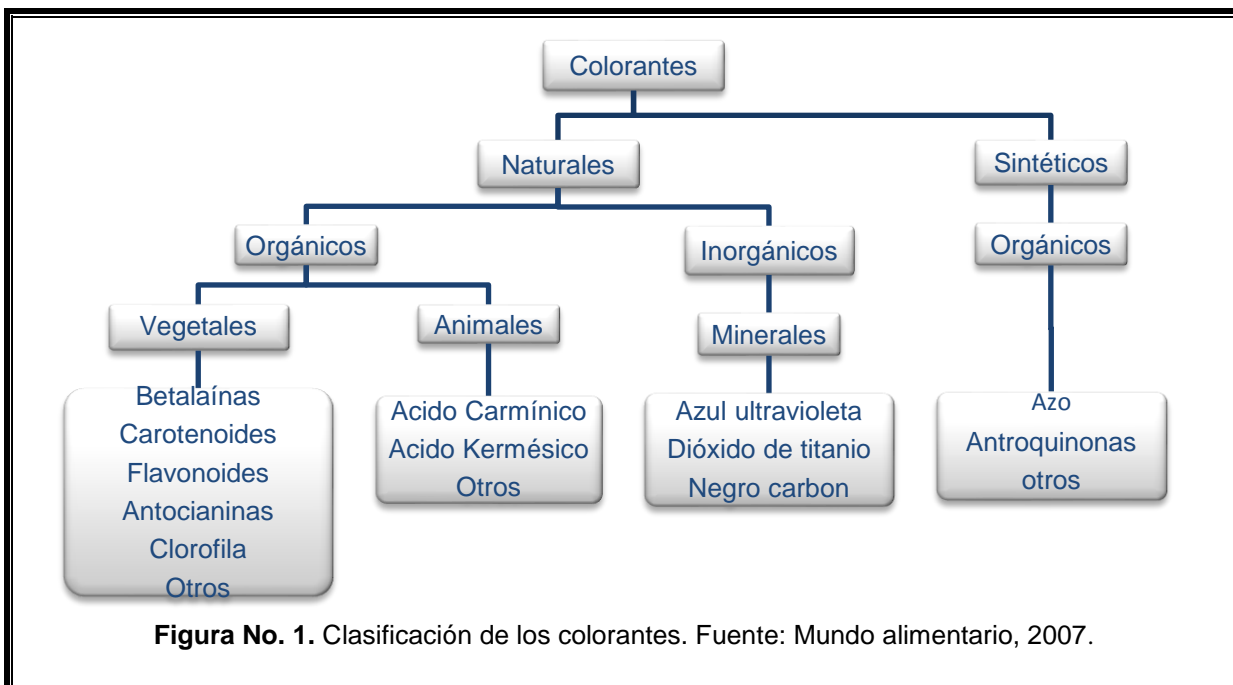


Figura No. 1. Clasificación de los colorantes. Fuente: Mundo alimentario, 2007.

2.1.2.1. Colorantes sintéticos

La utilización de los colorantes sintéticos, alcanzó su apogeo con el desarrollo de la industria de los colorantes orgánicos de síntesis, las razones de su uso como aditivos alimentarios se deben a las ventajas que ofrecen sobre los colorantes naturales. Algunos colorantes artificiales han sido cuestionados recientemente en cuanto a sus efectos nocivos a la salud de los consumidores, por lo que con estudios realizados se ha descubierto que muchos de estos si tienen efectos sobre la salud; tal es el caso de derivados de cobre, plomo y arsénico, que se usaron en años anteriores para colorear algunos alimentos.

En los últimos años el interés de los consumidores por la seguridad de los alimentos ha llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorante artificiales por colorantes naturales.

El uso de colorantes sintéticos se ha restringido notablemente en la mayoría de los países desde 1970, mediante legislaciones que distan sustancialmente en algunos casos, no solo los niveles de dosis permitidos sino también en la aprobación sin restricciones o la prohibición para la misma sustancia. Tal es el caso de rojo 40 que se encuentra totalmente prohibido en Canadá mientras que en Estados Unidos su uso está aprobado permanentemente (Acta Toxicológica Argentina, 2003).

Ello ha llevado a reducir progresivamente el número de colorantes utilizables dentro de la industria alimentaria. En la cuadro No. 1 pueden observarse los colorantes sintéticos más utilizados por la Unión Europea; aunque al contrario de lo que sucede en los otros grupos de aditivos, existen grande variaciones de un país a otro. Además cada colorante tiene por sí mismo un límite que varía según la sustancia de que se trate y del alimento en el que se utilice. La tendencia actual es limitar más aun tanto los productos utilizables como las cantidades que pueden añadirse (Ibáñez et al., 2003).

Cuadro No. 1. Colorantes sintéticos más utilizados por la Unión Europea (UE). Fuente: Ibáñez et al., 2003.

Nombre	Características	Aplicación	Efectos y límites
Cantaxantina	Color rojo estable	Se aplica al pienso de piscifactorías (salmón y trucha).	Se le asocia a lesiones en la retina. IDA: 0.03 mg/kg peso
Tartracina	Color amarillo limón	Productos de repostería, fabricación de galletas, derivados cárnicos, sopas preparadas, conservas vegetales, bebidas refrescantes (condimento sucedáneo del azafrán).	Produce reacción alérgica en sujetos con intolerancia a la aspirina (10%) y en asmáticos (alrededor del 4%). IDA: hasta 7.5mg por kg
Rojo cochinilla	Color de fresa	Confitería, repostería helados y derivados cárnicos.	Efectos cancerígenos discutibles. IDA: hasta 4mg/kg
Amarillo de quinoleína	Color naranja	Bebidas refrescantes y en bebidas alcohólicas.	Se absorbe menos del 3% en el aparato digestivo. IDA: hasta 0.5 mg/kg
Eritrosina	Color fresa poco estable, especialmente en presencia de vitamina C.	Postres lácteos con sabor de fresa. Confitería y derivados cárnicos.	Baja absorción intestinal. IDA: hasta 0.6 mg/kg

2.1.2.2. Colorantes naturales

Los colorantes naturales son considerados, en general como inocuos y las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes sintéticos. La mayoría de los colorantes naturales se encuentran en tejidos vegetales, a excepción del rojo cochinilla (rojo carmín), que se puede obtener de insectos. Solo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo. Estos se

clasifican según su procedencia en: vegetales, animales y minerales (Ibáñez *et al.*, 2003, Multon, 2000).

Los colorantes naturales empleados con mayor frecuencia y ampliamente distribuidos a nivel alimentario son: el color amarillo, naranja y rojo, los cuales se pueden extraer a partir de frutas, raíces, flores, pescados y pájaros, estos contienen este pigmento debido a que los confiere el grupo de los carotenoides (Rodríguez, 1997).

Hoy en día existe una fuerte tendencia en los mercados de volver a lo natural, por lo que es considerable ampliar el uso de colorantes naturales, cuidando la salud a través de la alimentación; ya que al ser naturales proporcionan seguridad para toda aquella persona que consume productos con la adición de colorantes. El cuadro No.2 muestra los colorantes naturales utilizados con más frecuencia y autorizados por la Unión Europea (UE) (Mundo Alimentario, 2007, Salas, 2003, Ibáñez *et al.*, 2003).

Pueden ser compuestos puros o productos de extracción. Los compuestos puros como la riboflavina y el β -caroteno están bien definidos químicamente y pueden ser de origen natural o haber sido obtenidos por síntesis. Los productos de extracción proceden de materias primas alimentarias y pueden estar asociados a numerosas impurezas, los compuestos obtenidos no tienen composición y propiedades de colorantes constantes, lo que hace que la obtención de estas sustancias sea más fácil por síntesis que por procedimientos de extracción (Multon, 2000).

Cuadro No.2. Colorantes naturales de uso más frecuente autorizados en la UE. Fuente: Ibáñez et al., 2003.

Nombre	Obtención	Aplicación	Efectos y límites
Curcumina	Rizoma de la cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>)	Color amarillo intenso (<i>curry</i>). Confituras, mermeladas, etc. Embutidos picados (rudos y cocidos).	Baja absorción en el intestino. Toxicidad reducida. En algunos experimentos realizados con animales se han observado efectos teratógenos.
Cochinilla Carmín Ácido carmínico	Hembras del insecto <i>Dactylopus coccus</i> , parásitos de algunas especies de nopales.	Color rojo muy variable, utilizándose en conservas vegetales, mermeladas, helados, productos cárnicos y bebidas alcohólicas y no alcohólicas.	Se han señalado respuestas alérgicas en sujetos que han consumido bebidas con este colorante. IDA: sin asignar.
Clorofilas	Algas	Color verde característico aplicado a chiche, helados, y bebidas refrescantes.	Aja absorción intestinal. IDA: sin asignar
Caramelo	Calentamiento de azúcar (sacarosa y otros).	Productos de bolletería, repostería y helados. Bebidas de cola y alcohólicas (ron, coñac, etc.).	El 50% del caramelo son azúcares asimilables. Dosis de hasta 18 g/día tienen un ligero efecto laxante. IDA: sin asignar.
Carotenoides	Capsantina: pimiento rojo y del pimentón Licopeno: tomate	Fabricación de embutidos, bebidas refrescantes.	Absorción intestinal muy baja. IDA: 5 mg/kg peso.
Rojo de remolacha Betaína	Remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i>)	Productos de repostería, helados y derivados lácteos dirigidos al público infantil. Bebidas refrescantes, conservas vegetales y mermeladas, conservas de pescado.	Baja absorción intestinal. El colorante absorbido se elimina sin cambios por la orina.

2.2. Carotenoides

Son un grupo de pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en las partes aéreas de las plantas, especialmente en las hojas, tallos, flores, frutos y en menor proporción en raíces (Rodríguez, 1997, Martínez, 2003).

