

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ingeniería



Excelencia que trasciende

DELVALLE
GRUPO EDUCATIVO

**Evaluación de la estabilidad de las antocianinas como
una alternativa natural de color en una bebida
saborizada sin calorías**

Trabajo de graduación presentado por:

Flor Amalia Landaverry Escobar

para optar al grado académico de Maestría en Tecnología de los
Alimentos y Gestión

Guatemala
2016

**Evaluación de la estabilidad de las antocianinas como
una alternativa natural de color en una bebida
saborizada sin calorías**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
FACULTAD DE INGENIERÍA

**Evaluación de la estabilidad de las antocianinas como
una alternativa natural de color en una bebida
saborizada sin calorías**

Trabajo de graduación presentado por:
Flor Amalia Landaverry Escobar
para optar al grado académico de Maestría en Tecnología de Alimentos y
Gestión

Guatemala
2016

Vo. Bo. :

(f) Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruiz
MSc. Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruiz

Tribunal examinador

(f) Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruiz
MSc. Ana Silvia Colmenares Samayoa de Ruiz

(f) Marieliz Gramajo Rodríguez
Dra. Marieliz Gramajo Rodríguez

(f) Maria Patricia Palacios Recinos de Palomo
MSc. Maria Patricia Palacios Recinos de Palomo

Fecha de aprobación: Guatemala 2 de mayo de 2016 ✓

AGRADECIMIENTOS

- A Dios: Creador y Sustentador de la vida, por su amor infinito, gracia, favores y misericordias.
- A mis papas: Roberto y Flor de María, por su amor incondicional, por el esfuerzo para mi sostenimiento, por su dedicación, consejos y protección.
- A mis hermanos: Roberto Aníbal y Álvaro José, por ser ejemplos de perseverancia, por darme el empuje necesario para llegar a la meta y por siempre llenar la casa de alegrías.
- A mis abuelos: Ezequiel Aníbal (q.e.p.d.), Álvaro Antonio (q.e.p.d.), Amalia de Jesús (q.e.p.d.) y Amanda Esperanza, por colocar los cimientos para la superación profesional de las siguientes generaciones.
- A Raúl Guevara: Mi amor, por tener las virtudes de la constancia y la determinación las cuales son dignas de imitar, y por animarme y creer en mí.
- A Vera Carrillo: Mi mejor amiga, por sus risas e inolvidables aventuras juntas.
- A mi asesora: Licenciada Ana Silvia Colmenares, por guiarme y exhortarme a trabajar con excelencia.
- A las catedráticas: Ingeniera Ana Paz, Licenciada Patricia de Palomo, Licenciada Ana Luisa Mendizabal, por su vocación de enseñar y por el apoyo brindado en esta etapa de mi vida.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. JUSTIFICACIÓN	3
IV. MARCO TEÓRICO	5
A. El color en los alimentos	5
B. Pigmentos sintéticos y naturales	5
C. Antocianinas.....	8
D. Agua saborizada	15
E. Edulcorantes	19
V. METODOLOGÍA	24
A. Evaluación de percepción del mercado.....	24
B. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías utilizando colorante artificial rojo allura.	24
C. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías utilizando antocianinas como fuente de colorante.	25
D. Pruebas sensoriales.....	25
E. Estudio de estabilidad de bebida por medición de parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, porcentaje de acidez y color)	26
F. Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas.....	27
G. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.....	28
1. Materiales.....	28
2. Equipo	28
3. Preparación de muestras	28
4. Procedimiento.	29
H. Análisis de costos	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
A. Evaluación de percepción del mercado	30
B. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías, utilizando colorante artificial rojo allura AC.	36

C.	Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías, utilizando antocianinas como colorantes naturales.....	38
D.	Pruebas sensoriales.....	42
E.	Estudio de estabilidad de bebida por medición de parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, porcentaje de acidez y color).	44
F.	Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas.....	48
G.	Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH.....	50
H.	Análisis de costos	51
VII.	CONCLUSIONES	56
VIII.	RECOMENDACIONES	57
IX.	BIBLIOGRAFÍA	58
X.	ANEXOS	60
A.	Encuesta	60
B.	Boleta de evaluación sensorial	62
C.	Formulación de la bebida.....	62
D.	Datos obtenidos para la determinación de antocianinas monoméricas.	65
E.	Determinación de capacidad antioxidante	66
F.	Tabla nutricional de la bebida saborizada de fresa	68

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Listado de algunos pigmentos exentos de certificación por la FDA.	7
Tabla 2. Principales antocianinas en diferentes fuentes naturales.	8
Tabla 3. Antocianidinas más frecuentes encontradas en la naturaleza	9
Tabla 4. Ácidos utilizados en aguas saborizadas y funcionales.	17
Tabla 5. Opciones de proceso en los principales tipos de envases y bebidas.	18
Tabla 6. Niveles de uso típico de sucralosa en productos de bebidas.	21
Tabla 7. Estabilidad de la sucralosa en una bebida de cola a 20°C.	21
Tabla 8. Estructuras de glucósidos de esteviol y potencia de dulzor (sacarosa=1).....	22
Tabla 9. Fórmula 1: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando rojo allura AC (rojo 40) como colorante artificial.	38
Tabla 10. Fuentes de antocianina que se recopilaron de distintos proveedores.	38
Tabla 11. Formulación 2: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando extracto de col roja como fuente de antocianinas como colorante natural. Relación (1+5).....	40
Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos de Formulación 2.	41
Tabla 13. Formulación 3: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando extracto de zanahoria negra como fuente de antocianinas como colorante natural.	41
Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de Formulación 3.	41
Tabla 15. Análisis de formulaciones como verificación del cumplimiento del RTCA de Aditivos. .	42
Tabla 16. Análisis fisicoquímicos de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja	45
Tabla 17. Análisis fisicoquímicos de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra	46
Tabla 18. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja	49
Tabla 19. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra. .	49
Tabla 20. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja.	51
Tabla 21. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra.	51
Tabla 22. Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorante natural antocianina. .	52
Tabla 23. Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con colorantes artificiales.	53
Tabla 24. Valores de absorbancias obtenidas en bebida con extracto de col roja	66
Tabla 25. Valores de absorbancias obtenidas en bebida con extracto de zanahoria negra.....	66

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Estructura de la antocianina	9
Figura 2. Estructura de algunas antocianinas.	10
Figura 3. Reacción de antocianinas con bisulfito de sodio.....	12
Figura 4. Decoloración de las antocianinas del jugo de uva por acción del anhídrido sulfuroso. ...	13
Figura 5. Ángulo Hue de diferentes extractos de antocianinas en solución (pH 3) en comparación con rojo allura.	14
Figura 6. Estructura molecular de la sucralosa	19
Figura 7. Curva de respuesta del dulzor de la sucralosa en función de la concentración, en un sistema sin sabor acidificado con un pH=3.0.	20
Figura 8. Estabilidad de dulzor de la sucralosa, acesulfame K y aspartame en bebida de cola (pH=3.2) a 35°C	21
Figura 9. Esteviol.	22
Figura 10. Estructura química del Esteviósido y del Rebaudiósido A	23
Figura 11. Pregunta 1: De la siguiente lista de bebidas envasadas, ¿cuál consume más frecuentemente?	31
Figura 12. Pregunta 2: ¿Cómo prefiere que sean las bebidas envasadas?	31
Figura 13. Pregunta 3: ¿Qué opinión personal tiene acerca del consumo de azúcar?	31
Figura 14. Pregunta 4: Al comprar una bebida envasada, ¿usted elige una opción que sea reducida en azúcar o "light"?	31
Figura 15. Pregunta 5: ¿Cuál de los siguientes edulcorantes (endulzantes) sin calorías conoce? (Puede marcar más de una opción).....	31
Figura 16. Pregunta 6: ¿Qué utiliza para endulzar sus bebidas?	31
Figura 17. Pregunta 7: ¿Qué opinión tiene sobre la sucralosa (Splenda)?.....	32
Figura 18. Pregunta 8: ¿Qué opinión tiene sobre el aspartame (Equal)?	33
Figura 19. Pregunta 9: ¿Qué opinión tiene sobre la estevia? (Puede marcar más de una opción).....	33
Figura 20. Pregunta 10: ¿Ha consumido alimentos con estevia?	33
Figura 21. Pregunta 11: ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes artificiales?	34
Figura 22. Pregunta 12: ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes artificiales?	34
Figura 23. Pregunta 13: ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes naturales?	35
Figura 24. Pregunta 14: ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes naturales?	35
Figura 25. Pregunta 15: ¿Consumiría un una bebida endulzada con estevia?	36
Figura 26. Pregunta 16: ¿Consumiría un una bebida con colorantes naturales?	36
Figura 27. Bebidas saborizadas de fresa utilizando antocianinas provenientes de distintas fuentes.	39
Figura 28. Efectos de la exposición al sol sobre bebidas saborizadas de fresa utilizando antocianinas de distintas fuentes.....	39

Figura 29. Resultados de prueba hedónica de bebida saborizada de fresa sin calorías con antocianinas provenientes de extracto de col roja.....	43
Figura 30. Resultados de prueba hedónica de bebida saborizada de fresa sin calorías con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria negra	44
Figura 31. Mediciones de color de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja	47
Figura 32. Mediciones de color de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra	47
Figura 33. Bebidas luego de seis semanas expuestas a distintas condiciones de temperatura .	50
Figura 34. Diagrama de Pareto: Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorante natural antocianina.....	54
Figura 35. Diagrama de Pareto: Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorantes artificiales.....	55
Figura 36. Preparación de jarabe	62
Figura 37. Peso de jarabe, relación (1+5), una parte de jarabe y cinco partes de agua.....	62
Figura 38. Peso de agua.....	63
Figura 39. Medición de °Brix a la bebida.	63
Figura 40. Efecto del pH sobre las antocianinas durante la medición de la acidez titulable.....	64
Figura 41. Determinación de λ_{max} en bebida con extracto de col roja. Medición con la muestra preparada a pH=1.	65
Figura 42. Determinación de λ_{max} en bebida con extracto de zanahoria negra. Medición con la muestra preparada a pH=1.	65
Figura 43. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de col roja en la semana 1.	66
Figura 44. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de col roja en la semana 8.	67
Figura 45. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de zanahoria en la semana 1.	67
Figura 46. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de zanahoria en la semana 8.	68
Figura 47. Tabla de información nutricional de bebida saborizada de fresa.	68

RESUMEN

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar las antocianinas como una alternativa al uso del colorante artificial rojo allura AC en una bebida saborizada sin calorías y con sabor natural como una aplicación potencial. La importancia del estudio radica en el amplio uso de los colores artificiales en las bebidas, los cuales están siendo sustituidos por naturales debido a regulaciones en algunos países y a cuidados de la salud; pero la formulación de una bebida con este componente resulta ser difícil por ser un producto poco estable al sol y condiciones de mercado. En cuanto a costos la diferencia es muy marcada. Es por eso que se desarrolló un producto estable a las condiciones del mercado y con características sensoriales aceptables para el consumidor. Con este producto se aprovecha los beneficios que tiene este colorante natural, que además de brindar más confianza a los consumidores, tiene la propiedad funcional de los antioxidantes.

En la primera fase del estudio se llevó a cabo una encuesta para evaluar la percepción que tienen las personas a las bebidas envasadas, a los edulcorantes y a los colorantes naturales y artificiales. Luego, se realizó la formulación de una bebida de referencia utilizando el colorante rojo allura, y después se formuló la bebida haciendo la sustitución del colorante de rojo allura a antocianinas. Ya teniendo la bebida con colorante natural se hizo una prueba sensorial para conocer el grado de aceptabilidad que tiene el consumidor al producto. Además se llevó a cabo análisis para determinar el contenido total de antocianinas y el contenido de antioxidantes de la bebida. Fue también importante la evaluación periódica de los parámetros fisicoquímicos (porcentaje de acidez, pH y color). Por último se analizaron los costos para la producción de esta bebida al utilizar colorante natural y se realizó la comparación con la bebida utilizando el colorante artificial.

Se pudo observar que al sustituir el color artificial en la bebida, a uno natural, el costo de producción se incrementa en un 25%. Este incremento se justifica porque la bebida con antocianinas como colorante natural le da a la bebida la funcionalidad de tener capacidad antioxidante la cual se conserva a lo largo de 8 semanas. Así también este es una buena opción para el mercado que está más interesado en cuidar su salud por no ser sin calorías y por contener sabor y color natural.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha visto la necesidad de las industrias de alimentos a reformular sus productos existentes y a desarrollar nuevos productos con ingredientes y dosificaciones que no perjudiquen la salud del consumidor, esto debido a las exigencias del gobierno y las preferencias de los clientes. La idea de este estudio surgió dentro de una industria procesadora de bebidas porque se vio la necesidad de desarrollar productos con colorantes naturales, los cuales se asocian con calidad y promoción de la salud, mientras que los pigmentos sintéticos son evaluados críticamente. Para ello se decidió trabajar con antocianinas que son pigmentos hidrosolubles que aportan una amplia gama de colores: rojo, azul y púrpura. Los extractos de las antocianinas proveen beneficios para la salud, como lo es la capacidad antioxidante.

La finalidad del presente estudio fue evaluar las antocianinas como una alternativa al uso del colorante artificial rojo allura AC en una bebida saborizada sin calorías y con sabor natural. Para ello fue necesario realizar un estudio con consumidores para conocer su percepción hacia las bebidas envasadas y hacia los colorantes naturales y sintéticos. Esto se hizo por medio de encuestas. Teniendo esto, se desarrolló una formulación de fresa, sin calorías, utilizando rojo allura AC, para tener una bebida de referencia. Luego se formuló la bebida realizando la sustitución del rojo allura AC, por antocianinas, para ello se trabajó con extractos de zanahoria negra y col roja. Así también se hicieron pruebas sensoriales para conocer el grado de aceptabilidad de la bebida por los consumidores. Se llevó a cabo un estudio de estabilidad evaluando parámetros fisicoquímicos y sensoriales. Además, se analizó el contenido total de antocianinas monoméricas y capacidad antioxidantes. Por último se realizó análisis de costos y se comparó el costo de producción de la formulación con colorante sintético y con colorante natural.

Se desarrolló una bebida saborizada sin carbonatación, con sabor a fresa natural, sin calorías (edulcorada con estevia ya sucralosa), con antocianinas. Este producto es dirigido a una población de jóvenes y adultos (específicamente estudiantes universitarios, profesionales o catedráticos). Las características sensoriales (color, sabor, dulzor y apariencia en general) fueron mejor evaluadas en la bebida con extracto de zanahoria negra. En el estudio de estabilidad se obtuvo que ambas formulaciones de bebida conservaron sus parámetros fisicoquímicos ($^{\circ}$ Brix, pH, acidez titulable, porcentaje de acidez). Al llevar a cabo la sustitución de color en una bebida, de uno artificial a uno natural, el costo de producción se incrementa en un 26%. Este incremento de costo se justifica porque la bebida con antocianinas le aporta al producto la funcionalidad de tener capacidad antioxidante la cual se conserva a lo largo de 8 semanas.

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

- Evaluar las antocianinas como una alternativa al uso del colorante artificial rojo allura AC en una bebida saborizada sin calorías y con sabor natural como una aplicación potencial.

B. Objetivos específicos

1. Formular una bebida saborizada sin calorías, con sabor y color natural proveniente de antocianinas, que sea estable a las condiciones que tiene un producto en el mercado permaneciendo con las características fisicoquímicas y sensoriales aceptables previamente establecidas.
2. Conocer el grado de aceptabilidad a la bebida por medio de análisis sensorial.
3. Conocer la estabilidad del producto, simulando las condiciones en las que se encuentra en el mercado y llevando a cabo análisis fisicoquímicos.
4. Determinar la factibilidad económica por medio de un análisis de costos.

III. JUSTIFICACIÓN

La creciente preocupación mundial por la calidad e inocuidad de los alimentos, ha traído como consecuencia una serie de normas aportadas por diferentes gobiernos. En la mayoría de países se han formulado regulaciones estrictas sobre el uso de los aditivos alimentarios, incluyendo los colorantes. La legislación y las preferencias de los consumidores han requerido que los alimentos sean formulados por ingredientes más naturales. (Mohammad, 2013).

El uso de pigmentos naturales como colorantes de alimentos, ha aumentado tanto en los fabricantes como en los consumidores, y se ha visto mucho interés en el desarrollo de nuevos colorantes naturales para su uso en la industria alimentaria, porque estos son más aceptados internacionalmente y se asocian con calidad y promoción de la salud, mientras que los pigmentos sintéticos son evaluados críticamente por los consumidores. (Mohammad, 2013).

En este estudio se decidió utilizar antocianinas, un grupo de constituyentes flavonoides bioactivos, debido a que son los pigmentos hidrosolubles más abundantes y ampliamente distribuidos en tubérculos, pétalos, hojas, flores, frutas y verduras, responsables de la amplia gama de colores rojo, azul y púrpura. No se han observado efectos tóxicos de este compuesto al utilizarse como colorante natural en alimentos procesados, y por el contrario, se han encontrado que los extractos de las antocianinas están asociados a beneficios para la salud, dentro de los cuales cabe mencionar: mejora de la agudeza visual (Timberlake, 1988), capacidad antioxidante (Degenhardt *et al.*, 2000), tratamiento para diversos trastornos de la circulación de la sangre resultantes de la fragilidad capilar (Wang *et al.* 1997), propiedades vaso-protectoras y anti-inflamatorias (Lietti *et al.*, 1979), inhibición de la agregación de plaquetas (Morazzoni y Magistretti, 1986), mantenimiento de la permeabilidad vascular normal (Wang *et al.* 1997), control de la diabetes, agentes neoplásicos y quimioprotectores (Kamei *et al.*, 1995), y posiblemente otras propiedades debido a la acción de varias enzimas y procesos metabólicos (Wang *et al.* 1997). Estas son cualidades que hacen atractivas a las antocianinas como alternativa al uso de pigmentos sintéticos como lo es el rojo allura AC.

Además de los beneficios que pueden tener las antocianinas, es importante reconocer que estas son sensibles al calor, cambios de pH y a la luz solar. Es por ello que la aplicación en sistemas alimentarios no es sencillo. A lo largo de los años, los proveedores de ingredientes han desarrollado colorantes de origen natural de una variedad de fuentes y han mejorado la estabilidad en determinadas condiciones en algunas aplicaciones como lo son las bebidas.

Las bebidas en nuestra región contienen colorantes artificiales para que el producto sea atractivo al consumidor, siendo las tonalidades de rojo unas de las más utilizadas. Tal y como se mencionó

anteriormente, están sustituyendo los colorantes artificiales por naturales debido a regulaciones del país y a la creciente preocupación por la salud, pero la formulación de una bebida con componentes naturales resulta ser difícil por ser un producto poco estable a las condiciones de mercado. En cuanto a costos, la diferencia es muy marcada, siendo el costo de los colorantes naturales más elevado. Es por ello que en este estudio, en el cual se utilizará antocianinas en lugar de rojo allura AC para darle color a una bebida saborizada sin calorías, con sabor a fresa natural, se busca realizar un producto que sea estable a las condiciones del mercado y que tenga características sensoriales aceptables para el consumidor. Con este producto se aprovecharán los beneficios que tiene este colorante natural que además de brindar más confianza a los consumidores, tiene la propiedad funcional de los antioxidantes.

IV. MARCO TEÓRICO

A. El color en los alimentos

El color es una propiedad de la materia que se relaciona directamente con el espectro de luz, y físicamente puede medirse en términos de su energía radiante o intensidad, y por su longitud de onda. Únicamente cuando su energía corresponde a una longitud de onda que va desde 380 a 780 nm, puede ser percibido por el ojo humano. Es por ello que el color es definido como “parte de la energía radiante que el humano percibe mediante las sensaciones visuales que se generan por la estimulación de la retina del ojo”. (Badui, 2006)

La calidad de los alimentos no se basa únicamente en aspectos sanitarios, toxicológicos y nutricionales, sino también bajo los siguientes parámetros: color, sabor, olor y textura. Pero el primer acercamiento que tienen los consumidores a los alimentos es por medio de su color y de esto depende la aceptación o el rechazo. (Badui, 2006)

B. Pigmentos sintéticos y naturales

1. Pigmentos sintéticos. Estos incluyen sustancias sintetizadas con alto grado de pureza. Los principales pigmentos sintéticos son los azoicos y las antraquininas. (Badui, 2006)

Los azoicos poseen una estructura de mono, di o triazo. Estos producen casi todos los colores y se caracterizan por poseer un grupo cromóforo $-N=N-$. Los más utilizados han sido los amarillos 5 y 6, los rojos 2, 4 y 40, y el naranja B. (Badui, 2006)

Las antraquinonas poseen dentro de su estructura uno o más grupos carboxilo en un sistema de anillos conjugados, al menos tienen tres anillos condensados. (Badui, 2006)

Los pigmentos sintéticos tienen las siguientes ventajas:

- Firmeza del color
- Bajo costo
- Alta efectividad
- Homogeneidad entre lotes
- No presenta aromas o sabores. (Badui, 2006)

A pesar de estas ventajas, el uso de pigmentos naturales como colorantes de alimentos, ha aumentado tanto en los fabricantes como en los consumidores, y se ha visto mucho interés en el desarrollo de nuevos colorantes naturales para su uso en la industria alimentaria, porque estos son

más aceptados internacionalmente y se asocian con calidad y promoción de la salud, mientras que los pigmentos sintéticos son evaluados críticamente por los consumidores. (Mohammad, 2013).