El nombre genérico deriva de la zanahoria, *Daucus carota*, ya que fue en esta hortaliza donde se aislaron por primera vez (Badui, 1993). En la naturaleza se han identificado más de 420 carotenoides, se caracterizan por tener como estructura principal un esqueleto conformado por átomos de carbono que a su vez consiste en unidades de isopreno (Wong, 1989, Fennema, 2000).

Siendo compuestos orgánicos liposolubles de cadenas largas no saturadas, responsables de los colores brillantes como amarillo, naranja, y rojo. La estabilidad es alterada o parcialmente destruida por ácidos, estables a las bases, sensible a la luz, estables a tratamientos de calor y son lipofílicos. Insolubles en agua, pérdidas por lixiviación en lavado y en procesamiento son mínimas (Valdiviezo, Reyes, s/a). En su mayoría este grupo de pigmentos son solubles en solventes apolares (Martínez, 2003).

2.2.1. Clasificación

De acuerdo a Mayer (1950), los carotenoides encontrados hasta ahora en la naturaleza se pueden subdividir en:

1. Hidrocarburos
2. Compuestos oxigenados, que contienen:
 - a) Grupos hidroxílicos, aldehídos y cetónicos
 - b) Grupos carboxílicos

2.2.1.1. Hidrocarburos

Este grupo de carotenoides hidrocarburos, se denominan colectivamente como carotenos (Martínez, 2003). Son compuestos fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano (Rodríguez, 1997).

Los carotenoides hidrocarburos que más destacan dentro de este grupo son: α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno y el licopeno (Mayer 1950). El comúnmente encontrado es el β -caroteno, normalmente constituye entre el 25-30% del contenido total de carotenoides en las plantas (Martínez, 2003).

2.2.1.2. Compuestos oxigenados

Estos compuestos son denominados comúnmente como xantofilas y se caracterizan por contener oxígeno en su cadena. Se presentan como ácidos, aldehídos, alcoholes, y son principalmente solubles en metano y etanol (Rodríguez, 1997).

La luteína es la xantofila más abundante (40-45%), pero siempre se encuentran en menor proporción que el β -caroteno (Martínez, 2003).

2.2.2. Métodos de extracción para carotenoides

Los carotenoides presentan enlaces dobles en sus moléculas, las cuales se descomponen por efecto de la luz, temperatura y el aire. La luz favorece reacciones fotoquímicas que cambian la estructura original del carotenoide, este es un factor importante que hay que considerar al momento de la extracción. Otro factor importante es el calor, el cual también presenta reacciones térmicas de degradación. El aire, debido al oxígeno, favorece la oxidación de los enlaces dobles a funciones epóxido, hidroxilos y peróxidos, entre otros.

Por tales razones la extracción de estos compuestos se debe realizar preferiblemente en condiciones de ausencia de luz, temperatura ambiente o menor y en ausencia de oxígeno. Además se debe realizar lo más rápido posible y a partir de tejidos frescos, esto con la finalidad de evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos. Debido a que los carotenoides en su mayoría son solubles en solventes apolares como éter etílico, benceno, cloroformo, acetona,

acetato de etilo, entre otros; y a que se deben extraer de tejidos frescos, los cuales presentan un alto contenido de agua, se dificulta una extracción eficiente, por lo que es conveniente eliminar dicho contenido de agua.

Un procedimiento recomendable es deshidratar los tejidos con etanol o metanol a ebullición seguido de filtración. El tejido deshidratado se puede extraer con un solvente apolar. Una alternativa a este proceso de deshidratación es la liofilización, la cual resulta ventajosa porque se realiza a baja temperatura y al vacío, eliminando la posibilidad de degradación por altas temperaturas y presencia de aire.

Si en el extracto existen carotenoides esterificados, estos se pueden hidrolizar disolviendo el extracto en un volumen pequeño de hidróxido de potasio 60% alcohólico. Esta mezcla se deja en la oscuridad durante la noche, con atmósfera de nitrógeno, a temperatura ambiente y con agitación magnética, con lo cual los carotenoides son liberados. Si se desea un proceso más rápido, es aconsejable la ebullición durante 5-10 minutos (Martínez, 2003).

De acuerdo con Cid (2004), otros métodos de extracción que se utilizan son los siguientes:

- ✓ Preparación popular: Consiste en una extracción en agua de la planta fresca o seca con la ayuda de calor o en alcohol, en algunos casos se usa la planta fresca machacada, ya sea como cataplasma, jugo o polvo de la planta seca administrado directamente.
- ✓ La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción por maceración a temperatura ambiente con uno a tres disolventes con diferentes polaridades, generalmente diclorometano o hexano, éter o etanol y agua. Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor), hasta alcanzar un estado de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización.

En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar.

- ✓ Otro método utilizado, consiste en una maceración o extracción Soxhlet usando inicialmente un disolvente de amplio espectro (metanol o etanol) y luego un fraccionamiento con diferentes disolventes o mezclas de disolventes que permitan separar las diferentes fracciones por partición.

El método de extracción depende de la textura y contenido de agua en la planta, así como de la sustancia a extraer.

2.3. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en las plantas y en algunos insectos y que les confieren a los organismos vivos una gran variedad de colores. Estos compuestos están formados por un anillo bencénico (anillo A) una cadena lactónica que puede estar abierta o cerrada y otro anillo bencénico (anillo B) tanto el anillo A como el B pueden contener uno o varios grupos o sustituyentes, preferentemente grupos hidroxilos, metoxilos o cadenas alifáticas. Esta gran familia de compuestos químicos se subdivide en subfamilias que presentan cierta variedad en su estructura base como se aprecia en la figura No. 2; por ejemplo, flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, catequinas, leucoantocianinas, antocianinas, auronas y chalconas (Domínguez, 2002), figura No.3 (Leyva, 2009).

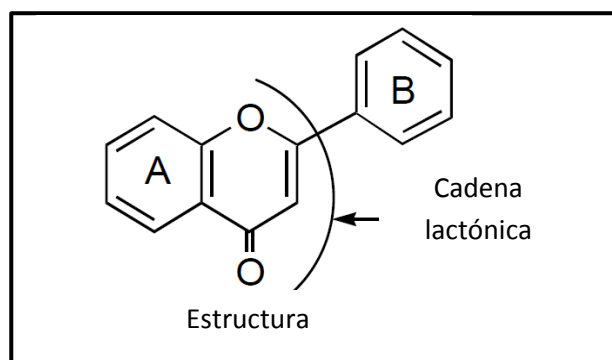


Figura No. 2. Estructura base del grupo flavínico. Fuente: Domínguez 2002.

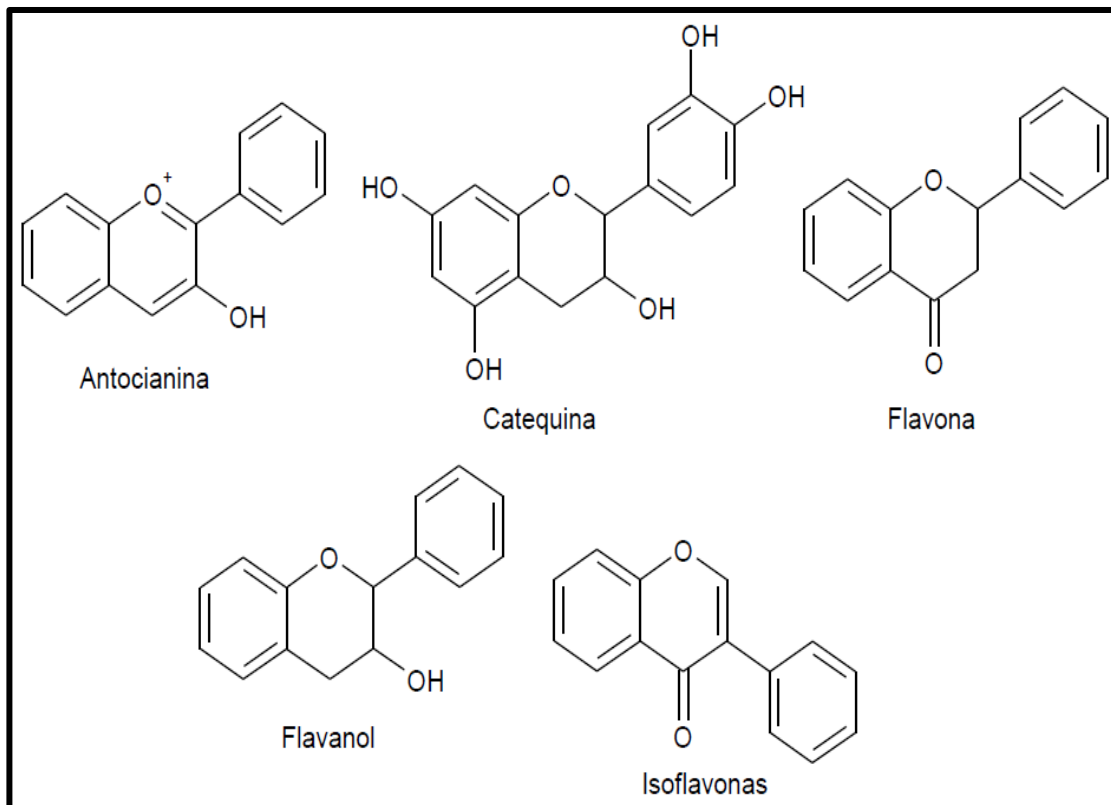


Figura No.3. Estructura química de los principales flavonoides. Fuente: Leyva, 2009.

2.3.1. Antocianinas

Las antocianinas (*del griego anthos flor y kyanos azul*), son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua visibles para el ojo humano (Harbone, 1976). Estos compuestos forman parte de la familia de los polifenoles y se definen como flavonoides fenólicos. En general se conocen más de 100 tipos de antocianinas, de las cuales solo seis son de interés alimenticio pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, malvidina y petunidina (Mazza, 1995). Las antocianinas son derivadas del catión 2-fenilbenzopirilio y debido a la poca solubilidad, no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glucosilada siendo una de más abundantes la cianidina-3-glucósido (Walford, 1980). Las antocianinas se pueden extraer de tejidos frescos por maceración con un solvente ácido por ejemplo la mezcla metanol-ácido, acético-agua o la mezcla metanol/ácido, fórmico/agua.