El debate acerca del efecto de determinados colorantes sintéticos comenzó en 1975 después de que Ben Feingold, un alergólogo pediatra que trabajaba en Kaiser Permanente Medical Center en California, publicó el libro *Why your children is Hyperactive* (¿Por qué su hijo es hiperactivo?), el cual es una referencia citada por quienes están a favor de eliminar el uso de colorantes sintéticos. El libro explica sus hallazgos de la investigación sobre cómo los colorantes y otros aditivos sintéticos pueden causar hiperactividad y otros problemas de aprendizaje en los niños.

Un estudio que se llevó a cabo en el 2007 en el Reino Unido, por McCann *et al.*, conocido como estudio de Southampton mostró un vínculo entre la ingesta dietética de colorantes sintéticos y aditivos, y la hiperactividad en los niños. Los colores de la investigación son: amarillo ocaso (E110), amarillo de quinoleína (E104), azorrubina (E122), rojo allura AC (E129), tartrazina (E102) y poceau 4R (E124); utilizados en bebidas gaseosas, helados, pasteles y dulces. Después de publicado este estudio, la FSA (Food Standards Agency), Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido, aconsejó a los padres interesados a que redujera o eliminaran de las dietas de sus hijos, los alimentos que contengan cualquiera de los seis colorantes. (FSA, 2007). En el 2008, el Parlamento Europeo señaló que los alimentos que contienen estos seis colorantes deben ser etiquetados con la advertencia “El consumo de este producto puede tener un efecto adverso sobre la actividad y la atención en los niños”. (EPHA, 2008)

En el 2008, en Estados Unidos, el grupo de defensa de los consumidores CSIP (Center of Science in the Public Interest) presentó una petición a la FDA para prohibir el uso de FD&C azul No. 1, FD&C Azul No. 2, FD&C Verde No. 3, FD&C Naranja B, FD&C Rojo No. 3, FD&C Rojo No. 40, FD&C Amarillo No. 5 y FD&C Amarillo No. 6. Debido a que esta prohibición toma tiempo, la CSPI solicitó que mientras se logra esto, se debe exigir que los alimentos que contengan estos colorantes lleven un aviso que diga “Advertencia: El colorante artificial en este alimento causa hiperactividad y problemas de comportamiento en algunos niños”. (CSPI, 2008)

2. Pigmentos naturales. Este tipo de pigmentos es generado por microorganismos, vegetales, animales o minerales. El mercado mundial de pigmentos naturales representa 940 millones de dólares al año en ventas y crece alrededor de 4% cada año debido a la preocupación del consumidor por el consumo de productos que no alteren o ayuden a la salud.

La palabra “natural” no significa que el color sea propio del producto alimentario, farmacéutico o cosmético. La mayoría de colores en los alimentos son añadidos. Los pigmentos naturales son obtenidos de fuentes presentes en la naturaleza y son usados para impartir color a algunos productos. Estos son sujetos a las mismas pruebas de calidad y seguridad toxicológica que los sintéticos, pero en el caso de la FDA y otras agencias gubernamentales no requieren que se

certifique su pureza química, y es por ello que se refieren a ellos como aditivos de color no certificados. A pesar de ello, algunos de estos pigmentos están sujetos a restricciones en su uso como nivel máximo de uso o el uso en animales en animales y/o humanos. (Badui, 2006)

Tabla 1. Listado de algunos pigmentos exentos de certificación por la FDA.

Aceite de endospermo de maíz (sólo para alimentos de aves)	Extracto de color uva (encianina) (sólo para alimentos, no bebidas)
Aceite de zanahoria	Glucona ferroso (sólo para pigmentar aceitunas negras)
Aceite carmínico (extracto de cochinilla)	Glutamato de hierro
Aceite de semilla de algodón desgrasado	Harina de algas secas (sólo para alimentos de aves)
Azafrán	Harina de semillas de algodón parcialmente tostada
Azul ultramarino (sólo para alimento animal)	Jugo de frutas
β -apo-8-carotenal	Jugo de vegetales
β -caroteno	Oloresina de paprika
Betabel deshidratado	Oleoresina tumérica
Cantaxantina	Óxido ferroso (sólo para alimento animal)
Color caramelo	Paprika y oleoresina de paprika
Dióxido de titanio	Rivoflavina
Extracto de anato (achiote)	<i>Tagetes erecta</i> (cempasúchil) extracto y harina (sólo para alimento animal)
Extracto de cáscara de uva (sólo para bebidas)	

(Badui, 2006)

Los colorantes naturales difieren ampliamente en su estructura química y en su origen. Los más distribuidos en los alimentos pueden agruparse en seis grupos:

1. Carotenoides
2. Clorofilas
3. Pigmentos fenólicos: flavonoides, antocianinas y taninos
4. Betalaínas
5. Hemopigmentos
6. Otros pigmentos naturales

Los cuatro primeros son de fuentes vegetales. La mayoría de estos se localiza en el protoplasma de las células, dentro de los organelos especializados llamados plástidos. En algunas ocasiones, cuando son solubles en agua, se encuentran disueltos en las vacuolas de las células. (Badui, 2006)

El quinto grupo se encuentra en productos de origen animal. En el sexto grupo se incluyen pigmentos que imparten color tanto en tejidos animales como vegetales. Son poco abundantes en la naturaleza. (Badui, 2006)

C. Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) son compuestos vegetales no nitrogenados que pertenecen a la familia de los flavonoides, de amplia distribución en la naturaleza. Se han identificado 300 de estos compuestos que son responsables de una amplia gama de colores, desde incoloro hasta púrpura. Producen colores: rojo, azul y púrpura en las uvas, manzanas, rosas, fresas, y otros productos de origen vegetal, principalmente frutas y flores. Por lo general se encuentran en la cáscara o en la piel como es el caso de la manzana y la pera, pero también pueden localizarse en la parte carnosa, como en las fresas y ciruelas. (Badui, 2006)

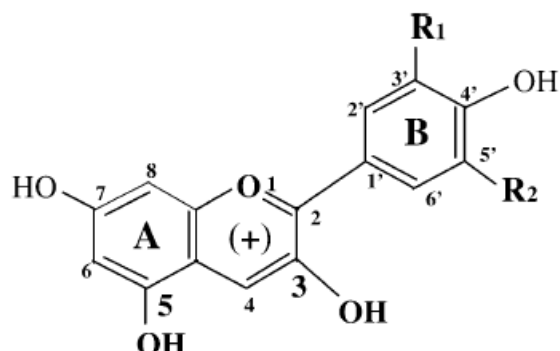
Tabla 2. Principales antocianinas en diferentes fuentes naturales.

Antocianinas	Fuentes
Pelargonidina	Fresa, banano, rábano, papa
Cianidina	Manzana, mora, sauco, durazno, pera, higo, cereza, cebolla, grosella, col roja, ruibarbo.
Cianidina y Delfinidina	Grosella negra, grosella, naranja roja, col roja, zanahoria morada.
Delfinidina	Maracuyá, berenjena, judías verdes, granada.
Cianidina y Peonidina	Arándano rojo, ciruela.
Petunidina y Malvinidina	Arándano, uva roja.

(Bechtold, 2009)

1. Estructura. Las antocianinas, al igual que los flavonoides, están formadas por un esqueleto que consiste en dos anillos bencénicos y un heterocíclico con oxígeno. El núcleo central, el cual es el grupo flávilo, constituye la antocianidina, y al unirse con la fracción azúcar, forma la antocianina. Se conocen alrededor de 20 antocianidinas, de las cuales, las más importantes son: pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina. Al combinarse éstas con los diferentes azúcares se generan las, aproximadamente 300 antocianinas. Es frecuente que una antocianidina reaccione con más de un carbohidrato para formar distintas antocianinas. (Badui, 2006)

Figura 1. Estructura de la antocianina



(Badui, 2006)

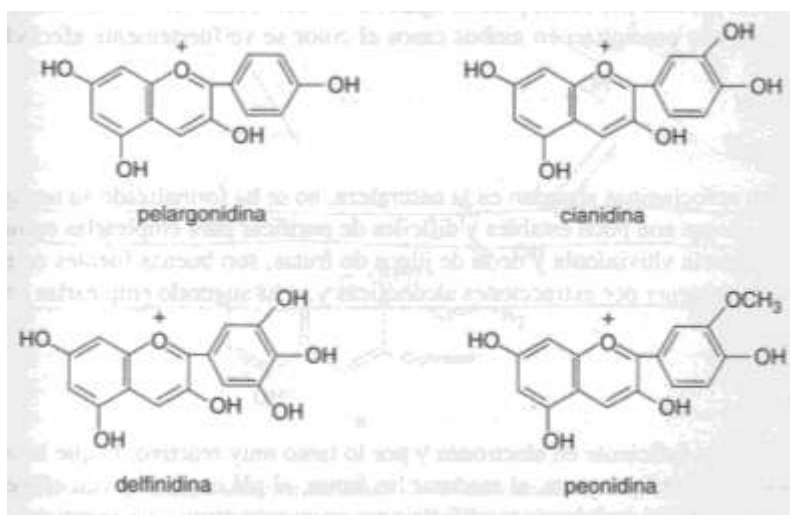
Tabla 3. Antocianidinas más frecuentes encontradas en la naturaleza

Aglicón	R1	R2	Color
Pelargonidina	H	H	Naranja
Cianidina	OH	H	Naranja-Rojo
Peonidina	OMe	H	Naranja-Rojo
Delfinidina	OH	OH	Rojo
Petunidina	OMe	OH	Rojo
Malvinidina	OMe	OMe	Rojo Azulado

(Giusti y Wrolstad, 2002)

Las antocianinas poseen una estructura con la forma catiónica del grupo flávilo. Todas están hidroxiladas en las posiciones 3, 5 y 7, pero difieren en la sustitución del anillo B. A medida que el número de sustituyentes de la fracción antocianidina aumenta, el color del catión flávilo absorbe a mayores longitudes de onda. La pelargonidina absorbe a 520 nm y la delfinidina a 546 nm. Esto se debe al fenómeno de deslocalización de electrones. Por otro lado, la metilación de los grupos hidroxilo promueve un efecto batocrómico, desplazando el máximo de absorción, es por ello que la petunidina y malvinidina absorben a 543 y 542 nm, en lugar de 546 nm en la delfinidina. (Badui, 2006)

Figura 2. Estructura de algunas antocianinas.



(Badui, 2006)

Se han encontrado cinco azúcares que forman parte de la molécula, estos son: glucosa, ramnosa, galatosa, xilosa y arabinosa. En algunos casos se encuentra la gentibiosa, rutinosa y sofrorosa. Estos se unen a la antocianidina por medio del hidroxilo de la posición 3, y en ocasiones en la 5 o 7. Dependiendo del número de azúcares que contengan son monóxidos (en posición 3), bióxidos (en posición 3 y 5) y trióxidos (dos en posición 3 y una en posición 5). La glucosidación provoca un efecto batocrómico, y además, aumenta la solubilidad y estabilidad del pigmento. (Badui, 2006)

Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, estos se localizan en los hidroxilos 3 y 5 que por lo general se encuentran acilados con ácidos cinámicos (p-cumárico, cafeico y ferrúlico) y con ácidos alifáticos (acético, malónico y succínico) e hidroxibenzoicos. Estos ácidos producen una estructura que por lo regular es más estable que cuando sólo contienen un solo monosacárido. La acilación no tiene efecto en el color, pero hace más estable al pigmento, un ejemplo de esto son las antocianinas de la cáscara de las uvas, col morada y rábano, las cuales están aciladas y son comercializadas como colorantes de alimentos. (Badui, 2006)

Las antocianinas, al no estar en estado libre en los alimentos, su presencia es indicio de una posible hidrólisis química o enzimática del enlace glucosídico. El aglucón se vuelve más sensible a muchos factores externos, y pudiera llegar a pérdida de color o precipitar. (Badui, 2006)

2. **Estabilidad.** Las antocianinas se caracterizan por ser poco estables y difíciles de purificar para emplearlas como aditivo. Tienen efecto al pH, a la asociación con otros compuestos o iones, a las enzimas, a los ácidos, al sulfitado, a la presencia de oxígeno, a la temperatura y a la luz

(Badui, 2006). Estos factores son perjudiciales para el color y las propiedades nutricionales de las antocianinas (Castañeda, *et al.*, 2009)

a. Efecto del pH. Debido a que el grupo flávilo es deficiente de electrones, este es muy reactivo, y es por ello que es muy sensible a los cambios de pH y con esto cambia el color. Los cambios en las antocianinas son debido a modificaciones de la estructura que muchas veces son reversibles. (Badui, 2006)

Las distintas coloraciones de las antocianinas se deben también a la conversión del catión flávilo a formas secundarias de las antocianinas en medios acuosos o a interacciones moleculares. Debido a estas deficiencias del grupo flávilo, los pigmentos funcionan como indicadores de pH. (Badui, 2006)

b. Asociación con otros compuestos y iones. Las antocianinas, en el pH de 3-7 encontrado en las plantas y derivados, están como estructuras incoloras a menos que por medio de un mecanismo estabilizante haya formado un complejo con otras especies. El complejo puede ser con una molécula idéntica (autoasociación), con uno de sus grupos sustituyentes acilo (pigmentación intramolecular), o con otra molécula (copigmentación). (Badui, 2006)

En los vinos sucede un cambio de color de rojo-púrpura a café-rojizo lo cual se debe a la formación de polímeros estables de antocianina-taninos, lo cual es resultado de la copigmentación. Las antocianinas también cambian de color al formar complejos con otros compuestos fenólicos (catequinas, taninos o flavonoides) o con polisacáridos, debido a que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores. (Badui, 2006)

La pigmentación intramolecular y la copigmentación favorecen la intensidad del color y su estabilidad. Los colores por la copigmentación de antocianinas se dan sobre todo con aquellas que tienen dos grupos en posición *orto*, con flavonoides amarillos y otros polifenoles, o a la formación de complejos con iones de aluminio, potasio, hierro, cobre, calcio o estaño, así como con aminoácidos, proteínas, pectinas, carbohidratos o polifenoles, produciendo compuestos café-rojizos de degradación llamados flavofenos. El mecanismo de decoloración en presencia de azúcares reductores, principalmente la fructosa, se debe a la descomposición de este monosacárido a hidroximetilfurfural, que reacciona con los pigmentos. (Badui, 2006)

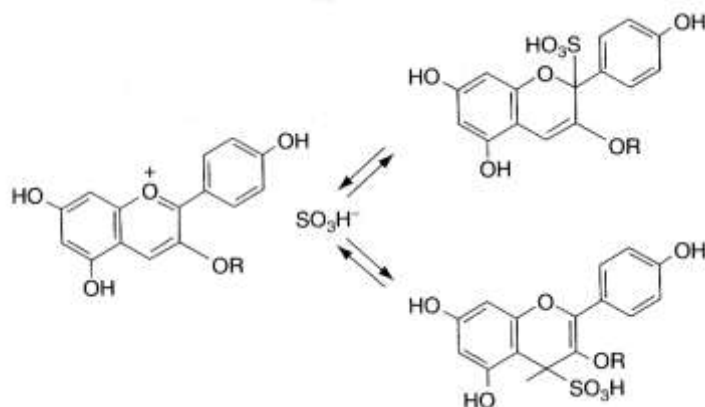
c. Efecto de enzimas. Las antocianinas, a pesar de que no reaccionan con las polifenoloxidasas, si lo hacen con las *o*-quinonas que se producen por la oxidación enzimática de fenoles. Las peroxidases afectan a las antocianinas por ruptura del anillo heterocíclico al degradarse rápidamente cuando existe catecol, ya que éste, al transformarse en *o*-quinona, oxida estos pigmentos. Las glucosidasas rompen la unión del aglucón, lo que genera compuestos incoloros. Las reacciones por enzimas endógenas o fúngicas con actividad β -glucosidasa, o antocianidasa, que

hidrolizan el enlace glucosídico en posición 3, producen un aglucón más inestable por lo que su degradación es más rápida. Las antocianinas por poseer estructuras fenólicas, pueden también ser atacados por fenolasas. (Badui, 2006)

d. Efecto de ácidos. Las antocianinas son decoloradas por el ácido ascórbico en presencia de iones cobre o hierro por formación de peróxido de hidrógeno, lo que hace que se degraden ambos compuestos cuando se almacenan por tiempo prolongado. El mecanismo involucra la formación de peróxidos los cuales son productos de degradación del ácido ascórbico y estos reaccionan con el azúcar en posición 3; esto puede suceder incluso a un pH de 2 que es cuando el pigmento se encuentra más estable. Se ha logrado estabilizar las antocianinas en jugo de algunas variedades de naranja adicionando ácido tartárico que cambia el equilibrio del sistema hacia la forma de flavilio. Estos pigmentos también son más estables cuando forman complejos con compuestos fenólicos como la rutina y el ácido caféico. (Badui, 2006)

e. Sulfitado. El anhídrido sulfuroso y los sulfitos que se usan en la conservación de los frutos tienen un efecto decolorante sobre estos pigmentos, pues se producen formas sulfónicas en las posiciones 2 y 4 que son incoloras; la generación de estos agentes con ácidos o calor, regenera la coloración. En el vino tinto, la concentración de SO_2 tiene influencia en la velocidad de decoloración y de forma paralela ejerce un efecto estabilizante sobre el enlace glucosídico y evita la hidrólisis de las antocianinas. (Badui, 2006)

Figura 3. Reacción de antocianinas con bisulfito de sodio.



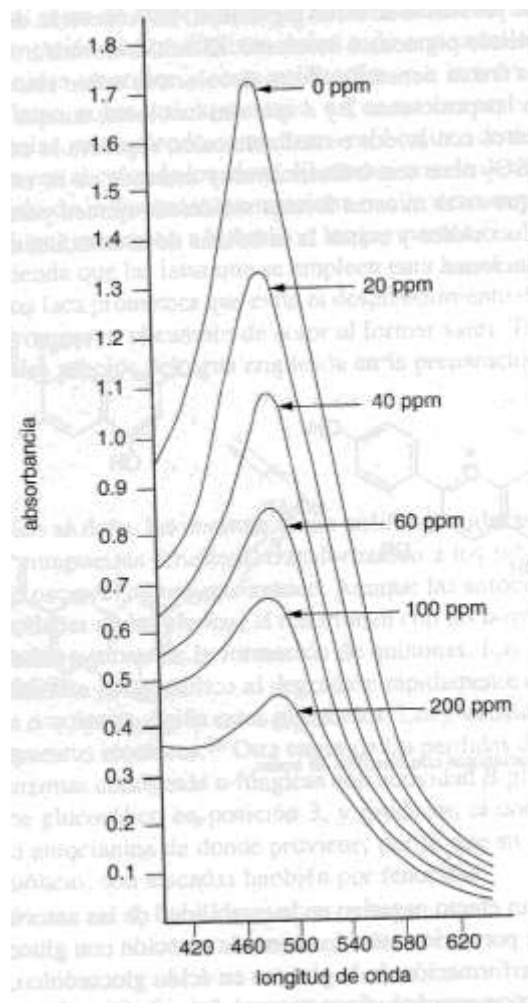
(Badui, 2006)

f. Presencia de oxígeno. El oxígeno ejerce un efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas lo cual se observa principalmente en el vino. Esto puede eliminarse con el uso de la glucosa oxidasa la cual consume el oxígeno al transformar la glucosa en ácido glucorónico. Es

recomendable utilizar espacios de cabeza pequeños o envasarlos en atmósferas inertes para evitar cambios de calor en el almacenamiento. (Badui, 2006)

g. Temperatura y procesamiento. Las antocianinas son más inestables que los flavonoides ante el calor y reacciones de oxidación. Los tratamientos térmicos destruyen las antocianinas, en las fresas hay una relación logarítmica entre la pérdida de color y la temperatura. Para estos productos, es recomendable los sistemas de altas temperaturas-cortos tiempos para conservar el color de los alimentos. (Badui, 2006)

Figura 4. Decoloración de las antocianinas del jugo de uva por acción del anhídrido sulfuroso.



(Badui, 2006)

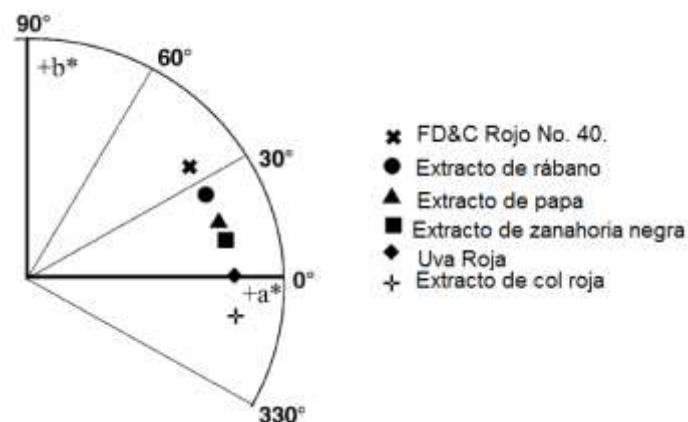
3. Beneficios para la salud. Además de sus atributos como colorante, el interés por las antocianinas ha aumentado por sus posibles beneficios para la salud. Los beneficios para la salud asociados a los extractos de las antocianinas incluyen: mejora de la agudeza visual (Timberlake,

1988), capacidad antioxidante (Degenhardt *et al.*, 2000) tratamiento para diversos trastornos de la circulación de la sangre resultantes de la fragilidad capilar (Wang *et al.* 1997), propiedades vaso-protectoras y anti-inflamatorias (Lietti *et al.*, 1979), inhibición de la agregación de plaquetas (Morazzoni y Magistretti, 1986), mantenimiento de la permeabilidad vascular normal (Wang *et al.* 1997), control de la diabetes, agentes neoplásicos y quimioprotectores (Kamei *et al.*, 1995), y posiblemente otras propiedades debido a la acción de varias enzimas y procesos metabólicos (Wang *et al.* 1997). Estas son cualidades que hacen atractivas a las antocianinas como alternativa al uso de pigmentos sintéticos.