El término antocianina fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no solo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de las plantas, se deben a este tipo de pigmentos (Lock, 1997). Estos se localizan principalmente en la piel de frutas como manzanas, peras, uvas, zarzamoras, ciruelas y de flores como la jamaica y rosas y verduras como col morada y cebolla morada. La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encarga de la filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés. Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden localizarse en organelos esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos está en operación. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas.

2.3.1.1. Estructura de las antocianinas

Las antocianinas son glucósidos solubles formados por una sola molécula de antocianidina que se une a una fracción de carbohidrato a través de un enlace β -glucosídico y son una de las clases de flavonoides que existen en abundancia, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas (Vargas, et al., 2002). La estructura química de las antocianinas consiste en un grupo flavilo formado por un anillo de benzopirano unido a un anillo fenílico (figura No.4) (Badui, 1993).

El color particular de cada antocianina depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos, un incremento en la hidroxilación produce un color azul, mientras un incremento en la orientación metoxilación produce un color rojo en (cuadro No.3) (Wrosstad, 2001). Es común que una misma antocianidina interaccione con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas; la pelargodina es la que produce el color rojo escarlata de algunas

flores y de las fresa, la delphinidina se encuentra en las berenjenas y la cianidina en col roja, higos, cerezas, ciruelas y otros frutos (Badui, 1993).

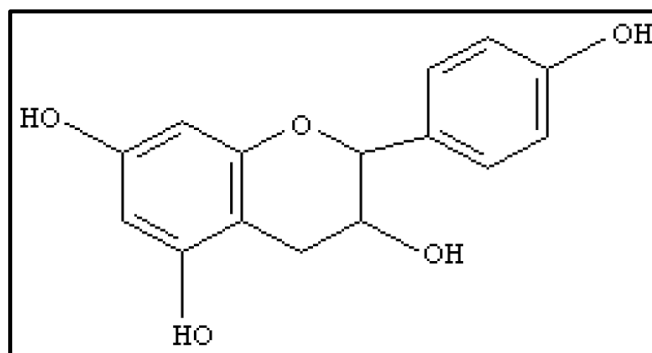


Figura No.4. Estructura básica de las antocianinas. Fuente: Badui, 1993.

Cuadro No.3. Sustituyentes de las antocianinas. Fuente: Wroslstad, 2001

<i>Aglicona</i>	<i>Substitución</i>		<i>λ máx. (nm)</i>
	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)
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

2.3.1.2. Espectro de absorción

Las antocianinas presentan una alta coloración en medio ácido debido a que contienen un cromóforo de ocho dobles enlaces conjugados. El espectro de absorción de los flavonoides se caracteriza por tener dos bandas separadas, una a longitudes de onda largas (Banda I) determinada por la conjugación del anillo β, y la segunda en la región ultravioleta (Banda II) determinada por la conjugación del anillo

α . A mayor sustitución del anillo β , la absorbancia máxima de las antocianinas se desplaza hacia el extremo del rojo del espectro.

Las sales de antocianinas de alta coloración en una solución ácida poseen dos absorbancias máximas, una en la región visible entre los 465 y 550 nm, y otra menos intensa en la región ultravioleta entre los 270 y 280 nm (Gross, 1987).

2.3.1.3. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran. Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperaturas de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración así como la presencia de otros compuestos tales como otros flavonoides, proteínas y minerales.

Uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH. Dependiendo del pH las antocianinas pueden existir en cuatro especies diferentes:

1. Base quinoidal
2. Cation flavilio
3. Pseudobase carbinol
4. Chalcona

En soluciones muy ácidas ($\text{pH} < 0.5$) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a base de carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazara a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable (figura No.5) (Leyva, 2009).

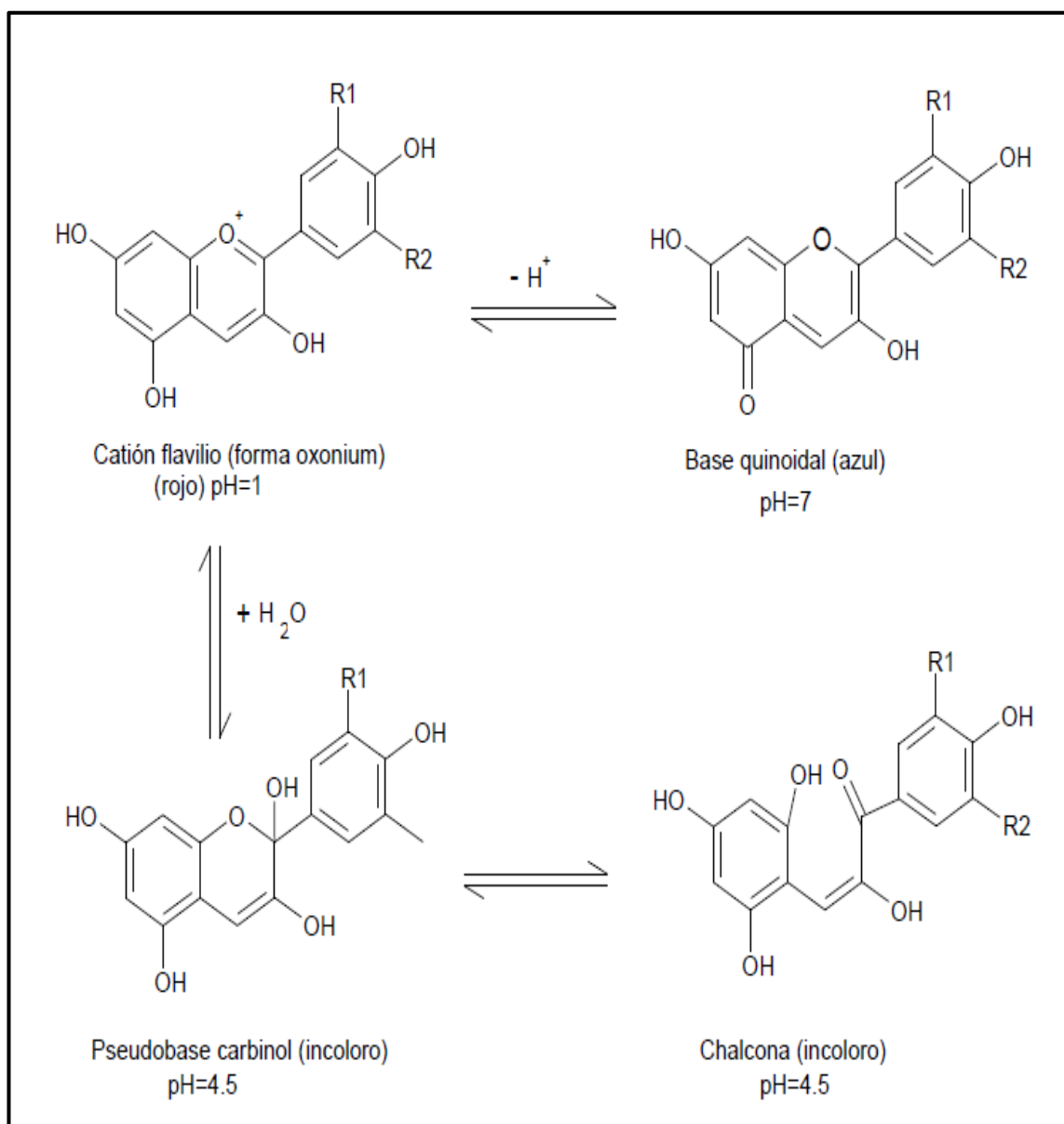


Figura No.5. Estructura de antocianinas a diferentes pH's. Fuente: Leyva, 2009.

Los recipientes de aluminio inducen también a cambios en coloraciones. Dada su solubilidad en agua, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utilizan en los diferentes tratamientos, a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de las frutas, ya que se favorece tanto la extracción que incluso se puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros (Ocampo, et al., 2008, Badui, 1993). La conservación de estos compuestos a

temperatura de refrigeración (4 °C) aumenta la vida de almacenamiento 6 veces en comparación con el almacenamiento a temperatura ambiente y 60 veces con respecto al almacenamiento en un lugar caliente (38 °C) (Menéndez, 2008).

2.3.1.4. Métodos de extracción de antocianinas

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de solventes ácidos como se muestra en el siguiente cuadro No.4 (Leyva, 2009).

Cuadro No. 4. Métodos de extracción de antocianinas. Fuente: Leyva, 2009.

Método	Características
0.001% HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001% HCl en etanol	80% tan efectivo como el metanol.
0.001% HCl en agua	27% tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO₂	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol: ácido acético: agua.

También para la extracción de estos pigmentos se ha utilizado la maceración del tejido en ácido fórmico-metanol 2 a 10%, ácido clorhídrico 1 a 3% o ácido trifluoro acético-metanol 0.5 a 3% (Vargas, 2002). Otro método de extracción utilizado es la extracción mediante una solución de agua-acetona (30:70 v/v), en la cual se agrega

la muestra y es re-extraída con la misma hasta obtener una sustancia clara, realizando filtrados combinados llevándolos a una pera de decantación agregándose cloroformo, es recolectada la porción acuosa y colocada en un rotavapor Buchi a 40°C durante 5 a 10 minutos, hasta evaporar la acetona residual (Del Carpio, *et al.*, 2009).

De las técnicas fotoquímicas, como las cromatografías en papel (CP), capa fina (CCP), columna (CC) y gas líquido (CGL) el color y comportamiento en las cromatografías (polaridad) proporcionan datos relevantes para su separación e identificación (valores de Rf). Para completar la identificación existen técnicas físicas como la espectrofotometría de ultravioleta – visible (UV-Vis), espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); y en otras menos usadas como polarografía y ESR (Electron Spin Resonance) (Vargas, 2002).

2.3.2. Caracterización de antocianinas

Los análisis de antocianos se realizan frecuentemente por técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fotodiodos (HPLC-DAD). Por el alto precio de los reactivos necesarios y el tiempo de análisis de muestra, cercano a los 75 minutos, como por la necesidad de personal experto en la técnica.

Por ello, y para dar respuesta a esas necesidades industriales, en la investigación desarrollada, se ha empleado una técnica espectroscópica, mucho más rápida y económica que las técnicas cromatográficas, más concretamente se ha empleado la espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (FT-IR) (Leyva, 2009). Teniendo en cuenta que esta técnica presenta varias ventajas como las que se mencionan a continuación: el fenómeno de absorción es más intenso por lo que se requieren muestras menores; el equipamiento es más sencillo y de uso más

flexible y por ultimo no presenta interferencias con otros fenómenos físicos (por ejemplo la fluorescencia).

Esta técnica también presenta una mejor relación señal/ruido ya que la luz no pasa por un monocromador, se miden todas las frecuencias a la vez lo que da mucha mayor rapidez, puede tener una resolución de menos de 0.01 cm^{-1} , y los espectros pasan necesariamente por una computadora lo que facilita el análisis y manejo espectral.

Actualmente los espectrofotómetros FT-IR han desplazado a espectrofotómetros con monocromador (dispersivos).

2.3.3. Cuantificación de antocianinas

Considerando el pH como uno de los principales factores de medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH también varían y ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración de antocianinas se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Teniendo en cuenta dos bandas de absorción en la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm) para este tipo de compuestos. Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas monoméricas, generalmente expresados como cianidina-3-glucósido.

El método de pH diferencial permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas tampón, el empleo de un agente blanqueador, bisulfito, y la medición por espectroscopia de UV-Vis. Este último consiste en el uso de una agente blanqueador que decolorará a las antocianinas sin afectar a los compuestos interferentes. Se obtiene una medida de la absorbancia

máxima en la región visible, seguida por la decoloración. Los agentes blanqueadores más empleados son sulfito de sodio y peróxido de hidrógeno (Leyva, 2009).

2.3.4. Antocianinas como colorantes naturales

Para la industria, las antocianinas tienen un potencial considerable en la rama alimentaria como aditivo, por su carácter inocuo (Vargas, et al., 2002). A diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, éstas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos (Lock, 1997). Pero a pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial (Astrid, 2008).

El interés por los pigmentos antociánicos y su investigación científica se ha incrementado en los últimos años, debido no solamente a su potencial uso como colorantes naturales, sino por sus potenciales beneficios a la salud. Las antocianinas tienen una gran actividad antioxidante que inhibe los radicales libres, controlando enfermedades coronarias, cáncer, diabetes y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorante, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Astrid, 2008; Del Carpio, 2009).

2.4. Almendro de la india (*Terminalia cattapa* L.)

La almendra de la india (*Terminalia cattapa*) es cultivada con fines ornamentales, para sombra, comestibles y producción de nueces, esto a nivel

mundial en países tropicales a elevaciones bajas, debido a que es muy resistente al ambiente. El árbol produce una semilla comestible y una bella madera, a pesar de que esta se explota muy poco.

El árbol es tolerante a los fuertes vientos, niebla salina y moderadamente alta salinidad en la zona radicular, crece principalmente en drenajes libres, así como en suelos arenoso. Ha sido tradicionalmente muy importante para las zonas costeras ya que ofrece una amplia gama de productos y servicios.

La almendra es nativa de las áreas costeras del este de la india, las islas de Andaman, Indochina, Malasia, Indonesia, el norte de Australia, Oceanía, las Filipinas y Taiwan. En el cuadro No.5 se presenta su clasificación taxonómica.

Cuadro No.5. Clasificación taxonómica

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnliopsida
Familia: Combretaceae
Género: Terminalia
Especie: T. Catappa
Nombre binomial: Terminalia Catappa

La almendra crece en un clima tropical húmedo, con una precipitación de 750mm a 1500mm. En la mayor parte de las áreas, la especie pierde sus hojas dos veces al año, con un despliegue foliar previo a la caída de las hojas de color rojo y amarillo encendido. La pérdida de las hojas le ayuda a tolerar una o dos temporadas secas anuales, las temperaturas cálidas a través de todo el año son preferibles, pero la almendra tolera con facilidad las temperaturas frescas en el invierno (Maureen *et al.*, 2003).

El almendro comienza a dar flores y fruto a una edad temprana, y continúa su producción de manera anual. La temporada de florecencia y de fruta varía considerablemente tanto en los árboles como en las características de los sitios en los que se encuentran. Las agrupaciones florales (racimos o espigas) tienen de 5 a 15 cm de largo, con flores pequeñas de 4 a 6mm de diámetro y sin pétalos, presentando un color blanco a verdoso, la mayoría de ellas masculinas, y otras bisexuales con un olor ligeramente agradable. Las hojas están dispuestas en espiral, son grandes de 15 a 25cm de longitud y de 10 a 14cm de anchura, con forma ovoide y un color verde oscuro y coriáceo brillantes. Son caducifolias desprendiéndose en la época seca. Las hojas presentan varios cambios de color antes de caerse del árbol, las hojas nuevas tienen un color verde limón, en su fase de maduración su color cambia a un verde oscuro, pasando esta fase cambian a un color amarillo lo que indica que la hoja está completamente madura, y por último cambia su color a rojo oscuro, esto antes de que la hoja se caiga del árbol; estos cambios de tonalidades de la hoja se deben al contenido de pigmentos tales como la violaxantina, luteína y la zeaxantina (Thomson y Evans, 2006, John 1989). Los compuestos presentes en las hojas de la *Terminalia catappa* son fundamentalmente taninos hidrolizables como: punicalagina, punicalina, ácido chebulagico y geranina. La punicalagina y la punicalina son los compuestos más abundantes y poseen la actividad antioxidante más fuerte dentro de este grupo de taninos (Maureen *et al.*, 2003).

La fruta es una drupa de 5 a 7cm de longitud y de 3 a 5.5cm de anchura, éstas se producen a partir de los 3 años de edad del árbol. Presentan un cambio de coloración durante su proceso de maduración: verdes en un principio, luego amarillo y finalmente rojo cuando maduran, es muy importante mencionar que la coloración también va a depender mucho de la variedad del árbol. La fruta es comestible con un sabor ligeramente ácido. Este fruto contiene una sola semilla (Thomson y Evans, 2006, John 1989). En las figuras No.6, 7 y 8 se observa la morfología del almendro de la india (*Terminalia catappa*).



Figura No.6. Hojas y flores del almendro



Figura No.7. Fruto del almendro

Fuente:http://upload.wikimedia.org/Wikipedia/commons/6/63/Terninalia_catappa_fruits.JPG



Figura No. 8. Fruto seco. Fuente: Thomson y Evans, 2006

Las semillas se producen anualmente, están cubiertas por una cáscara fibrosa dentro de un pericarpio carnoso. No existe una cantidad exacta en la producción por árbol, solo se tiene conocimiento que se producen en ocasiones pocas semillas o hasta varios cientos de éstas por árbol. Las semillas pueden ser consumidas inmediatamente al madurar o al caerse de los árboles, el consumo de este fruto por las personas es muy poco, ya que es uno de los que presenta poco conocimiento y no presenta ningún aporte nutricional.

Los murciélagos y las aves son los mayores consumidores de estos frutos y los cuales distribuyen las semillas por cualquier sitio donde ellos se encuentren, por esta razón es común encontrar estos árboles en terrenos donde no ha intervenido la mano del hombre. En el cuadro No.6 se observan los compuestos presentes en el almendro de la india (Thomson y Evans, 2006, John 1989, Maureen et al., 2003).

Cuadro No.6. Compuestos presentes en almendro de la india (*Terminalia Catappa L.*). Fuente: Maureen et al., 2003.

<i>Parte de la planta</i>	<i>Tipo de compuesto</i>	<i>Compuestos identificados</i>
Hojas	Taninos	Ácido chebulágico Corilagina 1-degabil eugenina Geranina 2-3-(4-4'-5-5'-6'-6'-hexahidroxi-difenol) glucosa Granatina Punicalagina Punicalina Tercataina Terflavina Tergalagina
Corteza	Cumarinas	Benzenoides Ácido gentisino Ácido elágico 3-3'-4-tri-0-metil ácido elágico 3-3'-di-o-metil ácido elágico
	Misceláneos	Ácido oxálico
Frutos (aceite de las semillas)	Lípidos	Ácido palmítico Ácido linoléico

A pesar de que el almendro crece cuando se le planta en tierras elevadas, el hábitat natural de la especie se encuentra en áreas apenas tierra adentro de playas marítimas, cerca de la boca de ríos y en planicies costeras. Estas áreas son típicamente planas, pero pueden tener dunas o riscos. La especie crece en mayores concentraciones sobre arenas, cuando las perturbaciones le permiten dominar la vegetación en competencia, se comporta muy bien sobre limo, margas y arcillas (Thomson y Evans, 2006, John 1989).

Los árboles de almendra cultivados para ornamento viven por lo normal alrededor de 60 años. En los buenos sitios, éstos pueden alcanzar una altura de 30m y un diámetro de 1.2m. Los fustes son rectos por lo usual, con unas longitudes comerciales de 8 a 10 m (John, 1989).

La especie desarrolla sistemas radicales laterales superficiales como respuesta a la existencia de agua subterránea poco profunda, por lo cual es muy fácil que los grandes vientos tiren los árboles, sus raíces fibrosas desempeñan un papel vital en la estabilidad de la costa. La especie parece poseer una tolerancia intermedia a la sombra (John, 1989).