4. Colorantes a base de antocianinas como alternativa al uso de rojo allura (FD&C Rojo No. 40). Existe una actual demanda por un colorante rojo que sea capaz de sustituir con eficacia el rojo allura, el cual es un colorante certificado con el más alto consumo per cápita en los EE.UU (Giusti y Wrolstad, 2002).

En un estudio llevado a cabo por Rodríguez *et al.* se comparó los atributos de color de diferentes colorantes naturales con el rojo allura. Se realizaron muestras de soluciones de jugo con 0.1 M de ácido cítrico, con un pH de 3, fueron coloreadas con antocianina para obtener la misma tonalidad de una solución de rojo allura de 150 ppm. Las dos pelargonidinas a base de extractos de rábano rojo y patata fueron las que proporcionaron el color más cercano al color naranja-rojo deseado, similar al rojo 40. El tono naranja de la pelargonidina aglicona cambia a un anaranjado-rojo intenso por la acilación con ácidos cinámicos. Las soluciones de extractos de zanahoria negra (derivados de cianidina mono aciladas) presentaron una tonalidad más rojiza, mientras que los extractos de uva roja (derivados de mono-acilados de diferentes antocianinas) y de repollo rojo (derivados de mono y di-acilados) imparten un color más violáceo (Rodríguez *et al.* 1999).

Figura 5. Ángulo Hue de diferentes extractos de antocianinas en solución (pH 3) en comparación con rojo allura.



(Rodríguez *et al.* 1999)

D. Agua saborizada

1. **Historia.** Las primeras aguas saborizadas fue la marca Perrier, (marca francesa de agua mineral carbonatada embotellada procedente del manantial des Boullens) en 1985, agregando sabores sin azúcar al agua. La línea inicial Perrier Zeste en el mercado francés fueron sabores naranja, limón y lima.

El año siguiente, Clearly Canadian (marca producida por Clearly Food & Beverage Company of Canada) lanzó su bebida endulzada con sabores de fruta en agua con gas. En 1990 Volvic lanzó la gama de sabor lima-limón y naranjada. Estas son endulzadas y contienen sabores naturales.

En 1996, en Nueva York, Estados Unidos, la marca Energy Brand lanzó Glacéau Smartwater. Este producto ya contiene una funcionalidad. Esta bebida se obtiene de agua destilada de vapor de agua con electrolitos añadidos.

En 1998 se conoció la marca Fruitwater y en el 2000 Vitaminwater. Al mismo tiempo South Beach (empresa de Connecticut) estaba reformulando sus productos de bebidas en una plataforma de hidratación y funcionalidad real con hierbas y vitaminas añadidas.

En 2006 se lanzó SoBe Life Water, propiedad de Pepsico. (Dege, 2007)

2. **Clasificación.** Algunas definiciones importantes de aguas embotelladas son las siguientes:

- Agua pura: Agua mineral o manantial, sin nada añadido.
- Agua naturalmente con funcionalidad. Agua pura con propiedades inherentes promotoras de la salud, como el caso de fuentes naturales de magnesio y calcio que pueden aumentar el metabolismo del cuerpo y mejoran la pérdida de peso.
- Agua pura con compuestos funcionales: Agua natural con adición de vitaminas, minerales u otros ingredientes que promueven la salud, pero no hay aromas o edulcorantes añadidos.
- Agua saborizada: Agua pura con aromas añadidos. Típicamente la bebida es clara y con menos de 10% de jugo de frutas. Los aromas pueden ser naturales (derivados de frutas, té, hierbas, etc.) o sintéticos.
- Agua funcional saborizada: Agua mineral o de manantial que ha sido purificada que contiene plantas, vitaminas, minerales u otros ingredientes funcionales.

Una clasificación que se le puede dar a las aguas saborizadas es la siguiente:

- Agua saborizada
 - Solamente con sabor

- Con sabor o cuerpo
- Con carbonatación
- Aguas funcionales saborizadas
 - Agua mineral, de manatíal o purificada
 - Con vitaminas y minerales
 - Con ingredientes complejos como extractos botánicos
 - Con sabor
 - Con colorantes

(Dege, 2007)

3. Composición e ingredientes. Al momento de formular, las bebidas saborizadas pueden ser consideradas poco complicadas porque básicamente sólo es agregar sabor al agua. Por otro lado, las bebidas funcionales contienen ingredientes más complicados, pero de igual manera se debe cumplir las expectativas del consumidor en cuanto a aroma, gusto, sensación en la boca, apariencia, etc. (Dege, 2007)

Los ingredientes principales para crear aguas funcionales y saborizadas son:

- Agua
- Edulcorantes
- Ácidos
- Jugo o concentrado de jugo (de fruta o vegetal)
- Sabor
- Minerales y vitaminas
- Extractos botánicos/herbales
- Color
- Estabilizantes
- Preservantes

Los ácidos son necesarios por dos razones. La primera es para dar balance al dulzor y prevenir crear un producto muy empalagoso. La segunda razón es para mover el pH de lo neutral a una escala en la que ayude a prevenir el crecimiento de organismos que deterioran el producto y además asegurar la eficacia de los preservantes que se utilizan. Los ácidos actúan como reguladores de la acidez. (Dege, 2007)

En la siguiente tabla se muestran los ácidos utilizados para formular estas bebidas.

Tabla 4. Ácidos utilizados en aguas saborizadas y funcionales.

Ácido	Uso
Ácido cítrico	Extraído originalmente de frutas cítricas pero comúnmente es derivado de la fermentación y procesos de extracción química.
Ácido málico	Extraído originalmente de manzana pero también se encuentra en otros frutos. Este brinda un perfil de acidez más suave.
Ácido tartárico	Ácido encontrado en uvas y vinos. Este brinda un perfil de acidez distinto a los dos primeros.

(Dege, 2007)

El sabor es el ingrediente principal en las aguas saborizadas y es necesario para proveer el sabor característico y el perfil de aroma de estos productos. Los sabores pueden ser naturales obtenidos de extracciones naturales de plantas o pueden ser artificiales provenientes de compuestos químicos. Los extractos naturales pueden ser solubles en agua o en solventes; por estabilidad todos los sabores contienen solventes como vehículos. (Dege, 2007)

4. **Formulación.** Al momento de formular, es importante tomar en consideración las mediciones que se deben realizar:

a. **Grados Brix (°Brix).** Este valor es el estándar de la industria para realizar las mediciones del contenido de azúcar de las bebidas, y esto es determinado por la medición del índice de refracción. Es posible que se deban utilizar tablas para hacer la correlación del índice de refracción a °Brix, pero la mayoría de equipos están calibrados para dar directamente el dato de °Brix. La correlación está basada en el azúcar que se encuentra en la solución. El ácido es un componente particularmente relevante en esta medición porque reduce el índice de refracción y comúnmente se requiere hacer correcciones cuando se debe reportar el contenido de azúcar en un jugo concentrado de fruta. A pesar de esto, la lectura de °Bx de la formulación terminada de una bebida puede ser utilizada en producción y es aceptable para establecer las especificaciones finales del producto. (Dege, 2007)

b. **Acidez titulable.** Este valor es utilizado para proveer la medición del contenido total de ácido en una bebida y es determinado por una titulación con Hidróxido de Potasio. El ácido total en una bebida proviene del ácido que ha sido añadido y del ácido proveniente de jugo de fruta. A nivel de producción, la medición es utilizada para determinar la cantidad de ácido que debe ser añadido para ajustar la fórmula antes del llenado. (Dege, 2007)

c. **pH.** Es importante conocer el pH del producto porque es un valor de medición que nos indica qué tan seguro microbiológicamente es un producto. El pH es una medición de la acidez de una solución en una escala de 1 a 14, donde 1 es lo más ácido y 14 es lo menos ácidos (lo más alcalino). Para los desarrolladores de bebidas es importante no sobrepasar un pH

alrededor de 4, pero es altamente recomendado trabajar en un pH de 3.8 para dar un margen de seguridad. Dentro de un rango de 1 a 3.8, el crecimiento de levaduras y mohos, que son los organismos del deterioro encontrado en las bebidas, es detenido. No significa que estos microorganismos mueran, sino que estos no pueden crecer en estas condiciones. (Dege, 2007)

Para el desarrollo de bebidas en general y específicamente en bebidas saborizadas y funcionales, se deben considerar algunos aspectos:

- Se debe tener una comprensión clara de la información y requerimientos del producto antes de comenzar, para asegurar que la formulación e ingredientes encajen con las expectativas del mercado destino. Los requerimientos deben incluir el tipo de empaque porque esto va a influenciar la dirección que se debe tomar en cuenta en la formulación.
- Se debe tener asesoramiento legal cuando se desea colocar declaraciones de propiedades saludables en el producto
- Siempre se deben probar las muestras desarrolladas a la temperatura a la que están destinadas para ser consumidas.
- Se debe estar seguro de que se han eliminado los riesgos de contaminación cruzada del laboratorio, en las bebidas de prueba y en los ingredientes.
- Tener en mente el proceso de manufactura, conocer si este tendrá un impacto en el producto y si necesita algún ajuste en la formulación.
- El agua es el ingrediente que se encuentra en mayor proporción en la bebida, y la calidad y especificaciones de esta no se deben pasar por alto.

5. Producción.

Tabla 5. Opciones de proceso en los principales tipos de envases y bebidas.

	Con preservantes "Cold fil" (Llenado en frío)	Pasteurizado. Llenado en "Cold fil" (Llenado en frío)	Pasteurizado. "Clean fil"	Empacado Pasteurizado	Pasteurizado "Hot fil" (Llenado en caliente)
Tipo de empaque					
PET	Sí	Sí	Sí	No	No
PET para llenado en caliente	No	No	No	No	Sí
Vidrio	Sí	Sí	No	Sí	Sí
Lata	Sí	Sí	No	Sí	No
Tipo de bebida	Sí	Sí		Sí	
Carbonatada	Sí	Sí	No	Sí	No
Si carbonatar	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

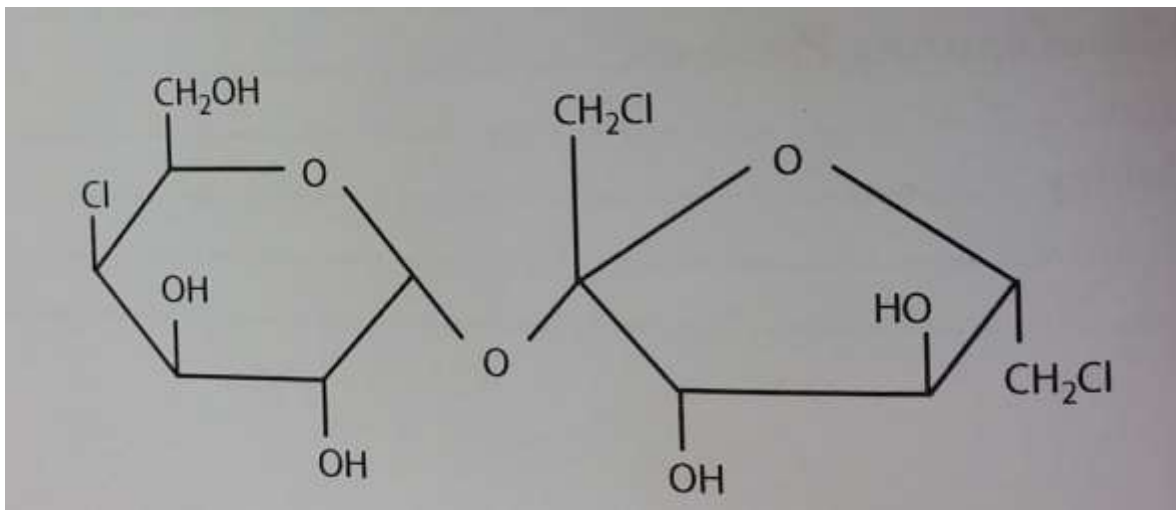
(Dege, 2007)

E. Edulcorantes

1. **Sucralosa.** El dulzor de la sucralosa (SPLENDA) fue descubierto en la Universidad de Londres durante los 1970s. Se pudo demostrar que la cloración selectiva de la sacarosa puede resultar en compuestos endulzantes. Este descubrimiento llevó a una serie de estudios que por último identificó a la sucralosa (4-cloro-4-desoxi- α -galactopiranosido de 1,6 dicloro 1,6-didesoxi- β -D-fructofuranosilo) como el edulcorante más prometedor. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

La sucralosa está formada de sacarosa (azúcar de mesa) por medio del reemplazo selectivo de los tres grupos hidroxilo por cloro. A pesar de que no es azúcar, la sucralosa posee un sabor dulce similar a la sacarosa, sin dejar un resabio desagradable. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Figura 6. Estructura molecular de la sucralosa



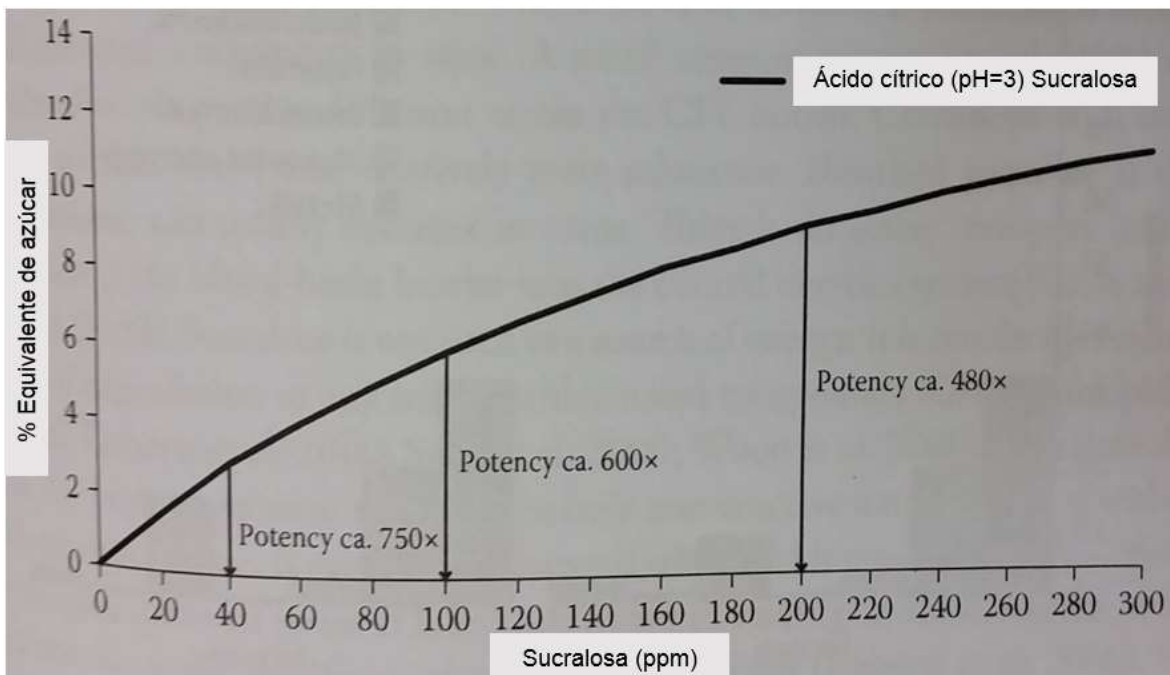
(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

La unión glicosídica de la sucralosa es significativamente más resistente al ácido y a la hidrólisis enzimática en comparación con la sacarosa. La resistencia de este enlace glicosídico se debe a la incapacidad de los mamíferos de digerir la molécula y metabolizarla como recurso energético. Es por ello que la sucralosa es no calórica. Los microorganismos que se encuentran en la cavidad bucal, responsables de la formación de la placa dental, no pueden utilizar la sucralosa como energía y por ello esta molécula es no cariogénica. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

La sucralosa es segura para todos los individuos. Su uso está permitido en más de 100 países es consumida a diario por personas de todo el mundo. La Comisión del Codex Alimentarius ha adoptado disposiciones para el uso de la sucralosa y el JEFCA (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) ha establecido que 15 mg/kg/día es la ingesta diaria admisible. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

a. **Potencial de dulzor.** La potencia de dulzor de la sucralosa es de 600 veces mayor que la sacarosa, pero al igual que otros edulcorantes de alta potencia, este factor varía dependiendo de la cantidad de sucralosa que se utilizará y de la influencia de otros ingredientes. En la Figura que se presenta a continuación, se observa la curva de respuesta de la sucralosa a la dosis en un sistema sin sabor acidificado, con un pH=3.0. Esto demuestra que la sucralosa puede ser 750 veces más dulce que la sacarosa cuando se tiene una concentración con un equivalente a 3% de azúcar. Es 600 veces más dulce en una concentración equivalente a 6-7% de azúcar. Y es 480 veces más dulce en una concentración equivalente a 9-10% de azúcar. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Figura 7. Curva de respuesta del dulzor de la sucralosa en función de la concentración, en un sistema sin sabor acidificado con un pH=3.0.



(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Las características temporales del dulzor, como inicio del dulzor, tiempo de máxima intensidad, velocidad de decaimiento del dulzor, son interesantes para los formuladores de bebidas y alimentos. Se ha demostrado que el perfil de dulzor de la sucralosa es similar al de la sacarosa. En una bebida de café o de té con un 5% de dulzor equivalente al azúcar, la sucralosa muestra un rápido inicio de dulzor y una duración similar al de la sacarosa. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

b. **Uso de la sucralosa en bebidas.** La sucralosa es ampliamente utilizada en bebidas. En la Tabla se presentan algunos ejemplos típicos de los niveles de sucralosa utilizados en distintas bebidas. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Tabla 6. Niveles de uso típico de sucralosa en productos de bebidas.

Bebida	Porcentaje de dulzor de azúcar aparente	Porcentaje de sucralosa
Bebidas carbonatadas	9%-11%	0.018%-0.0225%
Bebidas sin gas	7%-9%	0.012%-0.018%
Mezclas en polvo (listas para consumir)	9.5%	0.019%
Leche saborizada a fresa	4%	0.0058%

(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

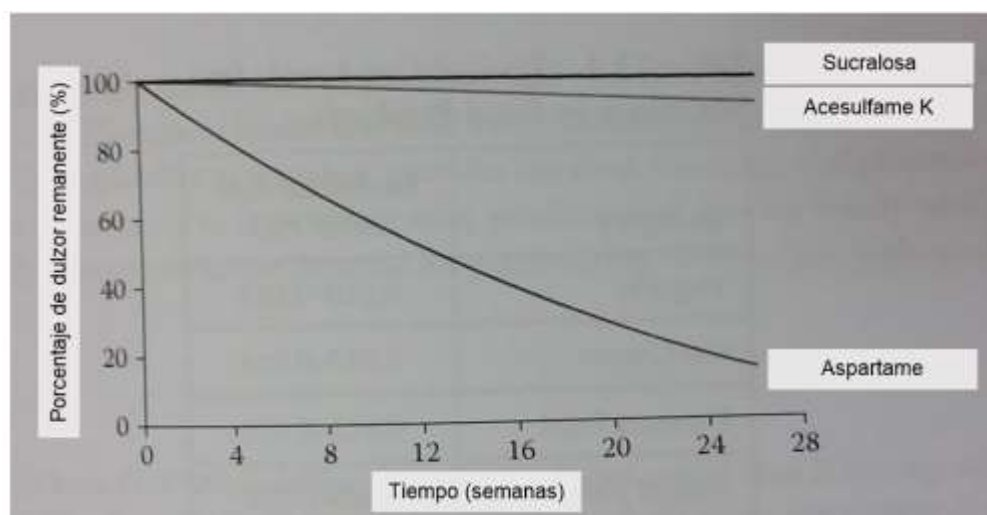
La estabilidad de la sucralosa ha sido demostrada en sistemas modelos. Y al ser confirmado esto, se han llevado a cabo más estudios para demostrar su estabilidad en productos formulados. En la siguiente tabla es posible observar los resultados de dos productos de cola almacenados a 20°C. Y en la figura se observa la comparación de la estabilidad de la sucralosa, el acesulfame de potasio y el aspartame en bebidas de cola almacenadas a 35°C. En ambos estudios se realizaron los análisis por medio de HPLC. Los resultados en estas investigaciones demuestran que las bebidas endulzadas con sucralosa mantienen un dulzor consistente a través del procesamiento y de la vida de anaquel del producto debido a la estabilidad de este edulcorante. (Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Tabla 7. Estabilidad de la sucralosa en una bebida de cola a 20°C.

Tiempo (semanas)	Sucralosa	
	Bebida sabor a cola a un pH=3	Bebida sabor a cola a un pH=2.7
0	191 ppm	184 ppm
5	198 ppm	182 ppm
10	192 ppm	183 ppm
17	194 ppm	183 ppm
25	194 ppm	184 ppm

(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

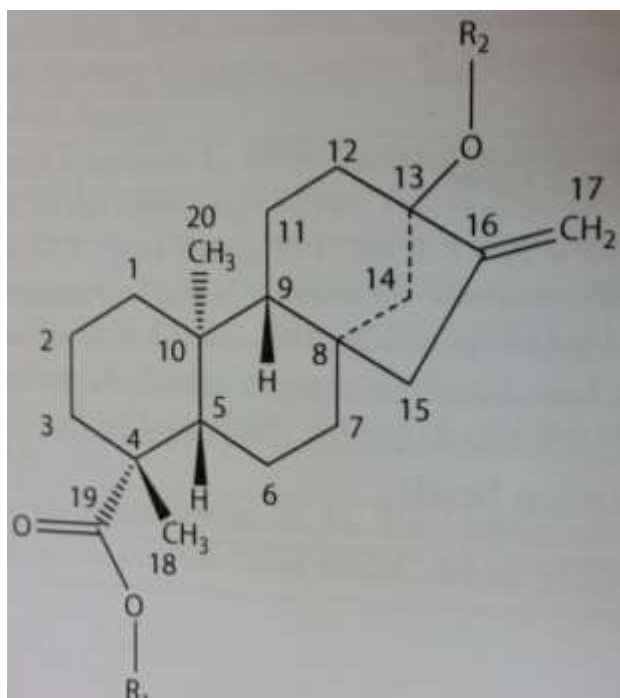
Figura 8. Estabilidad de dulzor de la sucralosa, acesulfame K y aspartame en bebida de cola (pH=3.2) a 35°C



(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

2. Glucósidos de esteviol. Se han identificado 10 glucósidos de esteviol con sabor dulce en la estevia. Todos estos son glucósidos con un aglicona en común, el esteviol. Los glucósidos de esteviol varían en el número y tipo de azúcares que poseen. Los primeros extractos de estevia producidos comercialmente, contenían principalmente esteviósido. En la actualidad, se encuentra disponible productos de rebaudiósido A (con pureza superior a 95%) y productos formados con mezclas altamente purificadas de rebaudiósidos A, B, C, D y F, esteviósido, biósido de esteviol, dulcósido A y rubosósido). En la siguiente figura se observa que el esteviol es el núcleo de todos los glucósidos de esteviol siendo R1= OH y R2=H.

Figura 9. Esteviol.

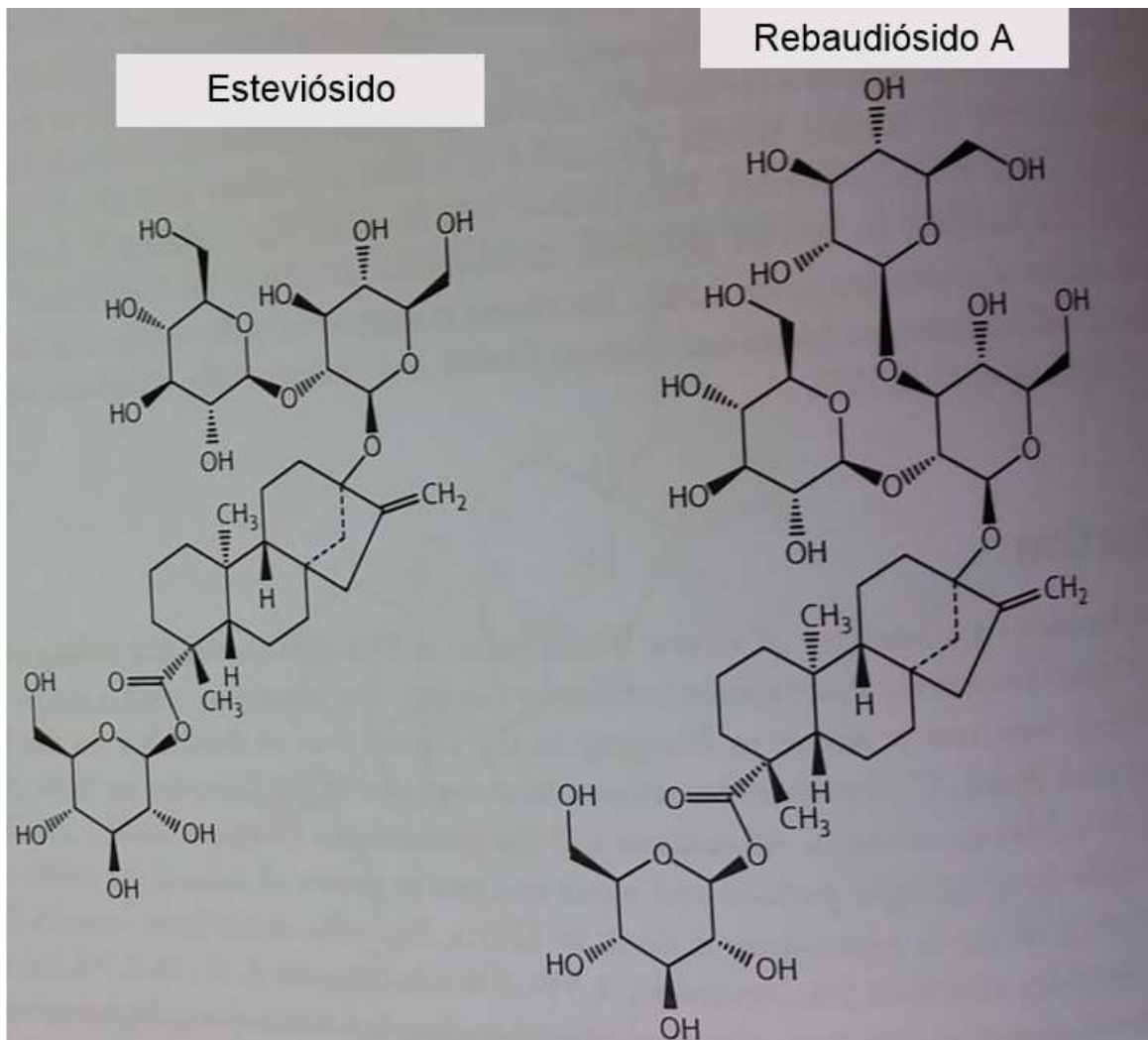


(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

Tabla 8. Estructuras de glucósidos de esteviol y potencia de dulzor (sacarosa=1)

Compuesto	Grupos R en el Esteviol		Potencia de dulzor
	R1	R2	
Dulcósido A	β -glc-	α -rha- β -glc	30
Rebaudiósido A	β -glc-	$(\beta$ -glc) $_2$ - β -glc-	200-300
Rebaudiósido B	H	$(\beta$ -glc) $_2$ - β -glc-	150
Rebaudiósido C	β -glc-	$(\beta$ -glc-, α -rha-)- β -glc-	30
Rebaudiósido D	β -glc- β -glc-	$(\beta$ -glc) $_2$ - β -glc-	221
Rebaudiósido E	β -glc- β -glc-	β -glc- β -glc-	174
Rebaudiósido F	β -glc-	$(\beta$ -glc-, α -xyl-)- β -glc-	200
Rubosósido	β -glc-	β -glc-	114
Biósido de esteviol	H	β -glc- β -glc-	90
Esteviósido	β -glc-	β -glc- β -glc-	150-250

Figura 10. Estructura química del Estevióside y del Rebaudiósido A



(Lyn O'Brien Nabors, 2012)

V. METODOLOGÍA

A. Evaluación de percepción del mercado.

Se llevó a cabo una evaluación de mercado para conocer la percepción que tienen las personas a las bebidas envasadas y a los edulcorantes y colorantes, tanto naturales como artificiales. Para ello se elaboró una encuesta con 16 preguntas la cual se pasó a 50 hombres y mujeres entre 15-40 años de edad. Las personas encuestadas eran estudiantes universitarios, profesionales y catedráticos de instituciones educativas. La encuesta se encuentra en ANEXOS.

B. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías utilizando colorante artificial rojo allura.

Se desarrolló una bebida de fresa sin carbonatación y sin calorías. El sabor, el cual fue proporcionado por una casa de sabores, tenía la clasificación de “natural”. Para endulzar la bebida se empleó los edulcorantes sucralosa y estevia. Como acidulante se utilizó ácido cítrico y ácido málico, como antioxidante se usó EDTA, y además se añadió citrato de sodio como regulador de la acidez. Y para darle color, se empleó el colorante artificial rojo allura AC. No se realizó ningún tratamiento térmico a la bebida y se envasó en PET transparente de 355 mL.

Para la formulación se preparó primero un “jarabe”, es decir una bebida concentrada. Esta formulación se elaboró con una relación (1+5); para preparar el producto terminado se debía añadir una parte de jarabe y 5 partes de agua. Se hizo de esta manera ya que así es como se trabaja en la industria procesadora de bebidas en la que se realizó esta etapa del estudio.

Los pasos que se llevaron a cabo para la formulación de la bebida a nivel de laboratorio fueron los siguientes:

- Realizar el cálculo de los ingredientes de acuerdo al volumen final.
- Pesar el agua a utilizar.
- Tener dos vasos de precipitado: el #1 será para llevar a cabo la disolución y el #2 para ir realizando la mezcla.
- Pesar en el vaso de precipitado #1 los edulcorantes: estevia y sucralosa. Agregar del agua ya pesada, disolver y agregar al vaso de precipitado #2.
- Poner agitar la mezcla del vaso de precipitado #2.

- Pesar en el vaso de precipitado 1# el benzoato de sodio. Agregar agua de la ya pesada, disolver y agregar al vaso de precipitado #2.
- Pesar en el vaso de precipitado #1 el ácido cítrico, el ácido málico y el citrato de sodio. Agregar agua de la ya pesada, disolver y agregar al vaso de precipitado #2.
- Pesar en el vaso de precipitado #1 el EDTA. Agregar agua de la ya pesada, disolver y agregar al vaso de precipitado #2.
- Pesar en el vaso de precipitado #1 el colorante. Agregar agua de la ya pesada, disolver y agregar al vaso de precipitado #2.
- Agregar el resto de agua y dejar agitando por 5 minutos más.
- Envasar utilizando 1 parte (en volumen) del jarabe que se preparó y 5 partes (en volumen) de agua.

C. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías utilizando antocianinas como fuente de colorante.

Al tener la fórmula aprobada de la bebida saborizada coloreada con rojo allura AC, se realizó la sustitución del colorante artificial a uno natural. Se solicitó a distintos proveedores antocianinas de distintas fuentes. Se hicieron aplicaciones en bebidas de tal manera que se obtuviera una tonalidad de color similar a la referencia la cual era la bebida con el colorante artificial.

Los pasos para formular la bebida son los mismos mencionados en el inciso anterior, únicamente varía el colorante a utilizar, porque en esta ocasión se usó colorantes naturales.

D. Pruebas sensoriales

Se hicieron pruebas hedónicas para determinar el nivel de agrado que tienen los consumidores hacia el producto donde ellos evaluaron características de sabor, color, aroma, y apariencia general de las bebidas saborizadas de fresa, sin calorías y con colorantes naturales. Ellos debían indicar su nivel de agrado para cada atributo, las opciones eran: me gusta mucho, me gusta moderadamente, no me gusta ni me disgusta, me disgusta moderadamente, me disgusta mucho. En Anexos se encuentra la boleta que se utilizó para esta prueba.

Esta prueba la realizaron 40 personas, para ello no era necesario que pertenecieran a un panel entrenado.

E. Estudio de estabilidad de bebida por medición de parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, porcentaje de acidez y color)

1. °Brix. Para llevar a cabo esta medición se utilizó un refractómetro automático modelo RFM91 marca Bellingham + Stanley.

2. pH. Para la medición de pH se utilizó el electrodo de un titulador potenciométrico Titroline 6000 el cual fue previamente calibrado con buffer de pH=4 y pH=7. Los pasos que se siguieron para la medición del pH fueron los siguientes:

- a. Se limpió el electrodo con agua destilada.
- b. Se tomó una muestra de aproximadamente 50 mL y se colocó en un vaso de precipitado de 100 mL y se puso a agitar.
- c. Se sumergió el electrodo y se esperó a que estabilizara.
- d. Se tomó el dato de pH de la bebida.

3. Acidez titulable. Se utilizó un titulador potenciométrico Titroline 6000. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- a. En un vaso de precipitado de 250 mL se agregó 100 mL de la muestra de la bebida.
- b. Se agregó NaOH 0.1 N hasta alcanzar un punto final de pH=8.70
- c. El valor que se obtiene es el dato de acidez titulable.

4. Porcentaje de acidez. Se utilizó un titulador potenciométrico Titroline 6000. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- a. En un vaso de precipitado de 250 mL se pesó entre 10-20 gramos de bebida y se anotó el peso.
- b. Se agregó agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 mL
- c. Se agregó NaOH 0.1 N hasta alcanzar un punto final de pH=8.30
- d. Se calculó el porcentaje de acidez, con respecto al ácido cítrico, de la siguiente manera:

$$\text{Porcentaje de acidez (\%)} = \frac{(0.6404)(\text{mL de NaOH})(\text{Normalidad NaOH})}{\text{Peso de la muestra (g)}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

5. Color. Se utilizó el colorímetro marca Hunter Lab modelo ColorQUEST II para medir el color en cada una de las muestras. Se utilizaron 100mL de cada bebida a analizar para colocar en la celda y realizar la lectura.

F. Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

1. Materiales

- a. Matraces aforados de 50mL
- b. Buffer de pH=1
- c. Buffer de pH= 4.5
- d. Pipetas de 10 mL
- e. Pipeteador

2. Equipo. Aparato de Espectrofotometría UV/VIS marca Thermo Electron Corporation modelo Genesys 10 UV scanning

3. Preparación de muestras y procedimiento. El contenido total de antocianinas monoméricas se determinó utilizando el método diferencial de pH. Este método se basa en la transformación estructural de antocianina debido a los cambios de pH. Para ello se siguieron los siguientes pasos:

- a. Alícuotas de 10 mL de las bebidas formuladas se diluyeron en 40mL de los buffer de 1.0 y 4.5 respectivamente y luego se colocaron en la oscuridad por 50 minutos.
- b. La absorbancia de cada solución se midió después del equilibrio utilizando un espectrofotómetro (UV-1700) a una longitud de onda de absorción máxima que es este caso fue 515 nm y a 700 nm vs una celda en blanco con agua destilada. (Jie, 2013)
- c. La absorbancia se calculó siguiendo la Ecuación 1.

$$\text{Abs} = (\text{Abs}_{\lambda_{\text{vis-max}}} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1.0} - (\text{Abs}_{\lambda_{\text{vis-max}}} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4.5} \quad (\text{Ecuación 1})$$

El coeficiente de extinción molar de cianidina 3-glucósido es 26,900. El total del contenido de antocianinas monoméricas se calculó y expresó como equivalentes de cianidin-3-glucósido, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de antocianina (mg / L)} = \text{Abs} \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000 / (\epsilon \times \text{L}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde:

Abs = absorbancia

ϵ = absorbancia molar de cianidin 3-glucósido (26900)

L = longitud de la celda (1 cm)

M = peso molecular de la antocianina (449.2 D)

DF = es el factor de dilución de

G. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

1. Materiales

- a. Reactivo de DPPH marca Sigma-Aldrich
- b. Metanol marca Merck, pureza 99.9%
- c. Balón volumétrico de 250mL
- d. Vaso de precipitado
- e. Espátula
- f. Tubos de ensayo
- g. Gradilla
- h. Micropipetas de 10-1000 μ L

2. Equipo

- a. Aparato de Espectrofotometría UV/VIS marca Thermo Electron Corporation modelo Genesys 10 UV scanning.
- b. Vortex

3. Preparación de muestras.

a. Se preparó una solución de 6×10^{-5} M de DPPH en metanol, en un balón de 250 mL. Inmediatamente luego de prepararlo, se forró el balón con papel aluminio para que no interfiriera la luz con el DPPH.

b. Se prepararon las muestras de la siguiente manera.

# Tubo	Bebida (mL)	Metanol (mL)	DPPH (mL)
1	0.02	2.98	3.9
2	0.03	2.97	3.9
3	0.06	2.94	3.9
4	0.09	2.91	3.9
5	0.12	2.88	3.9
6	0.15	2.85	3.9
7	0.18	2.82	3.9
8	0.21	2.79	3.9
9	0.24	2.76	3.9
10	0.27	2.73	3.9

4. Procedimiento.

- a. Se colocó los 10 tubos en una gradilla para luego ser agitados por un vortex durante 15 seg cada uno y así obtener una mezcla homogénea en cada tubo.
- b. Luego de eso, se midió la absorbancia de cada tubo a través del aparato de espectrofotometría a una longitud de onda de 515 nm, utilizando como blanco al metanol puro.
- c. Después de la lectura, se almacenó en un lugar oscuro durante 2 horas.
- d. Al transcurrir el tiempo, se volvió a repetir las lecturas de absorbancia agitándolas previamente en el Vortex por 15 segundos más.
- e. Una vez obtenidos los datos para el tiempo 0 y para el tiempo 2 horas, se continuó con la determinación de la capacidad antioxidante a través de la Ecuación 3 para obtener el porcentaje de pérdida de absorbancia. Se graficó los datos para poder encontrar la ecuación de la recta y así determinar el valor para IC50.

$$\text{Porcentaje de pérdida de absorbancia (\%)} = \left[\frac{(\text{abs}_0 - \text{abs}_{30})}{\text{abs}_0} \right] \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

H. Análisis de costos

Este análisis se realizó debido a que el costo de un colorante natural en comparación a uno artificial, es sumamente alto. Por ello fue importante determinar la elevación del costo que se tuvo al hacer la sustitución en la bebida del rojo allura por antocianinas. Los costos se calcularon en Hojas de Excel.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Evaluación de percepción del mercado

Para llevar a cabo el estudio, lo primero que se realizó fue una evaluación de la percepción que tienen las personas a las bebidas envasadas y a los edulcorantes y colorantes, tanto naturales como artificiales. Para ello se elaboró una encuesta con 16 preguntas la cual se pasó a 50 persona entre 15-40 años de edad, estudiantes universitarios y profesionales.

Como se observa en la Figura 11, el 42% de las personas prefieren las aguas carbonatadas mientras que 58% restante prefiere otras bebidas, como agua mineral, aguas saborizadas, néctares y jugos y agua pura. Así también en la Figura 12 se observa que el 51% de las personas prefieren una bebida sin carbonatación, mientras que el 49% las prefiere carbonatadas. Esto es importante porque los consumidores están continuamente buscando alternativas a las bebidas carbonatadas debido a que están expuestos a mayor información y conocimientos y muestran mayor preocupación por su salud.

Con respecto a la opinión que tienen las personas acerca del azúcar (ver Figura 13), se pudo determinar que el 81% de los encuestados consideran que en cantidades moderadas el azúcar no tiene efectos nocivos a la salud. El 19% restante opina lo contrario, que sí es perjudicial siendo causante de obesidad y provocando alteración en el metabolismo. En cuanto a las bebidas reducidas en azúcar o dietéticas (ver Figura 14), únicamente el 27% de los encuestados las prefieren, el otro 73% indica que al comprar una bebida, no escoge esta opción "light" indicando que éstas pueden llegar a ser peores a la salud por tener compuestos artificiales y otros comentaron que no les gusta el sabor que tienen. Esta información nos revela que un gran porcentaje de personas tiene más conocimientos acerca de los edulcorantes que poseen las bebidas dietéticas y saben que estos compuestos no son naturales y por lo tanto piensan que no es beneficioso a la salud. Así también se puede comprobar que los consumidores no están dispuestos a sacrificar el sabor, ellos perciben el resabio que poseen los edulcorantes no calóricos y por lo tanto rechazan esta opción.

Como se puede ver en la Figura 15, el 48% de las personas conoce la sucralosa, el 30% el aspartame y únicamente el 15% la estevia; el 7% conoce otros edulcorantes. Pero a pesar de que tienen conocimiento de estos edulcorantes, el 68% de las personas utilizan azúcar para endulzar sus bebidas, mientras que el 7% usa sucralosa, el 3% usa estevia y 10% utiliza otro edulcorante (miel de abeja, ágave, entre otros). Ninguno de los encuestados utiliza aspartame para endulzar sus bebidas y un 12% prefiere no endulzarlas.

Figura 11. Pregunta 1: De la siguiente lista de bebidas envasadas, ¿cuál consume más frecuentemente?

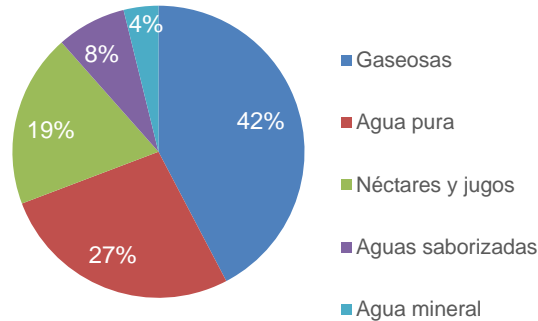


Figura 13. Pregunta 3: ¿Qué opinión personal tiene acerca del consumo de azúcar?