La almendra parece ser susceptible los insectos de foliadores, especialmente cuando el árbol es muy joven. Los saltamontes y los escarabajos ocasionan muchos problemas en las plantaciones. La almendra es muy susceptible al ataque de las termitas (John, 1989). Otro factor muy importante que hay que tener en cuenta es la poda excesiva por el viento o por los humanos, lo cual puede debilitar o matar los árboles maduros, también algunos de estos árboles son muy susceptibles a la contaminación ambiental (John, 1989).

El valor principal del almendro es como un árbol de ornamento y de sombra. Es favorecido por el encendido color de su follaje antes de la caída de las hojas, por la simetría estratificada de sus ramas y por su forma placentera a la vista, y debido a que crece en una variedad de suelos y en relleno de construcción. Es favorecido en especial cerca del mar debido a que puede soportar el rocío salino (John, 1989).

Un valor secundario de la almendra es por las nueces (semillas) que produce. Estas semillas comidas ya sea crudas o tostadas, tienen un sabor similar al de las nueces de la almendra comercial (*Prunus amygdalus*). Contienen un aceite comestible, con un excelente sabor, que constituye alrededor del 55% del peso de la semilla. Las semillas no se explotan a gran escala porque son difíciles de abrir. El pericarpio de este fruto es dulce y en lo que cabe es comestible. La madera es de un

atractivo color que va de marrón amarillo a rojo, pero no se usa extensamente debido a que no se encuentran disponibles en grandes cantidades. Se seca rápidamente, con un encogimiento radical del 4.5% y un encogimiento tangencial del 5.7%.

Las hojas y la corteza rinden un tinte negro, y el follaje se usa como alimento para los gusanos de seda tipo "tasar". El jugo de las hojas jóvenes se usa para el tratamiento de enfermedades de la piel y para dolores de cabeza, y la corteza se usa en el tratamiento de la disentería y la ictericia.

El almendro presenta gran tolerancia a las sequias de menos de 4-6 meses de duración, y tira sus hojas para resistir este tipo de sequias. El árbol crece más rápidamente cuando tiene contacto directo con los rayos solares, disminuyendo su crecimiento en sitios con presencia de sombra (John, 1989).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro dentro del departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, así como en el departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Coahuila.

Para desarrollar la siguiente investigación se establecieron las siguientes etapas que a continuación se mencionan:

3.1. ETAPA 1. Obtención y condiciones de la materia prima

El fruto del almendro de la india (*Terminalia catappa*) se obtuvo del municipio de Santiago Pinotepa Nacional Oaxaca, ubicado en la región costa del estado de Oaxaca, en las coordenadas geográficas latitud 16.338056 y longitud -98.050278 a una mediana altura de 205 metros sobre el nivel del mar (msnm), limita al norte con el Municipio de San Andrés Tlacamama, al sur con el Océano Pacífico, al este con el Municipio de San José Estancia Grande, al oeste con Santa María Huazolotitlán. El fruto se recolectó en el mes de octubre, el cual se cortó directamente del árbol observando un punto de maduración como referencia, con la finalidad de evitar algún maltrato físico que pudiera sufrir el fruto y producir alteraciones para su posterior análisis.

3.1.1. Preparación de la muestra seca

Se colocaron frutos frescos en charolas de plástico para permitir el secado uniforme y rápido, se expusieron a temperatura ambiente por una semana; guardándose en bolsas oscuras perfectamente selladas, colocándolas en un lugar fresco sin penetración de la luz. Se cortaron en trozos pequeños para una mayor manejabilidad.

3.1.2. Preparación de la muestra fresca

Cada uno de los frutos fue cubierto con papel aluminio, colocándolos dentro de bolsas oscuras, manteniéndose en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su posterior uso.

En esta etapa fueron seleccionados los frutos; evitando que presentaran magulladuras o porciones en descomposición.

Se determinó el pH con la ayuda de un potenciómetro digital marca HANNA por inmersión directa del electrodo previamente calibrado con buffers 4 y 7, para lo cual se utilizaron 3 frutos, los cuales fueron macerados anteriormente.

Posteriormente se determinó la longitud de onda a la cual se absorbe el colorante y que será la óptima para la cuantificación del mismo. Para lo anterior se utilizó un espectrofotómetro marca Génesis 10 UV/Vis.

3.2. ETAPA 2. Extracción del colorante

Tomando en cuenta la maduración del fruto, el análisis se realizó en seco y fresco. Los tratamientos a evaluar fueron los diferentes solventes, tiempos y concentraciones acorde a la mayor concentración de colorante.

3.2.1. Extracción por solventes orgánicos en fruto seco

Se realizó por medio de solventes orgánicos, utilizando los siguientes: agua, alcohol, acetona, éter y hexano a una relación de 1:5 (peso-volumen) en cada uno.

Fueron utilizados vasos de precipitado previamente forrados con papel aluminio, donde se colocaron la muestra y el solvente correspondiente, adicionando el solvente a un mismo tiempo, con la finalidad de poder monitorearlos evitando diferencias en el tiempo; se dejaron en agitación constante en un agitador mecánico

Shaker modelo Multi Wrist Shaker durante 24 horas, monitoreándose por un lapso de tiempo de 10 a 15 minutos. Dejando reposar durante 24 horas.

3.2.2. Extracción por solventes orgánicos en fruto fresco

Para la extracción de estos compuestos se utilizaron dos tipos de solventes; alcohol y acetona cada uno de estos en grado analítico. En el caso de la acetona se realizaron diferentes disoluciones acuosas al 10, 5 y 2.5%. En cada uno de los solventes se realizaron tres repeticiones, así mismo para cada una de las disoluciones en el caso de la acetona.

Se colocaron 2 frutos frescos cada uno con pequeñas aberturas en un vaso de precipitado previamente cubierto con papel aluminio agregándole el solvente, sellándose perfectamente y almacenándose en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

La solución resultante, fue analizada a una longitud de onda de 400 nm cada ocho, doce, dieciocho y treinta seis horas para cada muestra. Al término de las treinta seis horas, tiempo máximo de la absorción del colorante, la fruta fue retirada del solvente y se filtró con la ayuda de un cuadro de tela de lino, para eliminar cualquier presencia de residuos sólidos que se hayan desprendido del fruto.

La sustancia obtenida de la filtración es guardada en un frasco previamente cubierto con papel aluminio y sellada perfectamente y es colocado en refrigeración a una temperatura de 4°C.

3.3. ETAPA 3. Caracterización del colorante

3.3.1. Eliminación del solvente por evaporación

En esta etapa se eliminó el solvente con la ayuda de un *rotavapor modelo R-215* de las muestras del alcohol de grado analítico y la acetona (en el caso de este solvente se utilizó la disolución del 2.5% ya que es la que presenta mayor concentración del pigmento en un tiempo más corto) como se aprecia en la figura No. 9. Cada una de las muestras fue sometida a las condiciones como se aprecian en el cuadro No. 7, para poder realizar el espectro infrarrojo de cada uno de los extractos obtenidos.

Cuadro No. 7. Condiciones para hacer posible la evaporación del solvente.

Solvente	Temperatura del vapor	Temperatura del agua	Rotación (RPM)
Alcohol	16°C	26°C	165
Acetona 2.5%	16°C	26°C	150

Se determinó la solubilidad del extracto para lo cual se utilizaron los siguientes solventes: etanol, éter etílico, acetona, acetato de etilo y el agua.



Figura No.9. Evaporación del solvente.

3.3.2. Espectro Infrarrojo

Una vez analizados por espectroscopía infrarroja en un equipo *Perkin Elmer Spectrum GX*, utilizando un dispositivo de Reflectancia total atenuada (ATR) con punta de diamante colocándola en el compartimiento de la muestra con una resolución de 1 cm^{-1} , se realizaron barridos de 500 a 4000 cm^{-1} .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ETAPA 1. Obtención y condiciones de la muestra

El fruto del Almendro de la India que se empleó para el análisis, no fue obtenido bajo requerimientos específicos como tamaño, peso, etc., únicamente se buscó obtener un fruto en un estado de madurez fisiológica presentando una tonalidad que va de rojo a violeta. El fruto no mostró signos de ningún tipo de alteración, por lo que se utilizó sin ningún problema.

4.1.1. Preparación de la muestra seca

Los frutos fueron secados a temperatura ambiente totalmente guardándose en bolsas oscuras para evitar el contacto con la luz y el oxígeno e impedir alteraciones en las mismas, mostrando un cambio de coloración que va de rojo - violeta a café y una reducción de tamaño.

4.1.2. Preparación de la muestra fresca

Fueron seleccionados cada uno de los frutos, previamente cubiertos con papel aluminio, mismo que fue retirado. A las muestras se le realizaron pequeñas aberturas para tener mayor contacto con el solvente, y obtener una mayor concentración del colorante.

En esta etapa se determinó el pH del fruto el cual fue de 5.2.

Por otro lado y con el mismo colorante obtenido, se realizaron barridos espectrofotómetros a fin de determinar la longitud de onda más apropiada para detectar la intensidad de color, resultando como óptimo los 400 nm. Como se logra apreciar en el cuadro 8.

Se eligieron los 400nm ya que fue el que presentó mayor longitud de absorbancia, la cual será la óptima para la posterior cuantificación del mismo.

Cuadro No. 8. Longitud de onda a la cual absorbe el colorante.

Longitud de onda	uabs/nm
400	1.399
500	0.430
600	0.179
700	0.009

4.2. ETAPA 2. Extracción del colorante

4.2.1. Extracción por solventes orgánicos en fruto seco

El fruto fue secado para su mayor conservación y utilizado de la misma manera. Inicialmente los primeros extractos fueron indeseables para la presente investigación ya que a la hora de la extracción del colorante, se presentó una coloración café con los solventes: agua y hexano, teniendo una extracción pobre del colorante con la acetona y el etanol, como se aprecia en la figura No.10. Se observó que al secar el fruto, ocurre una absorción del colorante al interior del pericarpio del fruto, el cual al contacto con el oxígeno tiende a oxidarse y presenta una diferencia en densidades, por tal motivo no es apto utilizar el fruto en seco para este propósito. Al comparar dicho efecto con lo citado por Martínez (2003), en función a que los grupos carotenoides se extraen de tejidos deshidratados; lleva a suponer que el colorante presente en este fruto no es posible extraerlo de dicha manera.

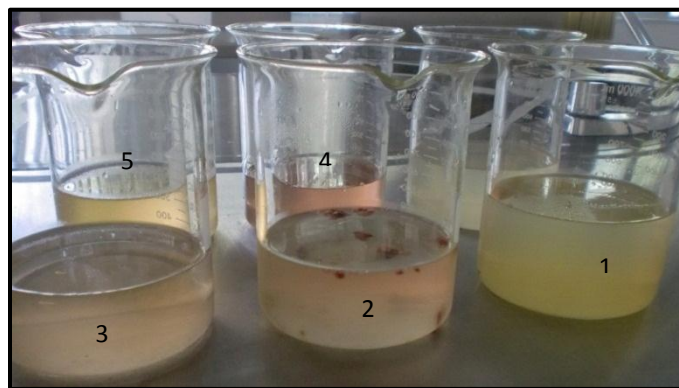


Figura No.10. Extracción del pigmento en fruto seco en diferentes solventes: agua (1), etanol (2), acetona (3), éter (4) y hexano (5).

4.2.2. Extracción por solventes orgánicos en fruto fresco

En esta etapa se evaluaron dos tipos de solventes, etanol grado analítico y acetona en diferentes concentraciones (10, 5 y 2.5%).

4.2.2.1. Selección del solvente con mayor extracción del colorante

El presente estudio tiene como finalidad determinar tanto el solvente como la concentración más adecuada para la extracción del pigmento de interés, como es posible observar en la figura No.11 la mayor concentración de color fue obtenida mediante el uso de la acetona en donde la concentración de 10% presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones de 5 y 2.5% ubicándose estas a un mismo nivel de significancia por debajo de la anteriormente mencionada como se puede observar en el cuadro No. 9; sin embargo la coloración obtenida con la concentración del 10% es de un color marrón que sugiere que el pigmento pudo haber sufrido un proceso de oxidación, por lo cual se someterá a un estudio a fin de verificar dicho efecto.

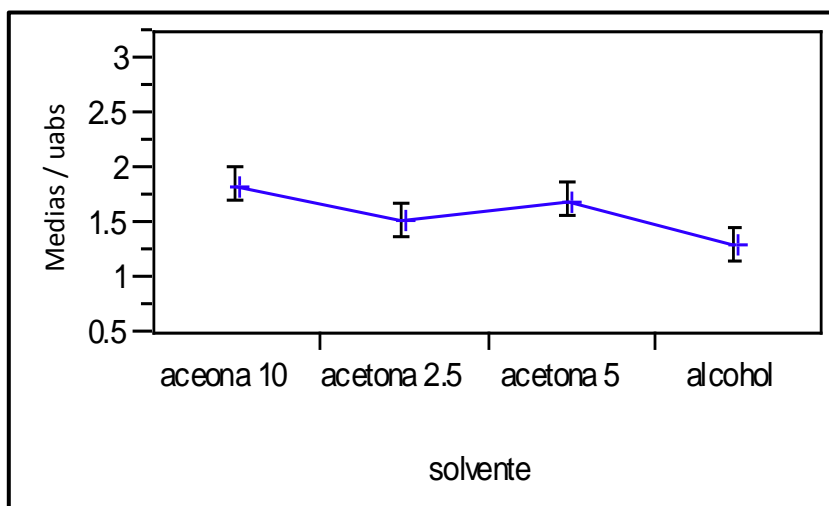


Figura No.11. Medias de concentración en base a diferente solvente.

Cuadro No. 9. Resultados del solvente apropiado para la extracción analizados mediante t-Student ($P \leq 0.05$).

Solvente				Media
acetona 10	A			1.8516667
acetona 5	A	B		1.7191667
acetona 2.5		B		1.5358333
alcohol			C	1.3116667

4.2.2.2. Análisis del solvente con respecto al tiempo de extracción

Una vez determinado el solvente de mayor afinidad para el estudio, la siguiente etapa correspondió a la determinación del tiempo necesario para poder obtener la mayor cantidad de colorante. El análisis de medias permite concluir que la acetona a una concentración del 5% y en un tiempo de 36 horas se puede utilizar para extraer de mejor manera el colorante de interés; ya que en el análisis estadístico fue el mejor, mostrándose una diferencia estadísticamente significativa con el resto. Como se puede observar en el gráfico de la figura No. 12, que se presenta a continuación.

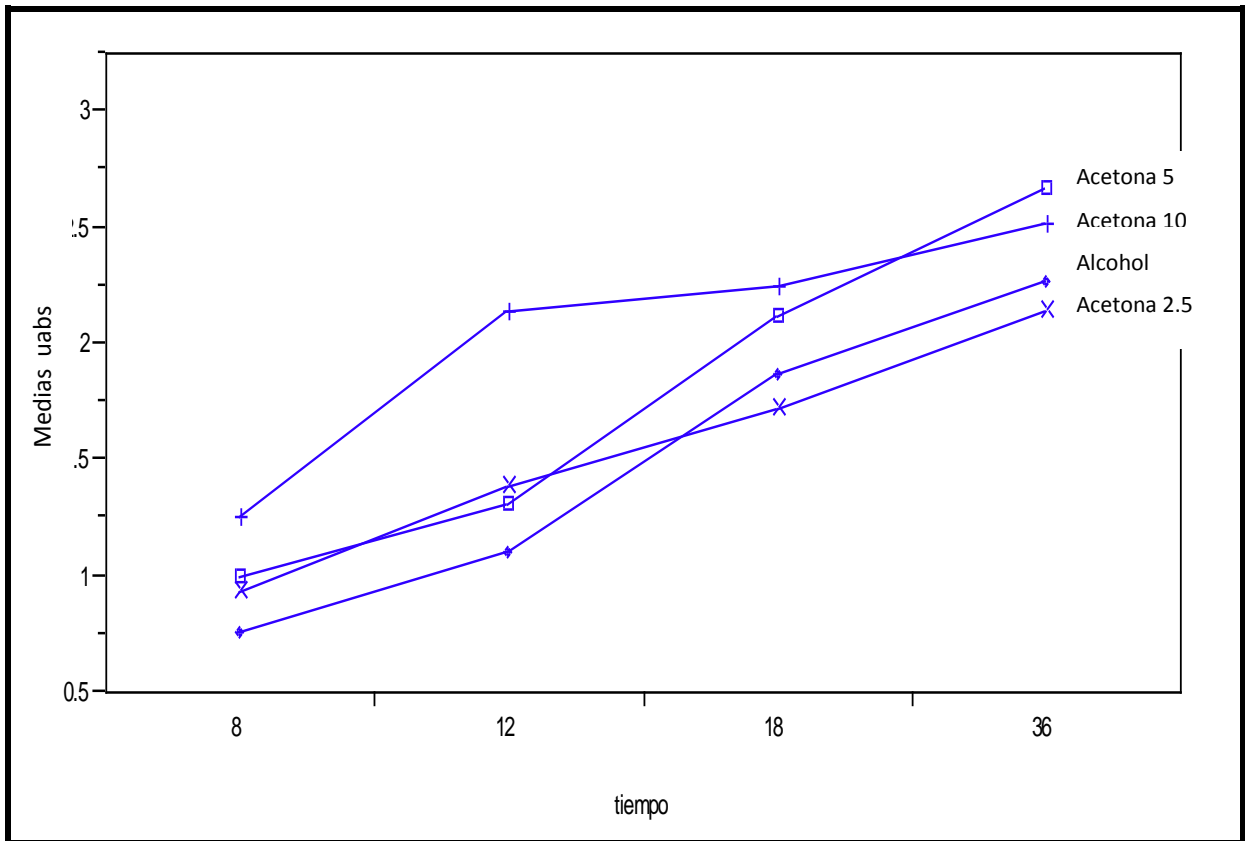


Figura No. 12. Medias de concentración en base al solvente / tiempo de extracción.

Teniendo en cuenta los resultados arrojados y por lo reportado por Del Carpio (2009), que propone que el mejor solvente para las antocianinas es la acetona, se descarta que sea el mejor solvente, ya que al contacto con el oxígeno ocurre una degradación de la antocianina propiciando productos precipitados con una coloración café.

En cuanto al alcohol se refiere éste presenta menor concentración del colorante, pero a diferencia de la acetona, mantiene una estabilidad al solvente y al oxígeno del aire no perdiendo la coloración durante el paso del tiempo, manteniendo la concentración inicial del colorante. Por lo que la extracción del pigmento en este tipo de frutos es mejor con el alcohol, propiciando varias ventajas de suma importancia ya que por la literatura citada se sabe que este solvente presenta baja/nula toxicidad durante su uso y a diferencia de otros solventes este es de bajo

costo siendo, teniendo en cuenta que es una ventaja de suma importancia dentro de las industrias para reducir costos y obtener mayores ganancias. El etanol a diferencia de la acetona presenta mayor eficiencia de extracción pero con menor cantidad de colorante, teniendo en cuenta que el con el etanol se extrae una fracción importante que permite que la coloración se mantenga estable con el tiempo.

Observando las características de la coloración del fruto y del pH presente, podemos decir que el colorante pertenece al grupo de las antocianinas, no afirmando tal caso ya que es necesario realizar análisis específicos a cada una de las muestras para poder afirmar tal hecho.

Y por lo reportado por Leyva (2009), este grupo de compuestos que son las antocianinas dependiendo del pH es la coloración que presentan, a pH de 4 a 5.5 presentan una coloración azul-violeta pero en una concentración menor. Teniendo en cuenta que el fruto presentó un pH de 5.2; la alternativa que el pigmento sea una antocianina es valorada aún más, para poder identificar si en verdad el colorante presente en este fruto es una antocianina, las muestras se caracterizaron por espectro infrarrojo.