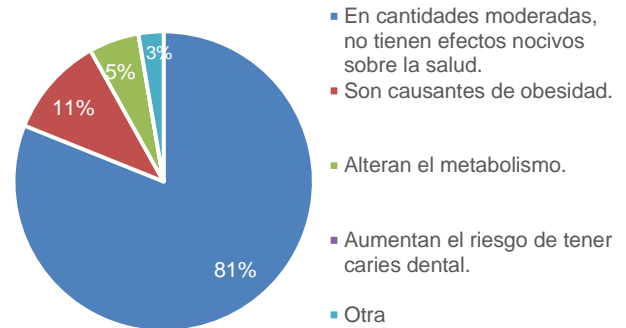


Figura 12. Pregunta 2: ¿Cómo prefiere que sean las bebidas envasadas?

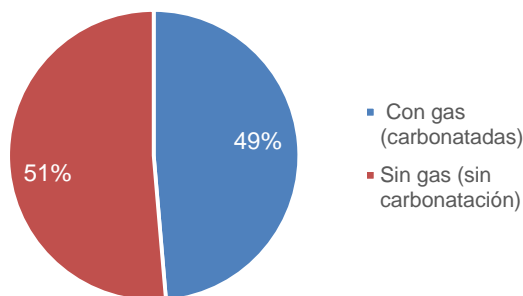


Figura 14. Pregunta 4: Al comprar una bebida envasada, ¿usted elige una opción que sea reducida en azúcar o “light”?

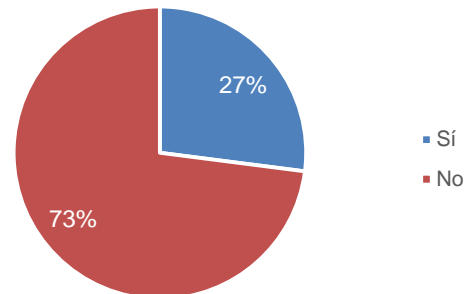


Figura 15. Pregunta 5: ¿Cuál de los siguientes edulcorantes (endulzantes) sin calorías conoce? (Puede marcar más de una opción)

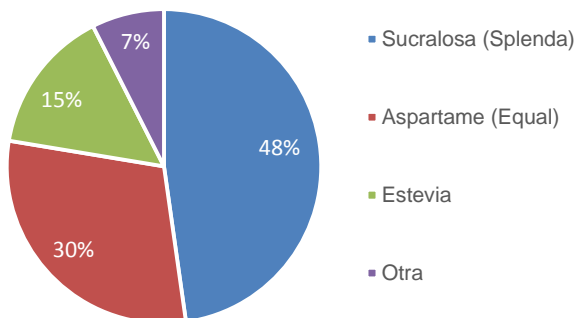
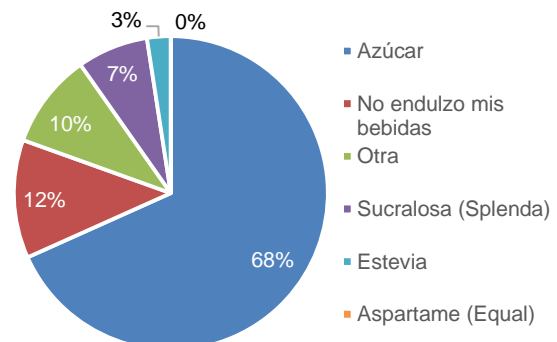


Figura 16. Pregunta 6: ¿Qué utiliza para endulzar sus bebidas?



En la Figura 17 se observa que el 50% de las personas opinan que la sucralosa es una buena opción para las personas diabéticas o para quienes llevan una dieta. 29% de los encuestados opina que es un producto artificial y un 5% lo ven como un producto natural. 11% de las personas lo relacionan como un producto dañino para la salud.

Los resultados anteriores se pueden comparar con los de la Figura 16 en la cual se grafica las respuestas sobre la opinión del aspartame. Aquí sólo un 24% opina que es una buena opción para las personas diabéticas o para quienes están llevando una dieta baja en calorías. Un 26% (porcentaje mayor a lo que se obtuvo con la sucralosa) opina que el aspartame es dañino para la salud. Un 29% percibe el aspartame como un producto artificial y un 8% opina que es natural.

En cuanto a la estevia, se puede observar que aún las personas tienen opiniones muy diversas, la gráfica de la Figura 19 se ven las respuestas más distribuidas. En comparación con la sucralosa y el aspartame, aquí un 18% opina que es completamente natural. 16% piensan que es igual a la sucralosa y aspartame, 15% considera que es mejor, 10% opina que es el endulzante que está de moda, 15% indica que los productos endulzados con estevia tienen sabor desagradable y el 31% restante no conoce el producto por lo cual no tiene opinión o su percepción de la estevia es diferente a las anteriores. Esto se explica en la siguiente gráfica, en la Figura 20 donde se observa que el 76% de las personas indicaron que no habían consumido productos con estevia mientras que el 24% indicó que sí.

Con esto se puede determinar que entre la sucralosa y el aspartame las personas tienen una mejor percepción de la sucralosa, se ve como una buena opción para las personas que no consumen azúcar. La percepción del aspartame es negativa, es vista como un producto dañino para la salud. Con respecto a la estevia, aún no es tan conocida, pero quienes la conocen, opinan que es un producto natural aunque muchos indican que no les agrada el perfil de dulzor que posee. Esto último se debe a que la estevia tiene notas amargas.

Figura 17. Pregunta 7: ¿Qué opinión tiene sobre la sucralosa (Splenda)?

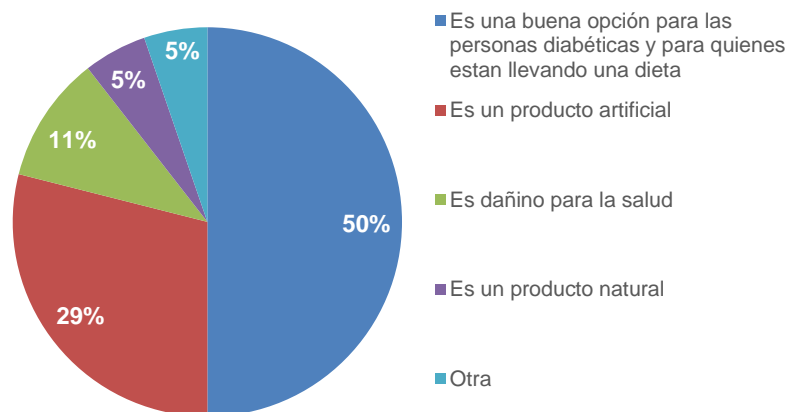


Figura 18. Pregunta 8: ¿Qué opinión tiene sobre el aspartame (Equal)?

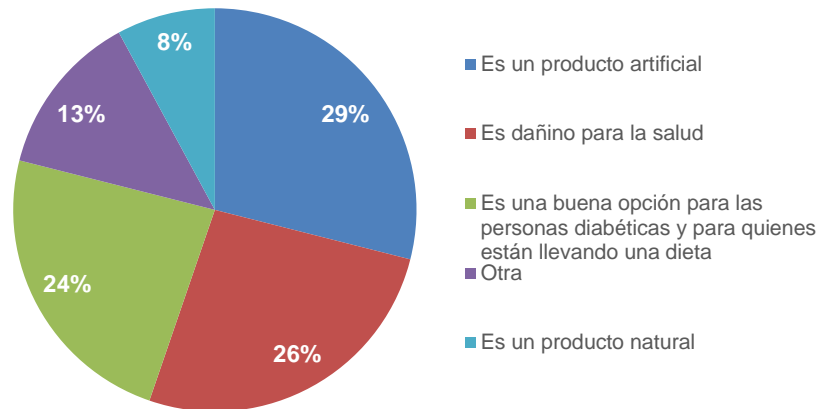


Figura 19. Pregunta 9: ¿Qué opinión tiene sobre la estevia? (Puede marcar más de una opción)

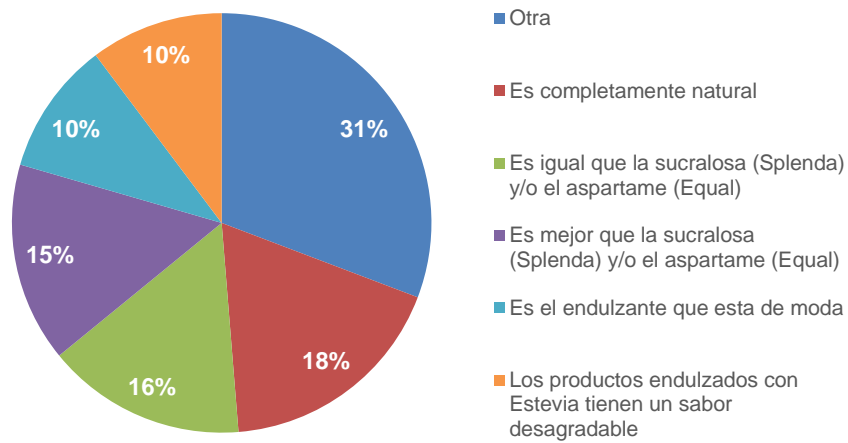
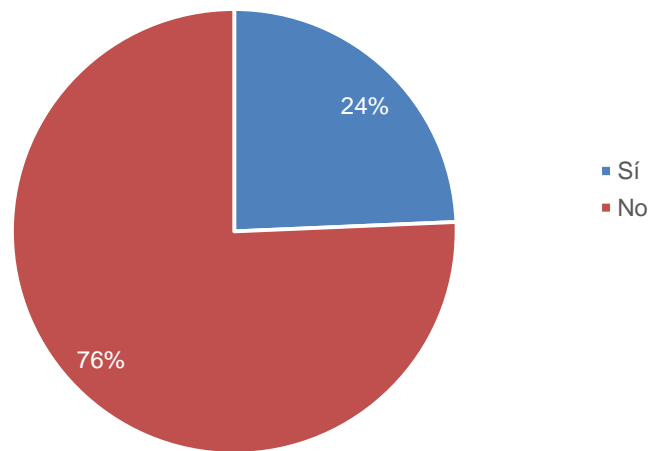


Figura 20. Pregunta 10: ¿Ha consumido alimentos con estevia?



Luego de realizar las preguntas relacionadas a los edulcorantes, las cuales eran importantes para la parte de la formulación de la bebida de este estudio, se procedió a las preguntas relacionadas a los colorantes.

Como se observa en la Figura 21, el 100% de las personas han escuchado hablar de los colorantes artificiales. Como se ve en la Figura 22, el 35% opina que estos son dañinos para la salud y el 19% indica que estos causan hiperactividad en niños. Al sumar estos dos porcentajes se observa que un 54% de los encuestados relacionan los colorantes artificiales con algo perjudicial a nuestra salud. Este es un porcentaje superior al 32% que opina que en cantidades moderadas estos no tienen efectos nocivos a la salud.

Figura 21. Pregunta 11: ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes artificiales?

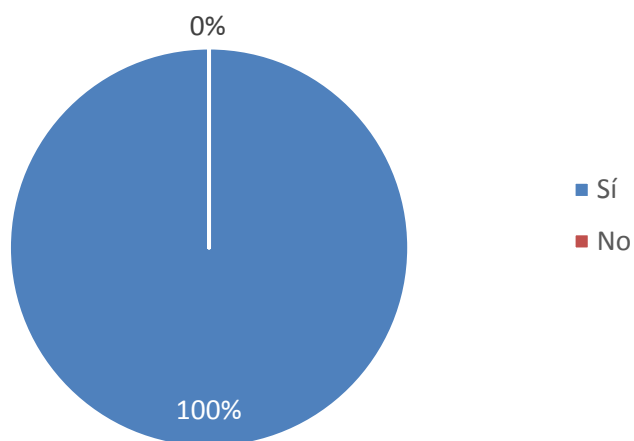
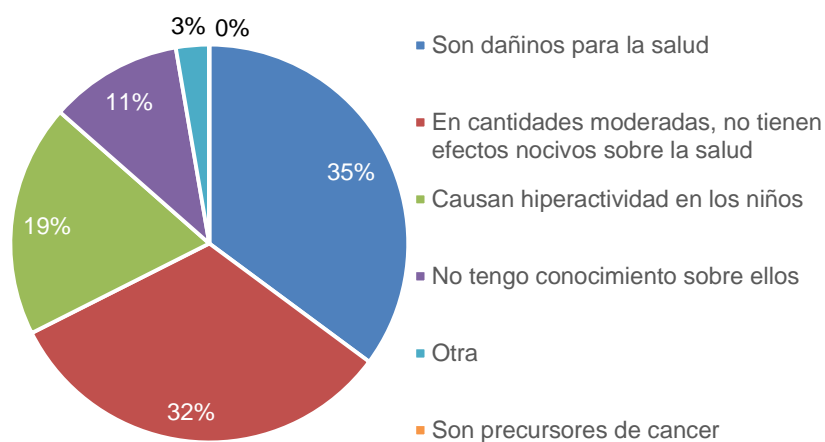


Figura 22. Pregunta 12: ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes artificiales?



Con respecto a los colorantes naturales, se observa en la Figura 23 que el 84% de las personas han escuchado hablar de ellos, en comparación con los colorantes artificiales que eran conocidos por el 100%. Debido a que muchas personas aún no tienen conocimiento sobre los colorantes naturales, en la pregunta de la Figura 24 se observa que un 27% indicó que no tenía una opinión de ellos. De quienes han escuchado hablar de los colorantes naturales y se han podido formar un criterio, se obtuvo que un 24% saben que estos tienen propiedades antioxidantes. Un 38% indicó que estos no tienen ningún efecto nocivo para la salud, únicamente un 11% declaró que estos provocan efectos nocivos a la salud. Ninguno indicó que estos fueran causantes de hiperactividad. En ninguno de los dos tipos de colorantes indicaron los encuestados que estos fueran precursores de cáncer.

Figura 23. Pregunta 13: ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes naturales?

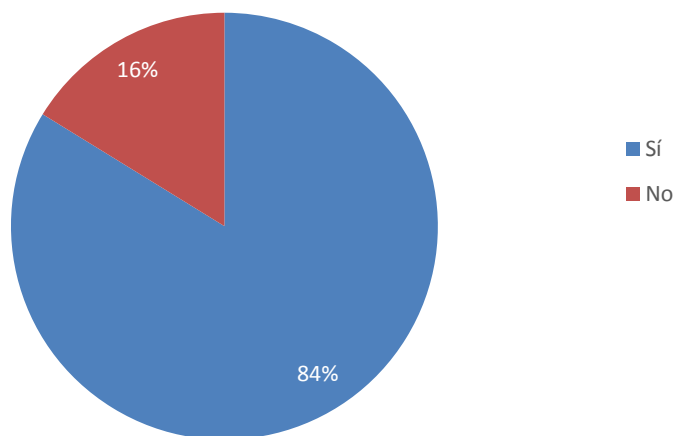
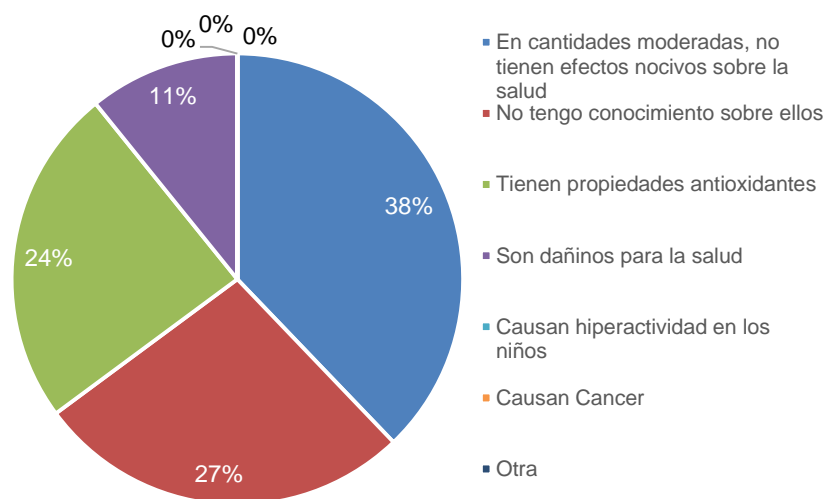


Figura 24. Pregunta 14: ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes naturales?



Por último se preguntó si estarían dispuestos a consumir bebidas endulzadas con estevia y que tuvieran colorantes naturales. Como se observó anteriormente, muchas personas no conocen la estevia, a pesar de ello un 49% indicó que sí consumiría una bebida endulzada con este edulcorante natural (ver Figura 25). Con respecto a los colorantes naturales, tal como se observa en la Figura 26, un 84% de los encuestados indicó que sí consumiría un producto con estos compuestos, mientras que sólo un 16% indicó que no lo haría, esto debido a que no tiene información suficiente de ellos o a que tiene una percepción negativa.

Figura 25. Pregunta 15: ¿Consumiría un una bebida endulzada con estevia?

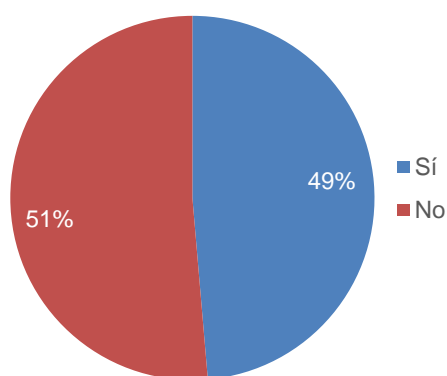
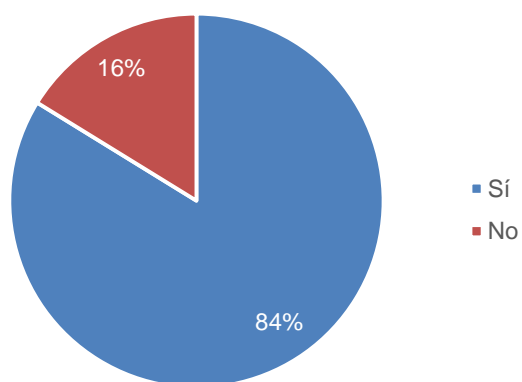


Figura 26. Pregunta 16: ¿Consumiría un una bebida con colorantes naturales?



Los resultados obtenidos en esta evaluación nos demuestran que tanto estudiantes universitarios como profesionales están en búsqueda de opciones más saludables, están interesados en consumir bebidas que no sean carbonatadas. A pesar de ello, rechazan los productos bajos o sin azúcar cuando estos no tienen un buen sabor, o contienen edulcorantes como el aspartame y cuando el perfil del dulzor del edulcorante presenta resabios o notas desagradables. Además la población encuestada cuenta con más información de los colorantes y ya ven lo artificial como algo perjudicial para la salud. Por otro lado un porcentaje alto de encuestados ha escuchado hablar de los colorantes naturales, y cierto nicho conoce las propiedades antioxidantes que estos tienen. Esta información fue indispensable para la siguiente etapa del estudio que fue la formulación de la bebida.

B. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías, utilizando colorante artificial rojo allura AC.

Se llevó a cabo el desarrollo de la bebida saborizada dentro de una industria procesadora de bebidas en la ciudad de Guatemala.

Para poder desarrollar el producto, lo primero fue tener claro el concepto: bebida saborizada de fresa, sin calorías y con colorantes naturales. Teniendo esto, se procedió a la búsqueda de proveedores de las materias primas nuevas para la industria en la que se trabajó.

La manera en la que se procesan las bebidas en la industria es elaborando un “jarabe”. Esto se lleva a cabo en un área específica dentro de la planta. Luego este, es trasladado por medio de tuberías a la línea de producción en la que primero se realiza la mezcla del jarabe con el agua en una relación específica que se encuentra en la formulación de cada producto.

La formulación de este estudio se desarrolló con una relación de (1+5), es decir una parte de concentrado y cinco partes de agua.

Debido a que se desarrollaría un producto sin calorías, era necesario definir qué edulcorantes debían de utilizarse. Se eligió que se utilizaría una combinación de sucralosa y estevia. La sucralosa se escogió porque como se observó anteriormente, el mayor porcentaje de personas tienen una opinión positiva de este edulcorante (ver Figura 17). Este es un compuesto que ha sido ampliamente estudiado y se ha demostrado que es seguro para el ser humano. Además este tiene la ventaja de que produce un perfil de dulzor similar al azúcar, y es bastante estable, no varía durante el procesamiento y vida de anaquel de las bebidas. (Lyn O'Brien Nabors, 2012).

A continuación se presenta la formulación de la bebida saborizada de fresa. Se decidió desarrollar la bebida sin carbonatación debido a que como se pudo determinar en la evaluación del consumidor, un porcentaje ligeramente superior, prefiere las bebidas sin carbonatación (ver Figura 12). El sabor que se utilizó es natural. Se usó ácido cítrico como acidulante y el ácido málico además de ser también acidulante se agregó específicamente porque, al realizar pruebas, se pudo comprobar que este compuesto ayuda a enmascarar notas indeseables de la estevia. Se añadió citrato de sodio como un regulador de la acidez. Como antioxidante se utilizó EDTA. Y para darle el color a la bebida se usó rojo allura AC. Se añadió un mínimo porcentaje de azul brillante FCF, para modificar ligeramente la tonalidad y se vea más a una bebida de fresa. El color que se obtuvo es un color rojo brillante. Este brillo lo proporcionan los colorantes artificiales.

Tabla 9. Fórmula 1: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando rojo allura AC (rojo 40) como colorante artificial.

Ingrediente	Funcionalidad	Porcentaje de concentrado (%)
Agua	Base	97.20
Sucralosa	Edulcorante	0.06
Estevia	Edulcorante	0.01
Benzoato	Preservante	0.15
Ácido cítrico	Acidulante	0.70
Ácido málico	Acidulante	0.20
Citrato	Regulador de la acidez	0.14
EDTA	Antioxidante	0.06
Sabor natural a fresa	Saborizante	1.43
Rojo allura AC (Rojo 40)	Colorante	0.05
Azul brillante FCF (azul 1)	Colorante	0.00005160

C. Formulación de bebida saborizada de fresa, sin calorías, utilizando antocianinas como colorantes naturales.

Teniendo la fórmula y la referencia del color, se procedió a buscar tonalidades similares, dentro de la gama de las antocianinas, porque dentro de la gama de los colorantes naturales, estas aportan tonalidades rojas. Se realizó la búsqueda de proveedores que ofrecieran antocianinas que distintas fuentes. En la siguiente tabla se observan lo que se recolectó.

Tabla 10. Fuentes de antocianina que se recopilaron de distintos proveedores.

Proveedor	Fuente de antocianina
1	Col roja
2	Remolacha roja
3	Zanahoria negra (en polvo)
4	Zanahoria negra (en líquido)
5	Jugo de frutas

Se elaboraron las bebidas utilizando de referencia la Formulación 1 que se encuentra en la Tabla 9, únicamente cambiando el colorante. En la Figura 11 se observan las tonalidades de las antocianinas provenientes de distintas fuentes (col roja, remolacha roja, zanahoria negra en polvo, zanahoria negra líquida, jugo de verduras), y hasta la derecha se encuentra la bebida en la que se empleó el colorante artificial, rojo allura AC. La bebida elaborada con extracto de zanahoria negra líquida fue la que presentó un color más similar a la bebida de referencia (con rojo allura AC).

Figura 27. Bebidas saborizadas de fresa utilizando antocianinas provenientes de distintas fuentes.



Las bebidas fueron expuestas al sol por 6 horas para poder ver el efecto que tiene la luz solar sobre los colorantes naturales (ver Figura 12). La bebida coloreada con extracto de remolacha roja fue la que mostró menos estabilidad quedando con un tono amarillento. Por otro lado la bebida formulada con colorantes artificiales fue la más estable, no mostró ni una ligera decoloración ni pérdida de brillo. Las bebidas coloreadas con extracto de zanahoria negra (tanto líquida como en polvo) también resultó ser bastante estable. Y la bebida con extracto de col roja reveló una mínima pérdida de intensidad del color.

Figura 28. Efectos de la exposición al sol sobre bebidas saborizadas de fresa utilizando antocianinas de distintas fuentes.



Para continuar con el estudio, se eligió que se trabajaría con el extracto de zanahoria negra (se obtuvo mejores resultados con la que venía en presentación líquida) porque este proporciona una tonalidad similar a la bebida elaborada con colorantes artificiales y porque presentó estabilidad del color luego de la exposición al sol por 6 horas. Así también se decidió que se trabajaría con el extracto de col roja porque brinda una tonalidad distinta que pudiera ser atractiva para el consumidor y debía ser evaluada.

En la Tabla 11 se observa la formulación utilizando extracto de col roja y en la Tabla 12 se encuentran sus parámetros fisicoquímicos los cuales son los parámetros de calidad. En la Tabla 13 se encuentra la formulación utilizando el extracto de zanahoria negra y en la Tabla 14 se observan sus respectivos parámetros fisicoquímicos. Los parámetros no varían significativamente en ambas fórmulas. Ambas fórmulas, al igual que la de referencia, están diseñadas en una relación (1+5), es decir una parte de jarabe y cinco partes de agua.

Como se observa en la Tabla 12 y en la Tabla 14, dentro de los parámetros de calidad también se establecieron rangos permitidos. Estos se utilizaron para poder determinar si el producto se encuentra dentro de especificaciones en el estudio de estabilidad que se llevó a cabo (sección de Análisis Fisicoquímicos). Los rangos que se establecieron son bastante cerrados, esto se realizó así debido a que la bebida al contener antocianinas, este hace bastante inestable el producto por lo que en el estudio de estabilidad se esperaba que el pH no variara significativamente para que la coloración de la bebida no se viera afectada.

Tabla 11. Formulación 2: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando extracto de col roja como fuente de antocianinas como colorante natural. Relación (1+5)

Ingrediente	Porcentaje de concentrado (%)
Agua	96.11
Sucralosa	0.06
Stevia	0.01
Benzoato	0.15
Ácido cítrico	0.70
Ácido málico	0.20
Citrato	0.14
EDTA	0.06
Sabor natural a fresa	1.43
Colorante natural: Antocianina proveniente de col roja	1.14

Tabla 12. Parámetros fisicoquímicos de Formulación 2.

	Parámetro de calidad	Valor Objetivo	Mínimo	Máximo
Jarabe	°Brix	3.05	2.95	3.15
	Densidad (g/mL)	1.010131	1.009737	1.010524
Bebida terminada	°Brix	0.54	0.49	0.59
	Densidad (g/mL)	1.00033	1.000136	1.000524
	pH	3.098	2.998	3.198
	Acidez Titulable (mL de NaOH)	25.0195	24.769	25.270
	Porcentaje de Ácido Cítrico (%)	0.1625	0.160	0.165

Tabla 13. Formulación 3: Bebida saborizada de fresa, sin calorías empleando extracto de zanahoria negra como fuente de antocianinas como colorante natural.

Ingredientes	Porcentaje
Agua	96.11
Sucralosa	0.06
Stevia	0.01
Benzoato	0.15
Ácido cítrico	0.70
Ácido málico	0.20
Citrato	0.14
EDTA	0.06
Sabor natural a fresa	1.43
Colorante natural: antocianinas proveniente de zanahoria negra	1.14
TOTAL	100.00

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de Formulación 3.

	Parámetro de calidad	Valor Objetivo	Mínimo	Máximo
Concentrado	°Brix	2.99	2.89	3.09
	Densidad (g/mL)	1.009895	1.009502	1.010288
Bebida terminada	°Brix	0.54	0.49	0.59
	Densidad (g/mL)	1.000330	1.000136	1.000524
	pH	3.131	3.031	3.231
	Acidez Titulable (mL de NaOH)	27.5195	27.244	27.795
	Porcentaje de Ácido Cítrico (%)	0.1796	0.177	0.182

Estas formulaciones cumplen con el Reglamento Técnico Centroamericano de Aditivos. El análisis que se realizó se presenta en la siguiente tabla.

Tabla 15. Análisis de formulaciones como verificación del cumplimiento del RTCA de Aditivos.

Clasificación en el RTCA	14.1.4.2 Bebidas a base de agua saborizadas sin gas, incluidos los ponches de fruta y las limonadas y bebidas similares.				
Aditivo	INS	Función	Cantidad máxima permitida	Cantidad utilizada	Cumplimiento
Sucralosa	955	Edulcorante	BPM	100	Si
Glucósidos de Steviol	960.000	Edulcorante	BPM	17	Si
Benzoato de sodio	211.000	Sustancia conservadora	600 mg/kg	250	Si
Ácido cítrico	330.000	Regulador de la acidez, antioxidante, secuestrante	BPM	1167	Si
Ácido málico (DL-)	296.000	Regulador de la acidez, secuestrante	BPM	333	Si
Citrato trisódico	331 III	Regulador de la acidez, antioxidante, emulsificante, secuestrante, estabilizador.	BPM	233	Si
EDTA (Etilendiamino tetracetato disódico)	386.000	Antioxidante, sustancia conservadora, secuestrante, agente de retención de color, agente de regulador del sabor.	200 mg/kg	100	Si

D. Pruebas sensoriales

Se llevó a cabo pruebas hedónicas para las dos bebidas saborizadas sin calorías: la que tiene antocianinas de extracto de col roja y la que tiene antocianinas de zanahoria negra. Los panelistas realizaron una evaluación de cada bebida en la que debían indicar su nivel de agrado (“me gusta mucho”, “me gusta moderadamente”, “no me gusta ni me disgusta”, “me disgusta moderadamente” o “me disgusta mucho”) de los atributos más importantes de la bebida que son: sabor, dulzor, color y apariencia en general. A pesar de que la fórmula es la misma para ambas bebidas, únicamente variando la fuente de la antocianina, era necesario evaluar todas las características porque este extracto por ser natural puede interactuar con la formulación y modificar su aroma y sabor.

En la Figura 29, gráfica de los atributos de la bebida con antocianinas provenientes de extracto de col roja, se puede observar que el atributo de sabor fue calificado por el mayor porcentaje de personas como “me gusta moderadamente” y “no me gusta ni me disgusta”, aunque también se ve que varios panelistas indicaron que les disgusta moderadamente. El dulzor fue calificado muy similar, el mayor porcentaje indicó que le “gustaba moderadamente” pero también señalaron varias personas que les “disgustaba moderadamente” o que “no les gustaba ni les disgustaba”. El color también fue evaluado por la mayoría como “me gusta moderadamente” aunque también algunos colocaron la opción de “me gusta mucho” y de “no me gusta ni me disgusta”

En la Figura 30 se puede observar la gráfica de la bebida con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria negra. Aquí se obtuvo mejores resultados. El color fue mejor evaluado, 50% de los panelistas colocaron que les gustaba mucho. El sabor y dulzor también fue mejor calificado que en la bebida con antocianinas provenientes de col roja.

En la sección de comentarios, varios panelistas colocaron que el color de la bebida con antocianinas provenientes de zanahoria negra se veía con un color más agradable y más natural y que el sabor también se percibía más natural. Por otro lado en la bebida con antocianinas de extracto de col roja indicaban que le faltaba sabor a fresa y que el color no se percibía natural a pesar de que se les indicó antes de la prueba y se colocó en las instrucciones de que el colorante utilizado en las formulaciones eran naturales.

Figura 29. Resultados de prueba hedónica de bebida saborizada de fresa sin calorías con antocianinas provenientes de extracto de col roja

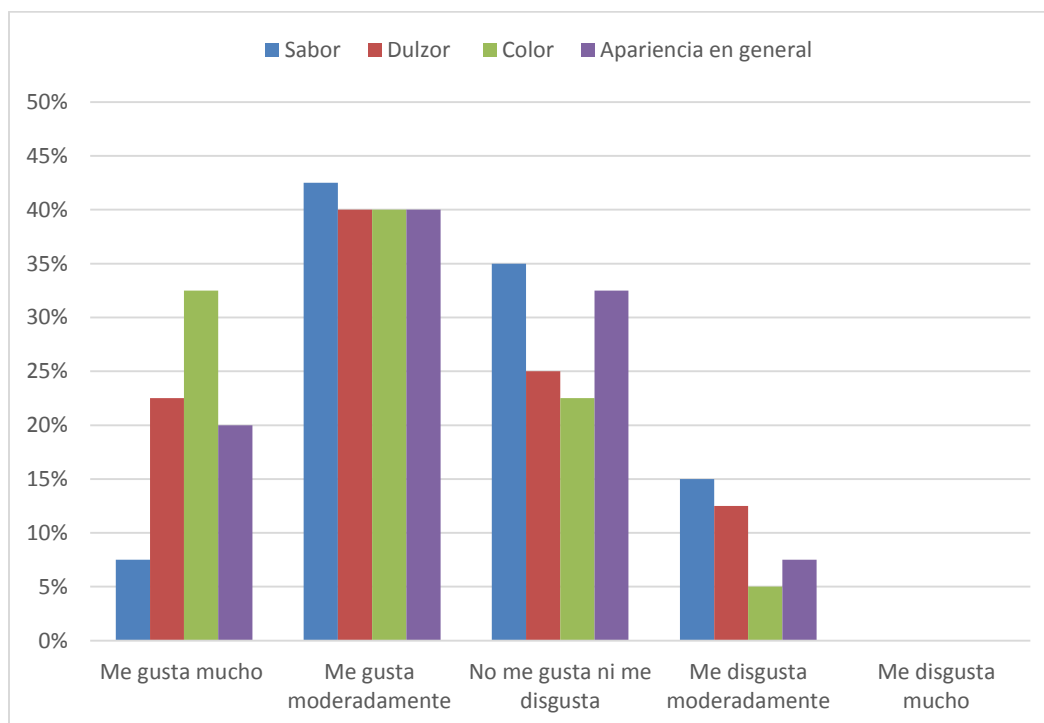
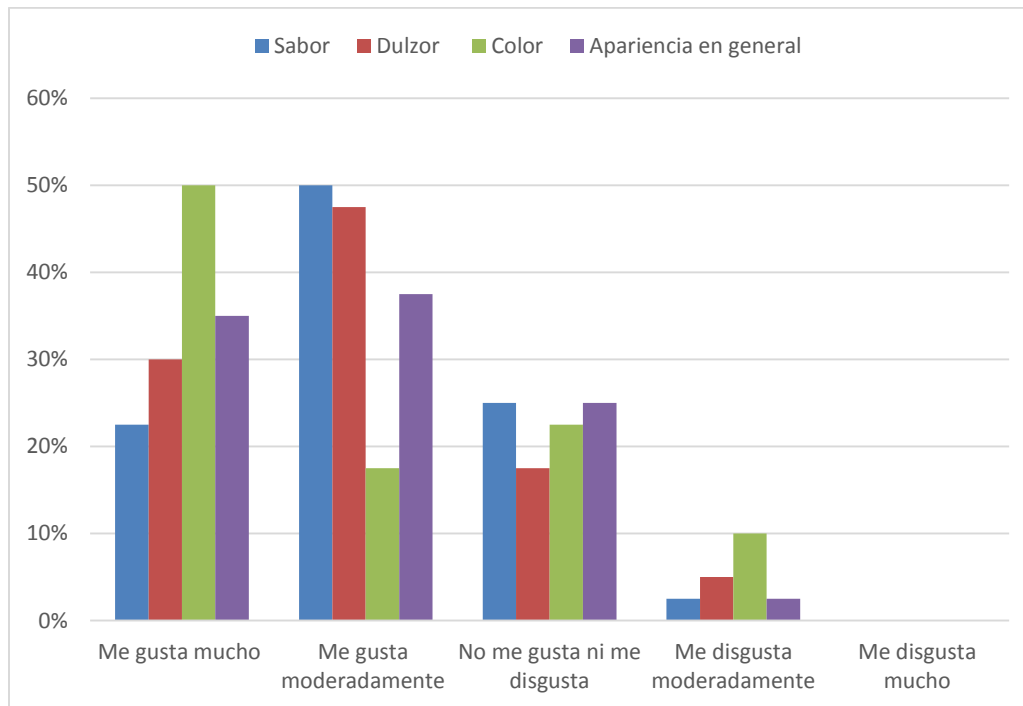


Figura 30. Resultados de prueba hedónica de bebida saborizada de fresa sin calorías con antocianinas provenientes de extracto de zanahoria Negra



E. Estudio de estabilidad de bebida por medio de medición de parámetros fisicoquímicos (°Brix, pH, porcentaje de acidez y color).

Se realizó la medición de los análisis fisicoquímicos: grados Brix (°Brix), pH, acidez titulable, porcentaje de acidez y color. Se realizaron tanto en la bebida con colorante de antocianina proveniente de col roja como con la de antocianina proveniente de zanahoria negra. Las mediciones fisicoquímicas se llevaron a cabo semanalmente por 4 semanas. Se colocaron bebidas en distintas condiciones de temperatura: en incubadora (35°C), en una bodega a temperatura ambiente (aproximadamente de 20°C) y en refrigeradora (4°C).

Para estas bebidas saborizadas sin calorías, la medición de grados Brix no es indispensable como lo es en las bebidas que contienen azúcar. El valor de °Brix en estas bebidas lo aportan los sólidos (benzoato, ácido cítrico, ácido málico, citrato de sodio y EDTA). Como se observa en la Tabla 16 y en la 17, los °Brix de la bebida no variaron al estar expuestos a distintas temperaturas por 4 semanas.

La medición del pH es considerado un parámetro de calidad importante en estos productos debido a que contiene colorantes naturales y tal y como se encuentra en la literatura, el grupo flávilo de las antocianinas es muy reactivo y por lo tanto muy sensible a los cambios de pH, es por ello que cambia de color (Badui, 2006). A la formulación se le añadió citrato de sodio (ver Tabla 11 y 13), este

compuesto es considerado un regulador de la acidez el cual fue adicionado para contribuir con la estabilidad del pH en la bebida. Como se observa en la Tabla 16 y 17, el pH se mantuvo bastante estable, no muestra una tendencia de aumento o disminución durante las 4 semanas de evaluación del producto en las tres distintas condiciones. Así también es posible observar que la acidez titulable y el porcentaje de acidez se mantuvieron dentro de los rangos establecidos en la fase anterior de este estudio (ver Tabla 12 y 14)

Tabla 16. Análisis fisicoquímicos de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja

Semana	Temperatura	Grados Brix	pH	Acidez titulable (mL)	Porcentaje de acidez (%)
1	Incubadora (35°C)	0.55	3.059	25.180	0.164
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.55	3.054	25.125	0.163
	Refrigeración (4°C)	0.55	3.049	25.085	0.164
2	Incubadora (35°C)	0.56	3.033	25.110	0.164
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.56	3.095	25.145	0.164
	Refrigeración (4°C)	0.56	3.069	25.170	0.163
3	Incubadora (35°C)	0.54	3.016	25.040	0.165
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.55	3.027	25.090	0.165
	Refrigeración (4°C)	0.55	3.059	25.125	0.164
4	Incubadora (35°C)	0.55	3.059	24.960	0.163
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.55	3.025	24.930	0.162
	Refrigeración (4°C)	0.55	3.020	25.000	0.162

Tabla 17. Análisis fisicoquímicos de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra

Semana	Temperatura	Grados Brix	pH	Acidez titulable (mL)	Porcentaje de acidez (%)
1	Incubadora (35°C)	0.55	3.123	27.680	0.179
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.54	3.123	27.725	0.179
	Refrigeración (4°C)	0.55	3.104	27.370	0.179
2	Incubadora (35°C)	0.55	3.102	27.195	0.178
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.55	3.068	27.615	0.180
	Refrigeración (4°C)	0.55	3.106	27.495	0.180
3	Incubadora (35°C)	0.55	3.082	27.605	0.180
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.56	3.071	27.615	0.180
	Refrigeración (4°C)	0.54	3.115	27.530	0.180
4	Incubadora (35°C)	0.53	3.058	27.390	0.179
	T° ambiente (aprox.20°C)	0.53	3.107	27.390	0.178
	Refrigeración (4°C)	0.53	3.071	27.450	0.178

Al igual que con los parámetros de °Brix, pH, acidez titulable y porcentaje de acidez, también se realizó mediciones semanales de color en el equipo de Hunter Lab, En las Figuras que se presentan a continuación se encuentran los valores y las gráficas de L*, a* y b* que se obtuvo en las bebidas a temperatura de incubadora (35°C), temperatura ambiente (20°C) y en refrigeración (4°C), tanto en la bebida con extracto de col roja como en la que tiene extracto de zanahoria negra. Al comparar ambas gráficas se puede observar que la bebida con extracto de zanahoria negra (ver Figura 32) se mantiene más estable, y no se observa variación en las bebidas expuestas a distintas condiciones. En cambio, en la bebida con extracto de col roja, se observa una ligera disminución de los valores en el tiempo y también hay una leve diferencia entre las bebidas almacenadas a distintas temperaturas.