4.3. ETAPA 3. Caracterización del pigmento

Después de haber eliminado el solvente en el rotavapor, se analizaron los extractos obtenidos de las muestras (figura No.13): tratadas con etanol y la acetona al 2.5% siendo ésta la que presentó la mayor concentración del pigmento ya que como antes se mencionó a las otras dos concentraciones se obtiene una coloración indeseable. Por tal motivo se seleccionó la acetona al 2.5%.

Dichas muestras fueron analizadas en el espectro infrarrojo, obteniéndose los siguientes espectros mostrados en las figuras No. 14 y 15 correspondientes a las muestras obtenidas mediante el uso del etanol y acetona, respectivamente.



Figura No.13. Extracto obtenido de la evaporación

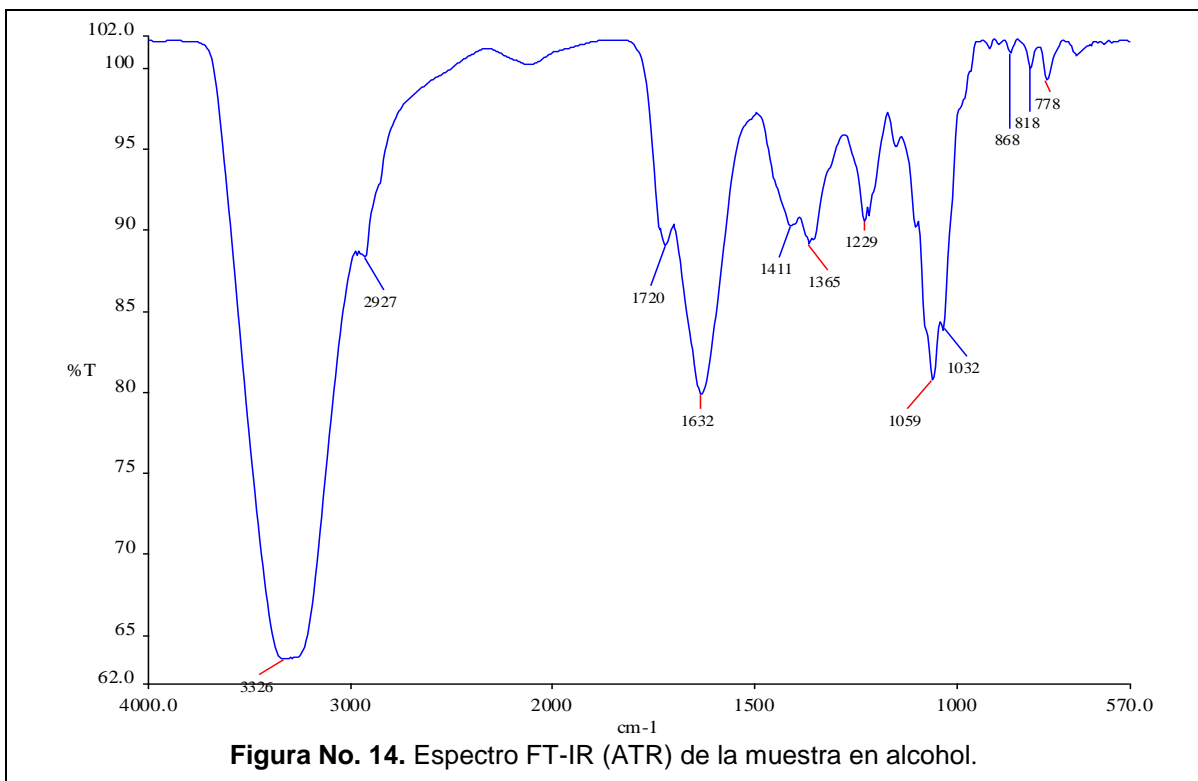


Figura No. 14. Espectro FT-IR (ATR) de la muestra en alcohol.

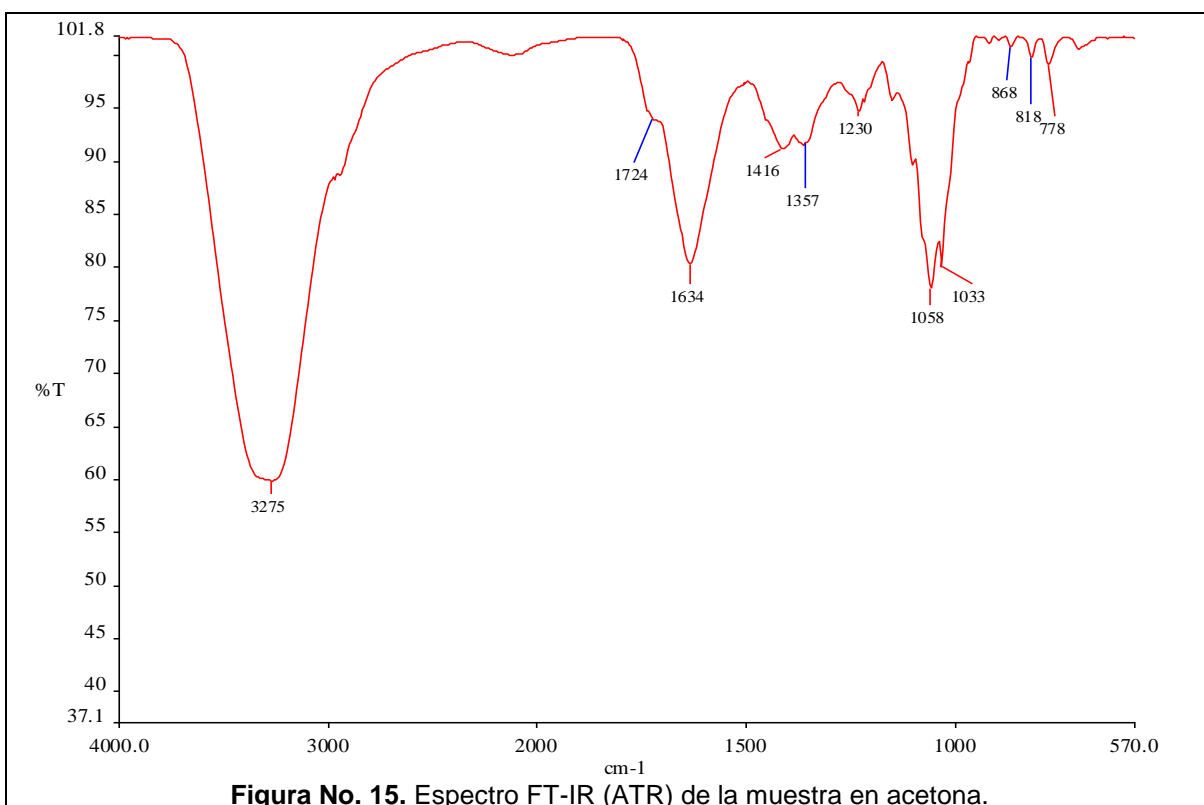


Figura No. 15. Espectro FT-IR (ATR) de la muestra en acetona.

Como se puede observar en ambos espectros la región espectral más importante se encuentra dentro de los $1700 - 1550 \text{ cm}^{-1}$ la cual permite la absorción de los infrarrojos de los dobles enlaces ($\text{C}=\text{C}$) y el pico dentro de los $1640 - 1630 \text{ cm}^{-1}$ donde ocurre un estiramiento de los dobles enlaces del carbonilo; los cuales son característicos de los compuestos de tipo flavínico,

De acuerdo a lo reportado en la literatura por Rivera *et al*, (2011), los compuestos que presentan un pico a 3402 cm^{-1} corresponden a grupos OH, así como el pico a los 1609 cm^{-1} es representativo de los grupos carbonilo, mismos que caracterizan a los compuestos de tipo flavínico. Considerando esto, y haciendo la comparación con los espectros de las muestras analizadas encontramos que hay gran similitud en cuanto al espectro obtenido en la figura No. 14 y el reportado por Rivera *et al*, (2011), como se puede observar en la figura No.16.

En base a las evidencias presentadas del análisis previo, es posible aseverar que el colorante presente en el Almendro de la India pertenece a los compuestos del grupo flavínico, por lo que probablemente pertenece a las antocianinas, no se puede aseverar esto, ya que con la técnica utilizada solo se evidenciaron los grupos funcionales que forman los compuestos, y se necesita de una caracterización amplia y estricta como la cromatografía para poder afirmar que en realidad se trata de pigmentos del grupo de las antocianinas.