Figura 31. Mediciones de color de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja

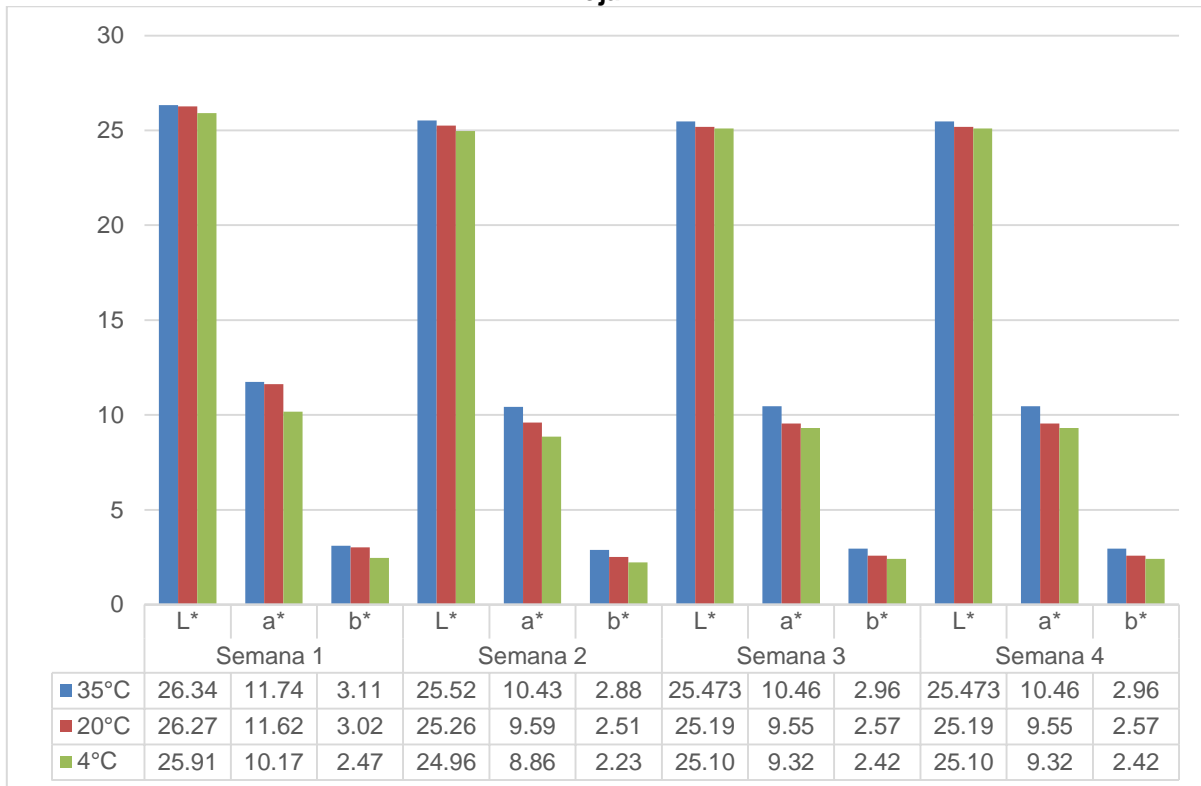
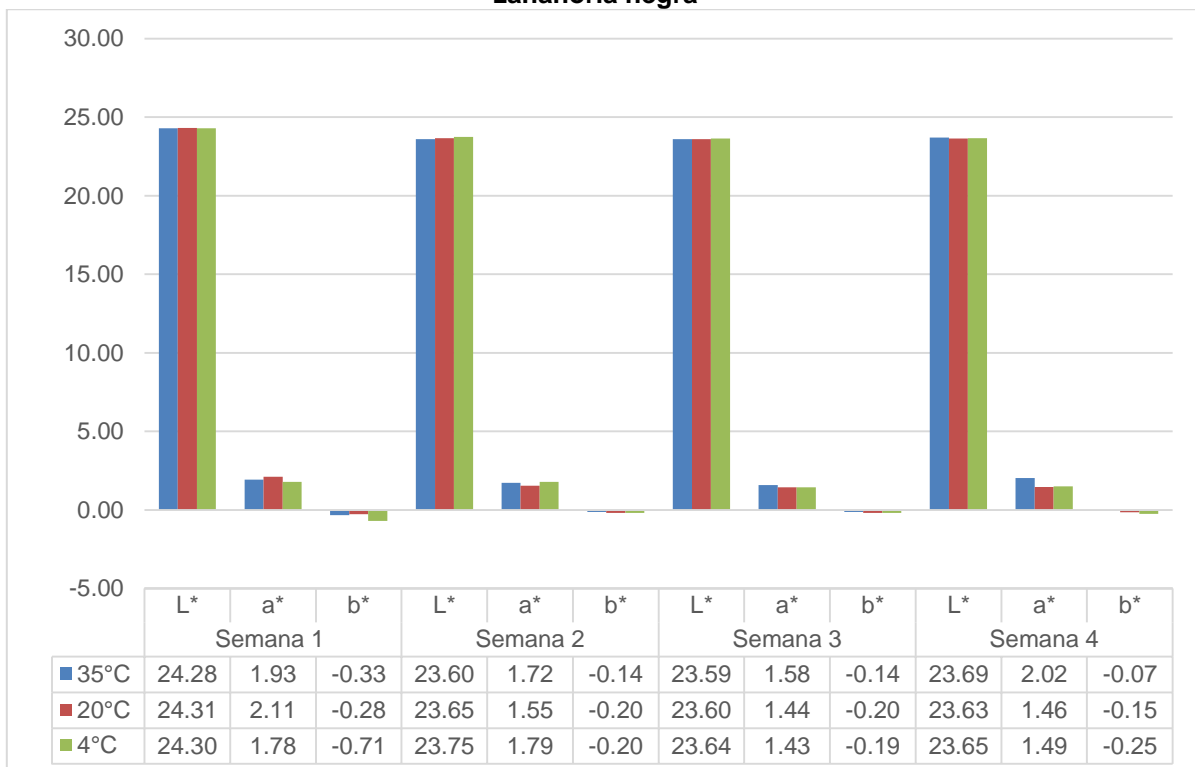


Figura 32. Mediciones de color de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra



F. Determinación del contenido total de antocianinas monoméricas

Se llevó a cabo la determinación del contenido de antocianinas monoméricas de las bebidas saborizadas de fresa. Se realizó esta medición por 8 semanas. Este estudio es importante porque espera que este llegue al consumidor en condiciones óptimas y el color es un factor de calidad determinante en este producto.

El método utilizada consiste en la medición de las absorbancias a dos pH distintos: pH=1 y pH=4.5. Este es basado bajo la suposición de que las antocianinas monoméricas no tienen absorbancia, o es muy baja, a un pH de 4.5. La literatura nos indica que las antocianinas monoméricas experimentan una transformación estructural reversible como función del pH (cuando el pH=1 se tiene una forma oxonia coloreada y en pH=4 se tiene la forma hemiacetal incolora). Es por ello que la diferencia de absorbancias a la longitud de onda máxima (en este caso es 517 nm) es proporcional a la concentración de las antocianinas. Las antocianinas degradadas a una forma polimérica son resistentes a los cambios de color al cambiarse el pH. Es por ello que las antocianinas en forma polimérica no son medidas con este método porque estas se absorben tanto a pH=1 como a pH=4 (Lee, 2005).

Las mediciones en el espectrofotómetro se realizaron a 517 nm que es la longitud de onda a la que daba los valores mayores de absorbancia. La concentración de antocianina se debe calcular utilizando el peso molecular y el coeficiente de extinción de la antocianina que se encuentre en mayor proporción en la muestra a analizar. Pero normalmente tanto el extracto de col roja como el de zanahoria negra, al igual que todas las matrices naturales, contienen una mezcla de antocianinas que varía (Lee, 2005). Los resultados fueron expresados como equivalentes de la cianidin 3-glucósido, que es la antocianina que se encuentra en mayor proporción en la naturaleza.

Este análisis se llevó a cabo para poder conocer el efecto que tiene tanto la temperatura como el tiempo sobre las antocianinas. Este es un método sencillo y aporta mucha información. Se debe recalcar que los resultados con este análisis nos brindarán información únicamente de las antocianinas monoméricas, no de las poliméricas.

La primera medición de antocianinas se realizó el día en que se prepararon las bebidas, para poder tener la concentración inicial. Como se puede observar en las Tablas de abajo, el contenido de antocianinas monoméricas es superior en la bebida con extracto de col roja a la bebida con extracto de zanahoria negra. En la semana 4 se realizó nuevamente la medición, pero en esta ocasión se hizo el análisis a la bebida almacenada a temperatura ambiente (20°C) y a la bebida almacenada en incubadora (a 35°C) para conocer si la temperatura modifica la concentración de antocianinas. En ambas bebidas se puede observar que hubo una ligera disminución del contenido de antocianinas con respecto a la semana 1, pero al comparar entre las dos condiciones de

almacenamiento no hay variación. Es importante mencionar que a simple vista no se observa una disminución de color.

En la semana 8 se ve en las tablas que el contenido de antocianinas disminuye nuevamente y en esta ocasión si hay una diferencia entre el resultado en la bebida almacenada a 20°C y a 35°C. La diferencia es más grande en la bebida que contiene extracto de col roja. En la Figura 33 se observa una ligera disminución en la tonalidad del color de las muestras almacenadas a 35°C, siendo más notorio en la bebida con extracto de col roja.

Debido a que luego de 8 semanas ya se observa una variación en el color, no se recomienda darle al producto una fecha de vencimiento superior. En la octava semana aún el producto se encuentra con un color atractivo pero se comienza a observar una disminución de tonalidad en las muestras almacenadas en incubadora. En refrigeración las antocianinas son bastante estables pero en el mercado no es posible controlar esto, el producto en ocasiones pasa varias horas incluso bajo el sol por lo cual se recomienda que no se le dé más de 8 semanas de vida de anaquel al producto.

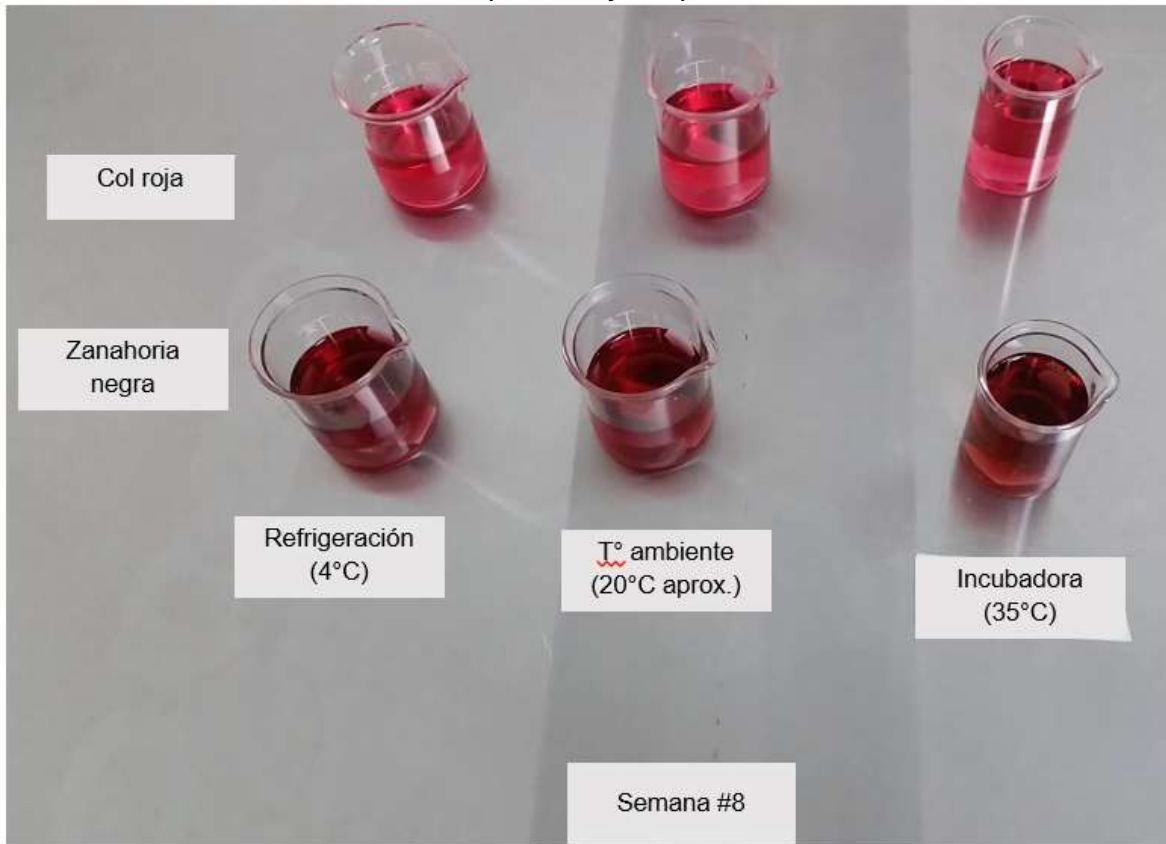
Tabla 18. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja

Semana	Contenido total de antocianinas monoméricas	
	20°C (aprox.)	35°C
1	17.3084	-
4	15.0789	15.0958
8	12.7079	9.3180

Tabla 19. Contenido total de antocianinas monoméricas expresadas en mg/L equivalentes de cianidin 3-glucósido en bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra

Semana	Contenido total de antocianinas monoméricas	
	20°C (aprox.)	35°C
1	4.7091	-
4	3.9409	3.0308
8	3.3899	1.6699

Figura 33. Bebidas luego de seis semanas expuestas a distintas condiciones de temperatura (4°C, 20°C y 35°C)



G. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

Para la determinación de la capacidad antioxidante se utilizó el DPPH. Este es un radical libre que presenta una coloración morada intensa pero al estar expuesto a un compuesto antioxidante su tonalidad va disminuyendo hasta llegar a un color amarillento. Los resultados se presentan como un valor de IC50 en unidades de $\mu\text{g/mL}$ y este no indica la concentración de antioxidante que reduce la absorbancia de la solución DPPH en un 50%. Mientras más bajo sea el valor, mayor capacidad antioxidante. (Brand-Williams, 1995)

Como se observa en las siguientes Tablas, los valores de IC50 son menores en la bebida saborizada con extracto de zanahoria negra, lo cual nos indica que esta bebida tiene mayor capacidad antioxidante.

A pesar de que en el análisis anterior se encontró que la bebida con extracto de col roja tenía más antocianinas monoméricas, la bebida con extracto de zanahoria negra tiene mayor capacidad antioxidante. Esto se debe a que la zanahoria negra tiene otras antocianinas poliméricas que no fueron detectadas en el análisis anterior. En la semana 1 se obtuvo que la bebida con extracto de col roja se obtuvo presenta un valor de $101.84 \mu\text{g/mL}$ y en la semana 8 un valor de $159.95 \mu\text{g/mL}$,

esto nos indica que hubo una ligera disminución de la capacidad antioxidante durante este tiempo. En la bebida con extracto de zanahoria negra se observa que en la semana 1 presenta un valor de 85.58 $\mu\text{g/mL}$ y en la semana 8 un valor de 87.74 $\mu\text{g/mL}$, es decir, esta bebida mantiene su capacidad antioxidante a lo largo del tiempo de vida estimado de 2 meses.

Tabla 20. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida saborizada con antocianinas provenientes de col roja.

	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	Semana 1	Semana 8
Temperatura ambiente (20°C)	101.84	159.95

Tabla 21. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH de bebida saborizada con antocianinas provenientes de zanahoria negra.

	IC50 ($\mu\text{g/mL}$)	
	Semana 1	Semana 8
Temperatura ambiente (20°C)	85.58	87.74

H. Análisis de costos

En la Figura 34 es posible observar el costo de la bebida de fresa, sin calorías y con antocianinas provenientes de zanahoria negra. Este costo puede compararse con el que se encuentra en la Figura 35, en el que se encuentra el costo de la misma formulación únicamente variando el colorante, en ésta, en lugar de realizar el cálculo con colorante natural, se calculó con la mezcla de colorantes artificiales Rojo Allura AC y Azul Brillante FCF de la Formulación 1.

El aumento del costo es evidente. El costo de producir una caja de 24 bebidas saborizadas de 355 mL utilizando colorantes artificiales es de Q17.13, mientras que el costo de esta bebida sustituyendo el colorante artificial por uno natural se incrementa a Q21.57. Es decir, el precio por caja tiene un aumento de un 25.92% al utilizar el colorante natural.

El aumento del costo se justifica con los resultados expuestos anteriormente, en los que se encuentra que la bebida con antocianinas posee capacidad antioxidante la cual se conservó a lo largo de 8 semanas y no se encontró variación al compararse el producto almacenado a dos distintas temperaturas. Además, tal y como se pudo determinar en la Evaluación de la Percepción del Mercado, los colorantes artificiales están asociados con efectos negativos a la salud y en cambio los colorantes naturales son vistos con más confianza. El 84% de la población encuestada de estudiantes universitarios y profesionales indicó que está interesada en consumir una bebida con colorantes naturales.

Tabla 22. Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorante natural antocianina.

Descripción	Costo Q	Costo/Caja (Q)	Costo/Caja \$
Empaque primario			
Envase PET	Q 253.00	Q 6.10	\$ 0.79
Tapa	Q 72.41	Q 1.75	\$ 0.23
Subtotal empaque primario		Q 7.85	\$ 1.02
Materia prima directa			
Extracto de zanahoria negra	Q 281.00	Q 6.47	\$ 0.84
Sabor natural a fresa	Q 126.12	Q 3.64	\$ 0.47
Sucralosa	Q 985.28	Q 1.19	\$ 0.16
Estevia	Q 1,900.73	Q 0.38	\$ 0.05
Ácido málico	Q 27.46	Q 0.11	\$ 0.01
Ácido cítrico	Q 3.03	Q 0.09	\$ 0.01
Benzoato	Q 9.91	Q 0.07	\$ 0.01
EDTA	Q 41.88	Q 0.05	\$ 0.01
Citrato	Q 9.84	Q 0.03	\$ 0.00
Subtotal materia prima directa		Q 12.04	\$ 1.57
Empaque secundario			
Etiqueta	Q 17.38	Q 0.42	\$ 0.05
Termoencogible	Q 15.06	Q 0.38	\$ 0.05
Poli Strech	Q 19.08	Q 0.06	\$ 0.01
Calcomanía identificación de producción	Q 0.18	Q 0.00	\$ 0.00
Subtotal empaque secundario		Q 0.87	\$ 0.11
Otros costos			
Costos Fijos de Producción		Q 0.94	\$ 0.12
Labor Directa		Q 0.26	\$ 0.03
Costos Variables de Producción		Q 0.14	\$ 0.02
Subtotal otros costos		Q 1.34	\$ 0.17
Costo Total		Q 22.10	\$ 2.87

Nota. El tipo de cambio que se utilizó para la conversión de Quetzales a Dólares es de 7.69

Tabla 23. Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con colorantes artificiales.

Descripción	Costo Q	Costo/Caja	Costo \$
Empaque primario			
Envase	Q 253.00	Q 6.10	Q 0.79
Tapa	Q 72.41	Q 1.75	Q 0.23
Subtotal empaque primario		Q 7.85	\$ 1.02
Materia prima directa			
Sabor natural a fresa	Q 126.12	Q 3.64	Q 0.47
Solución colorantes rojo 40+azul 1	Q 58.60	Q 2.01	Q 0.26
Sucralosa	Q 985.28	Q 1.19	Q 0.16
Estevia	Q 1,900.73	Q 0.38	Q 0.05
Ácido málico	Q 27.46	Q 0.11	Q 0.01
Benzoato	Q 9.91	Q 0.07	Q 0.01
Ácido cítrico	Q 3.03	Q 0.09	Q 0.01
EDTA	Q 41.88	Q 0.05	Q 0.01
Citrato	Q 9.84	Q 0.03	Q 0.00
Subtotal materia prima directa		Q 7.58	Q 0.99
Empaque secundario			
Etiqueta	Q 17.38	Q 0.42	Q 0.05
Termoencogible	Q 15.06	Q 0.38	Q 0.05
Poli stretch	Q 19.08	Q 0.06	Q 0.01
Sticker para identificación de producción	Q 0.18	Q 0.00	Q 0.00
Subtotal empaque secundario		Q 0.87	\$ 0.11
Otros costos			
Labor Directa		Q 0.26	Q 0.03
Costos Variables de Producción		Q 0.14	Q 0.02
Costos Fijos de Producción		Q 0.94	Q 0.12
Subtotal otros costos		Q 1.34	Q 0.17
Costo Total		Q 17.65	Q 2.29

Nota. El tipo de cambio que se utilizó para la conversión de Quetzales a Dólares es de 7.69

Figura 34. Diagrama de Pareto: Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorante natural antocianina.