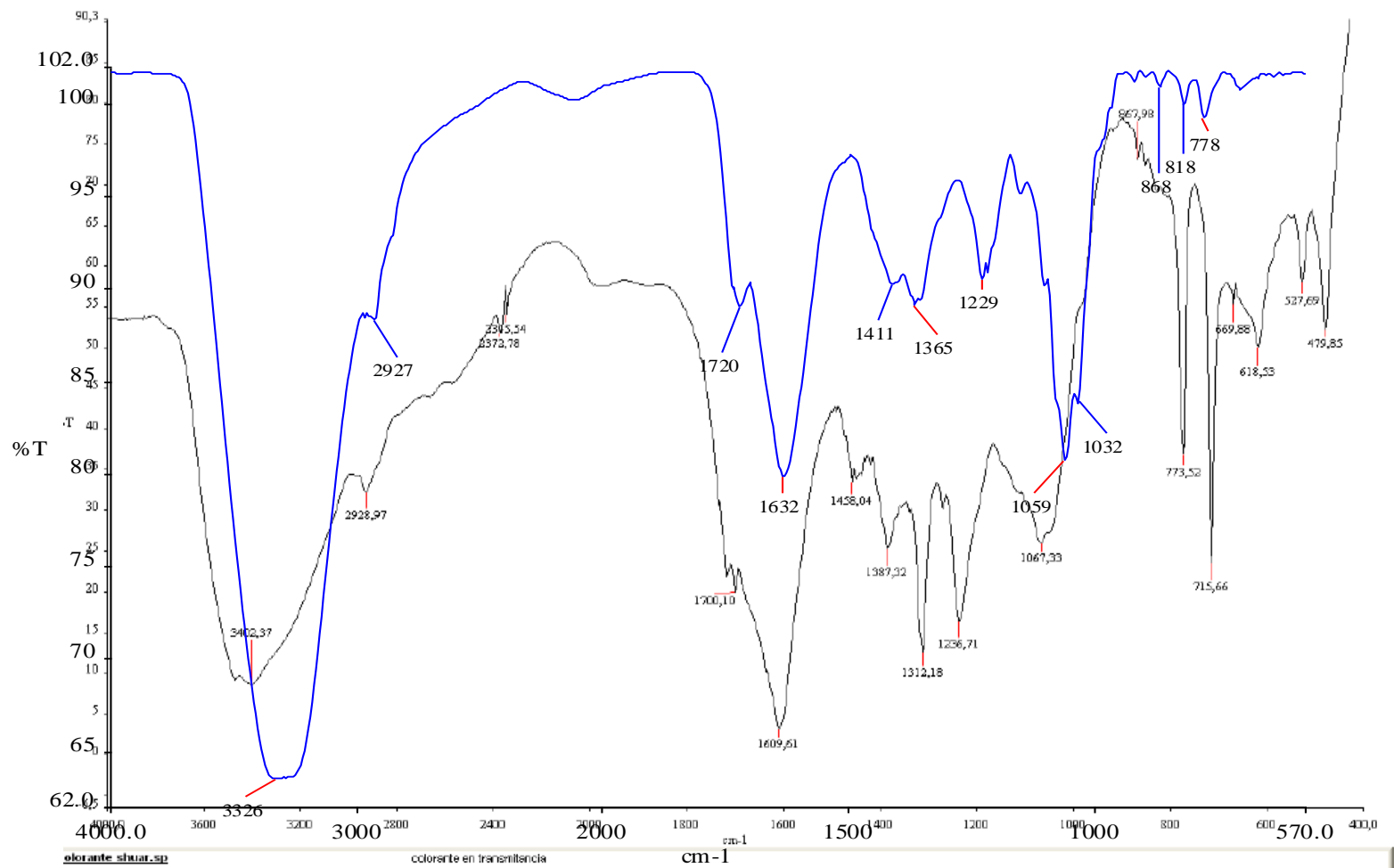


Figura No. 16. Comparativo de los espectros que presentan los mismos compuestos.

5. CONCLUSIONES

La extracción del colorante en este fruto es necesaria realizarla con la muestra en fresco.

El mejor solvente para realizar la extracción es el etanol, alcanzando la mayor concentración en un tiempo correspondiente a las 36 horas, presentando ventajas de importancia para su posible uso a nivel industrial.

La acetona fue la que mayor concentración de colorante extrajo sin embargo a diferencia del etanol el pigmento se vuelve inestable, ya que la coloración se debilita al poco tiempo por lo que no es factible el uso de este solvente para la extracción del colorante en este fruto.

El compuesto presente en este tipo de frutos pertenece a los compuestos del grupo flavínico, posiblemente con estas características el colorante de este fruto pertenece a las antocianinas no pudiendo aseverar tal cosa ya que también se observa una señal en 1720cm^{-1} de un grupo carbonilo, índice que pudiera tratarse de un flavonona o una chalcona.

6. ANEXOS

Resultados del solvente apropiado para la extracción analizados mediante t-Student.

Solvente				Media
acetona 10	A			1.8516667
acetona 5	A	B		1.7191667
acetona 2.5		B		1.5358333
alcohol			C	1.3116667

Medias de concentración en base al solvente / tiempo analizados mediante t-Student.

Solvente/ Tiempo									Medias
acetona 5,36	A								2.8333333
acetona 10,36		B							2.3533333
acetona 2.5,36		B	C						2.1500000
alcohol,36		B	C						2.0400000
acetona 10,18		B	C						1.9833333
acetona 10,12			C	D					1.8066667
acetona 5,18			C	D	E				1.7266667
acetona 2.5,18			C	D	E				1.7233333
acetona 2.5,12				D	E	F			1.3900000
alcohol,18					E	F			1.3400000
acetona 5,12					E	F	G		1.3100000
acetona 10,8						F	G		1.2633333
alcohol,12						F	G	H	1.1066667
acetona 5,8						F	G	H	1.0066667
acetona 2.5,8							G	H	0.8800000
alcohol,8								H	0.7600000

7. LITERATURA CITADA

Astrid, G.G. 2008. Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química. *Acta biol. Colomb.* Vol. 13 No. 3. pp. 27-36.

Acta toxicológica argentina. 2003. Seguridad química para las empresas. Proyecto de Convenciones de Seguridad Química. Publicación oficial de la Asociación Toxicológica Argentina. Buenos Aires-Argentina. Volumen 11 N°2. pp. 2-50.

Badui, D.S. 1993. Química de los Alimentos. Addison Wesley Longman de México., México D.F. pp. 379-402.

Cid, V. H. E. 2004. EXTRACCIÓN, A NIVEL DE LABORATORIO, DE LOS PIGMENTOS COLORANTES DEL TIPO FLAVONOIDES CONTENIDOS EN LA FLOR DEL SUBÍN (*Acacia farnesiana L. Willd*) PROVENIENTE DE UN BOSQUE SILVESTRE GUATEMALTECO. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Química. Guatemala.

Cuevas, M. E., Antezana A., Winterhalter. 2008. ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS EN DIFERENTES VARIEDADES DE MAÍZ (*Zea mays*) BOLIVIANO. *Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig, Schleinitzstrasse 20, 38106 Braunschweig, Alemania* Universidad Mayor San Simón Cochabamba, Sucre a Parque la Torre, Cochabamba, Bolivi; memorias * red-alfa lagrotech * comunidad europea * Cartagena. pag.79-93.

Desdodier, N.W. 1983. Elementos de tecnología de alimentos. CESCOSA. p. 16-17.

Del Carpio, J., Serrano F. C., Giusti M. 2009. Caracterización de las antocianinas de los frutos de Lechler (*Berberis boliviana*). Rev. "Soc. Quím.". [En línea]. Perú. Vol. 75 (1). pp. 76-85. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v75n1/a10v75n1.pdf> [Fecha de consulta: 04/Octubre/2011 10:43pm].

Estrella, P. I. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Disponible en: <http://www.dietcan.net/docs/POLIFENOLES-MAD.pdf>. [Fecha de consulta: 09/Octubre/2011 03:47pm].

García, M., Quintero, R., López M. A. 1999. Biotecnología alimentaria. Ed. LIMUSA. México D. F., México. Pp. 479-502.

Harbone, J. B. 1976. Function of flavonoids in plants. In "Chemistry and Biochemistry of plant Pigments. T.W. Goodwin. Ed. Academic Press. London.

Ibáñez, C. F., Torre P., Irigoyen A. 2003. Aditivos Alimentarios. Área de Nutrición y Bromatología. Universidad Pública de Navarra.

John, K. F. 1989. *Terminalia cattapa L.* Indian almond. SO-ITF-SM-23. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 4 p. Disponible en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Terminaliacatappa.pdf> [Fecha de consulta: 12/febrero/2011 11:00 am].

Lallana, V.H., Lallana Ma. del C. 2003. Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal. Pág.16.

Leyva, D. D. E. 2009. Determinación de Antocianinas, Fenoles totales y Actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Tesis Lic. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Huajuapán de León, Oaxaca, México.

- Lock, S. de U. O.** 1997. Colorantes naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. pp. 95-96.
- Martínez, N. A.** 2003. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.
- Mazza, G.** 1995. Miniati, E. Anthocyaninas in fruits, vegetables and grains, CRC Press.
- Multon, J. L.** 2000. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 343-351.
- Menéndez, G. W. V.** 2008. "Obtención De Colorante Para Su Uso En Yogurt A Partir De La Flor De Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y Del Mortiño (*Vaccinium mytillus L.*)". Tesis Lic. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción. Guayaquil – Ecuador.
- Ocampo, C. R., Ríos V. L. A., Betancur J. L. A, Ocampo S. D. M.** 2008. Curso práctico de química orgánica enfocado a biología y alimentos. Universidad de Caldas. pp. 57-58.
- Rodríguez, A. D.B.** 1997. La retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados procesados y almacenados. Departamento de ciencias de Alimentos. Facultad de Engenharia de Alimentos, Universidad de Campinas, SP., Brasil. pp. 1-6.
- Salas, G. L.** 2003. Educación alimentaria. Manual indispensable en educación para la salud. Ed. Trillas. México, D. F. pp. 97.
- Thomson, L. A. J., Evans B.** 2006. Species Profiles for Pacific Island Agroforestry. Disponible en: <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Terminaliacatappa.pdf>. [Fecha de consulta: 12/febrero/2011 11:00 am].

Valdiviezo, M. J. A., Reyes L. M. “Extracción del carotenoide licopeno a partir de los rechazos post cosecha del mercado interno de *Citrullus lanatus* (sandía) para su futura aplicación en alimentos”. Escuela superior politécnica del litoral (ESPOL), centro de investigación científica y tecnológica. Facultad de ingeniería en mecánica y ciencias de la producción.

Vázquez, H. C. 2001. Estudio preliminar de la degradación de bixina en polvo en los diferentes tipos de empaques y temperaturas establecidas. Tesis Lic. Instituto Tecnológico de Villahermosa. Villahermosa, Tabasco, México.

Vargas, S. G., Soto H. R. M., Rodríguez G. M. T. 2002. Análisis Preliminar de Antocianinas en fruto de Icaco (*Chrysobalanus icaco L.*). Revista “Fitotec”. [En línea]. México. Vol. 25 (3): 261- 264. Disponible en: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/25-3/5a.pdf>. [Fecha de consulta: 04/Octubre/2011 04:57pm].

Wroslstad, R. E. 2001. Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanin's. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.

Walford, J. 1980. Developments in Food Colors. Applied Science Publishers. Ed. London. pp. 116-142.