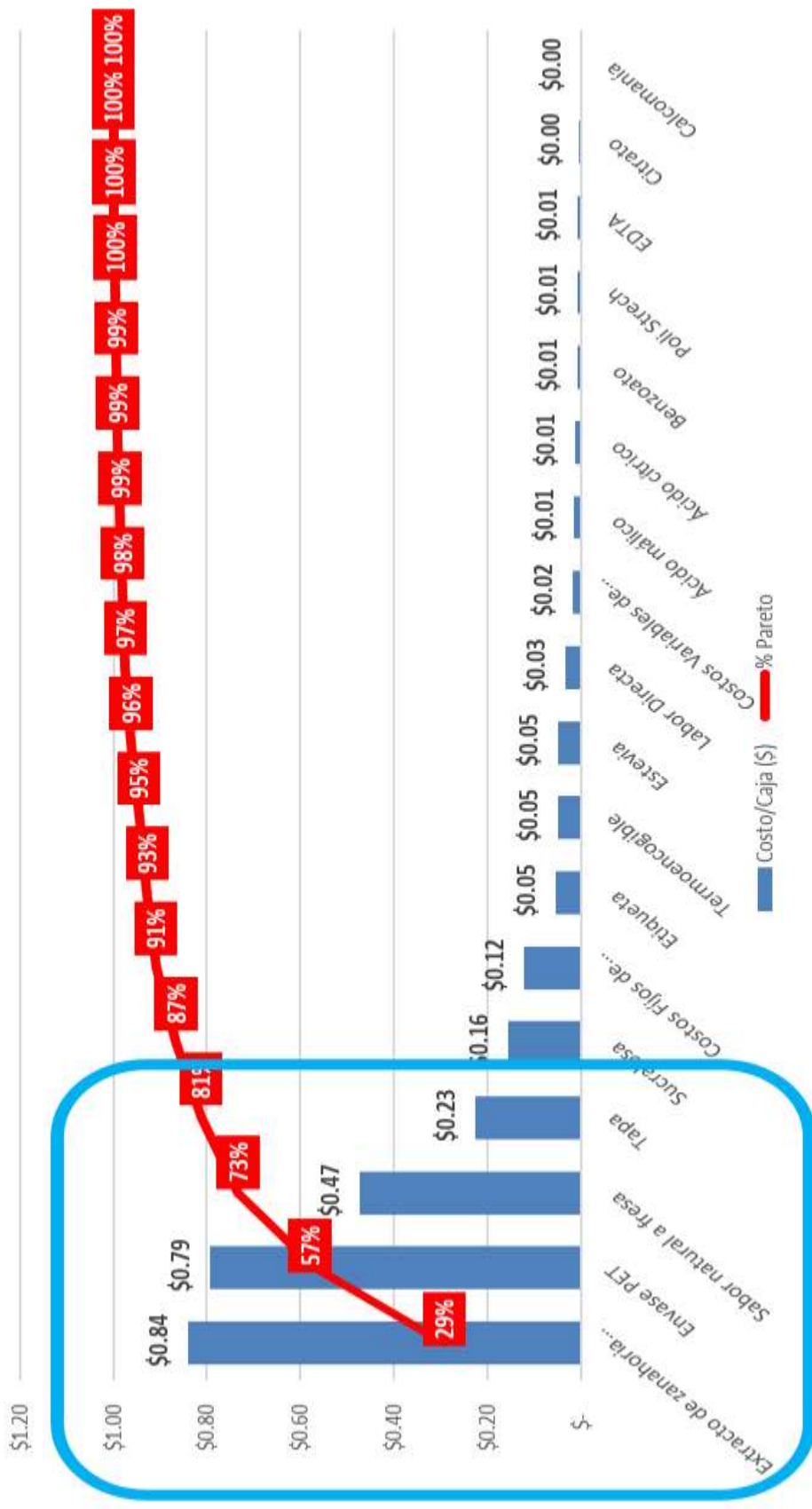
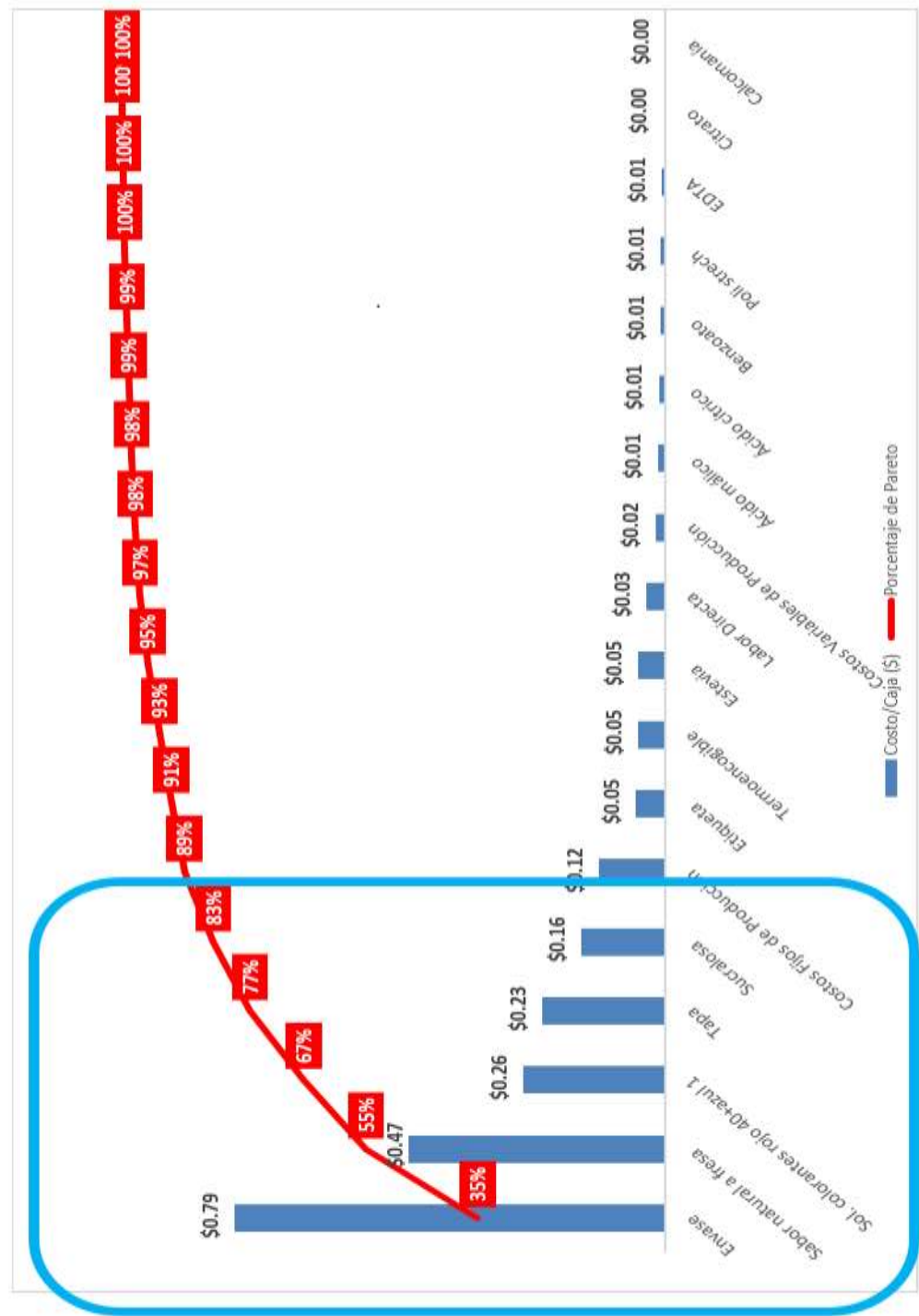


Figura 35. Diagrama de Pareto: Costos bebida saborizada de fresa, sin calorías con el colorantes artificiales.



VII. CONCLUSIONES

1. Para el desarrollo de una bebida saborizada de fresa, sin calorías y con colorantes naturales, se realizó una encuesta para evaluar la percepción del mercado. La población encuestada está interesada en una bebida saludable, sin carbonatación, con un buen balance de dulzor y con colorantes naturales.
2. Se desarrolló la formulación de una bebida saborizada de fresa, sin calorías, con colorante natural para lo cual se evaluó las antocianinas de extracto de col roja y de zanahoria negra como colorantes naturales. Las características sensoriales (color, sabor, dulzor y apariencia en general) fueron mejor evaluadas en la bebida con extracto de zanahoria negra.
3. En el estudio de estabilidad se determinó que ambas bebidas saborizadas de fresa, sin calorías y con colorantes naturales (la de antocianinas provenientes de col roja y la de antocianinas provenientes de zanahoria negra) conservaron sus parámetros fisicoquímicos de °Brix, pH, acidez titulable y porcentaje de acidez, en distintas condiciones de almacenamiento a diferentes temperaturas. En cuanto al color, hubo mayor estabilidad en la bebida con extracto de zanahoria negra.
4. Se pudo observar que al realizar la sustitución del color artificial en la bebida, a uno natural, el costo de producción se incrementa en un 25%. Este incremento se justifica porque la bebida con antocianinas como colorante natural le da a la bebida la funcionalidad de tener capacidad antioxidante la cual se conserva a lo largo de 8 semanas y esta no es afectada por el incremento en la temperatura. Así también este es un producto que crea más confianza al consumidor quien está más interesado en su salud.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Si el producto se envasa en botella transparente, se recomienda que el producto no lleve una fecha de vencimiento superior a dos meses, porque a pesar de que en ese período de tiempo el color se ha conservado al ser almacenado a temperatura ambiente, es posible observar que a temperaturas superiores (en este caso, a 35°C), se comienza a ver una disminución de la tonalidad del color.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Badui, Salvador. 2006. *Química de los Alimentos*. 4ª ed. México. Pearson. 716 págs.
2. Bechtold, Thomas y R. Mussak. 2009. *Handbook of Natural Colorants*. John Wiley & Sons Ltd. [Reino Unido]. 434 págs.
3. Brand-Williams, *et al.* 1995. *Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity*. *Food Science Technology* 25: 25-30
4. Castañeda, Araceli. 2009. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. *Food Chemistry* [México]. 113(4):859-871
5. CSPI. 2008. *Petition to Ban the use of Yellow 5 and Other Food Dyes*. Center for Science in the Public Interest. Petition to the United States Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. 3 de Junio.
6. Dege, Nicholas. 2007. *Technology of Bottle Water*. 3ª edición. Estados Unidos. Wiley Blackwell. 406 págs.
7. Degenhardt, A; H. Knapp y P. Winterhalter. 2000. Separation and purification of anthocyanins by high-speed countercurrent chromatography and screening for antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Alemania]. 48 (2):338-343.
8. EFSA. 2008. *EFSA evaluates Southampton study on food additives and child behavior*. European Food Safety [Italia]. 14 de marzo.
9. FSA. 2007. *Agency revises advice on certain artificial colours*. Food Standards Agency, [Reino Unido]. 11 de septiembre.
10. Giusti, Mónica y R. Wrolstad. 2002. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal*. 14: 217-225.
11. Jie, Li. 2013. *Identification and thermal stability of purple-fleshed sweet potato anthocyanins in aqueous solutions with various pH values and fruit juices*. *Journal of Food Chemistry*. 136 (3-4): 1429-1434
12. Kamei, Hideo, *et al.* 1995. *Suppression of tumor cell growth by anthocyanins in vitro*. *Cancer Investigation*. 13 (6):590-594.
13. L. Rodriguez; M. Giusti y R Wrolstad. 1999. *Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems*. *Journal of Food Science*. 64: 451–456.
14. Lee, Jungmin. 2005. *Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study*. *Journal of AOAC International* 88 (5): 1269-1278.

15. Lietti, A; A. Cristoni y M. Picci. 1976. *Studies on Vaccinium myrtillus anthocyanosides. I. Vasoprotective and anti-inflammatory activity*, *Arzneimittel-Forschung*. 26 (5):829-832.
16. Mohammad Shahid; S. Islam y F. Mohammad. 2013. *Recent advancements in natural dye applications: a review*. *Journal of Cleaner Production* [India]. 53: 310-331.
17. Morazzani, P y M. Magistretti. *Effects of Vaccinium myrtillus anthocyanosides on prostacyclin-like activity in rat arterial tissue*. *Fitoterapia* 57 (1):11-14.
18. Murillo, *et al.* *Química y Funcionalidad Biológica de Mollinedia racemose (Monimiaceae)*. Universidad del Tolima, Tolima, Colombia. 22(2):3-14.
19. O'Brien Nabors, Lyn. 2012. *Alternative Sweeteners*. 4ª edición. Gran Bretaña. CRC Press.571 págs.
20. Sui, Xiaonan; D. Xin y W. Zhou. 2014. *Combined effect of pH and high temperature on the stability and antioxidant capacity of two anthocyanins in aqueous solution*. *Food Chemistry*. 161: 163-170.
21. Timberlake, B. Henry. 1988. *Anthocyanins as natural food colorants*.
22. Wang, Hong; G. Cao y R. Prior. 1997. *Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (2):304-309.

X. ANEXOS

A. Encuesta



Encuesta

Género: Masculino _____ Femenino _____
Edad: 15-19 años _____ 20-24 años: _____ 25-29 años _____ 30-34 años _____
35-39 años _____ 39-40 años _____ Mayor a 40 años _____
Profesión u oficio: _____

Instrucciones: A continuación se le presenta una serie de preguntas. Favor responder leer cuidadosamente cada una de ellas y contestar con sinceridad marcando la/las respuestas que usted considera basado en sus conocimientos y opiniones personales. No existen respuestas buenas ni malas.

1. De la siguiente lista de bebidas envasadas, ¿cuál consume más frecuentemente? (Marcar sólo una opción)

- Agua mineral
- Gaseosas
- Aguas saborizadas
- Agua pura
- Néctares y jugos

2. ¿Cómo prefiere que sean las bebidas envasadas?

- Con gas (carbonatadas)
- Sin gas (sin carbonatación)

3. ¿Qué opinión personal tiene acerca del consumo de azúcar?

- En cantidades moderadas, no tienen efectos nocivos sobre la salud.
- Son causantes de obesidad.
- Alteran el metabolismo.
- Aumentan el riesgo de tener caries dental.
- Otra: _____

4. Al comprar una bebida envasada, ¿usted elige una opción que sea reducida en azúcar o "light"?

Sí _____ No _____ ¿Por qué? _____

5. ¿Cuál de los siguientes edulcorantes (endulzantes) sin calorías conoce? (puede marcar más de una opción)

- Aspartame (Equal)
- Sucralosa (Splenda)
- Estevia
- Otra: _____

6. ¿Qué utiliza para endulzar sus bebidas?

- Azúcar
- Aspartame (Equal)
- Sucralosa (Splenda)
- Estevia
- No endulzo mis bebidas.
- Otra: _____

7. ¿Qué opinión tiene sobre la sucralosa (Splenda)?

- Es una buena opción para las personas diabéticas y para quienes están llevando una dieta
- Es dañino para la salud
- Es un producto natural
- Es un producto artificial
- Otra: _____



- 8. ¿Qué opinión tiene sobre el aspartame (Equal)?**
- Es una buena opción para las personas diabéticas y para quienes están llevando una dieta
 - Es dañino para la salud
 - Es un producto natural
 - Es un producto artificial
 - Otra: _____
- 9. ¿Qué opinión tiene sobre la Estevia? (Puede marcar más de una opción)**
- Es completamente natural
 - Es igual que la sucralosa (Splenda) y/o el aspartame (Equal)
 - Es mejor que la sucralosa (Splenda) y/o el aspartame (Equal)
 - Es el endulzante que está de moda
 - Los productos endulzados con Estevia tienen un sabor desagradable
 - Otra: _____
- 10. ¿Ha consumido alimentos con Estevia?** Sí _____ No _____
- 11. ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes artificiales?** Sí _____ No _____
- 12. ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes artificiales?**
- En cantidades moderadas, no tienen efectos nocivos sobre la salud.
 - Son dañinos para la salud.
 - Causan hiperactividad en los niños.
 - Son precursores de cáncer.
 - No tengo conocimiento sobre ellos.
 - Otra: _____
- 13. ¿Ha escuchado hablar sobre los colorantes naturales?** Sí _____ No _____
- 14. ¿Qué opinión tiene acerca de los colorantes naturales?**
- Tienen propiedades antioxidantes.
 - En cantidades moderadas, no tienen efectos nocivos sobre la salud.
 - Son dañinos para la salud.
 - Causan hiperactividad en los niños.
 - Causan cáncer.
 - No tengo conocimiento sobre ellos.
 - Otra: _____
- 15. ¿Consumiría una bebida endulzado con Estevia?** Sí _____ No _____
- 16. ¿Consumiría un una bebida con colorantes naturales?** Sí _____ No _____

¡Muchas gracias por su colaboración!

B. Boleta de evaluación sensorial

Boleta Evaluación Sensorial

Nombre: _____ Fecha: _____

INSTRUCCIONES: A continuación se le presenta una muestra de Agua Saborizada de Fresa, sin calorías, con color natural. Pruebe y marque con una X su nivel de agrado en cuanto SABOR, DULZOR, COLOR y APARIENCIA EN GENERAL.

SABOR	
Me gusta mucho	
Me gusta moderadamente	
No me gusta ni me disgusta	
Me disgusta moderadamente	
Me disgusta mucho	

DULZOR	
Me gusta mucho	
Me gusta moderadamente	
No me gusta ni me disgusta	
Me disgusta moderadamente	
Me disgusta mucho	

COLOR	
Me gusta mucho	
Me gusta moderadamente	
No me gusta ni me disgusta	
Me disgusta moderadamente	
Me disgusta mucho	

APARIENCIA EN GENERAL	
Me gusta mucho	
Me gusta moderadamente	
No me gusta ni me disgusta	
Me disgusta moderadamente	
Me disgusta mucho	

Comentarios: _____

C. Formulación de la bebida

Figura 36. Preparación de jarabe



Figura 37. Peso de jarabe, relación (1+5), una parte de jarabe y cinco partes de agua.



Figura 38. Peso de agua.



Figura 39. Medición de °Brix a la bebida.



Figura 40. Efecto del pH sobre las antocianinas durante la medición de la acidez titulable



D. Datos obtenidos para la determinación de antocianinas monoméricas.

Figura 41. Determinación de λ_{max} en bebida con extracto de col roja. Medición con la muestra preparada a pH=1.

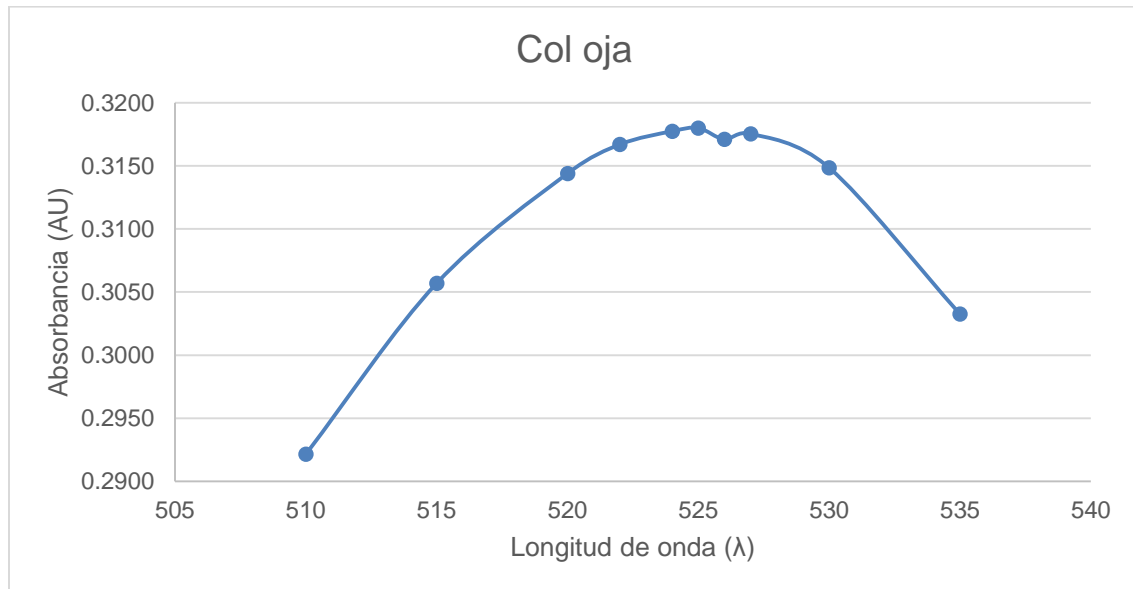


Figura 42. Determinación de λ_{max} en bebida con extracto de zanahoria negra. Medición con la muestra preparada a pH=1.

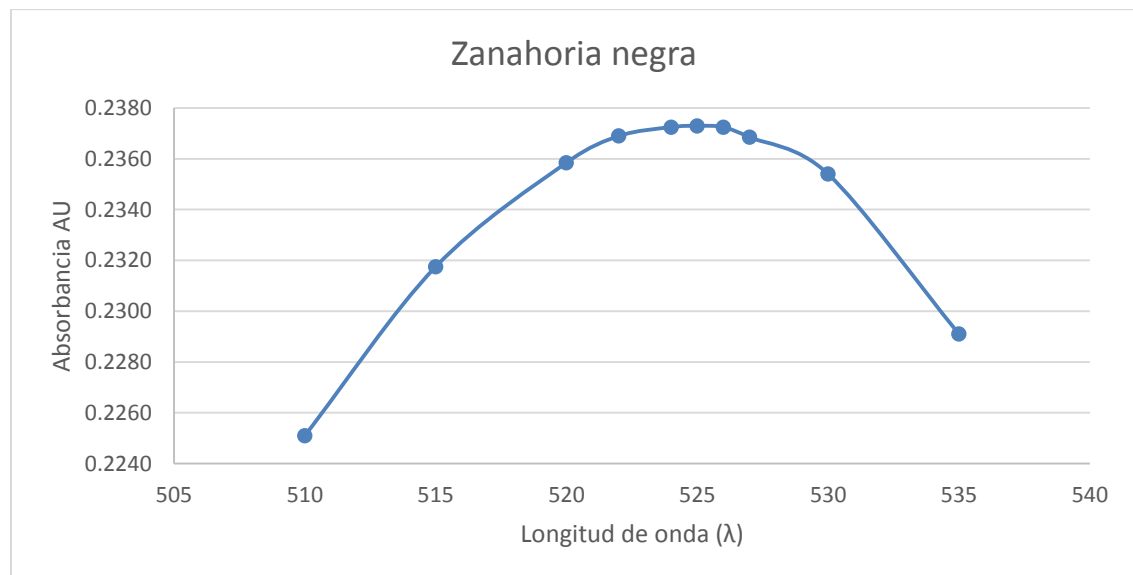


Tabla 24. Valores de absorbancias obtenidas en bebida con extracto de col roja

λ	Semana 1		Semana 4				Semana 8			
	Ambiente		Ambiente		Incubadora		Ambiente		Incubadora	
	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5
525 nm	0.3179	0.1187	0.2736	0.0956	0.2733	0.0807	0.2342	0.0945	0.1809	0.0667
700 nm	0.0020	0.0101	0.0011	0.0037	0.0126	0.0008	0.0015	0.0140	0.0038	0.0012

Tabla 25. Valores de absorbancias obtenidas en bebida con extracto de zanahoria negra

λ	Semana 1		Semana 4				Semana 8			
	Ambiente		Ambiente		Incubadora		Ambiente		Incubadora	
	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5	pH=1	pH=4.5
525 nm	0.2330	0.1925	0.2099	0.1720	0.1705	0.1247	0.1787	0.1612	0.1164	0.1057
700 nm	0.0062	0.0221	0.0057	0.0150	0.0096	0.0001	0.0091	0.0322	0.0064	0.0157

E. Determinación de capacidad antioxidante

1. Bebidas con extracto de col roja

Figura 43. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de col roja en la semana 1.

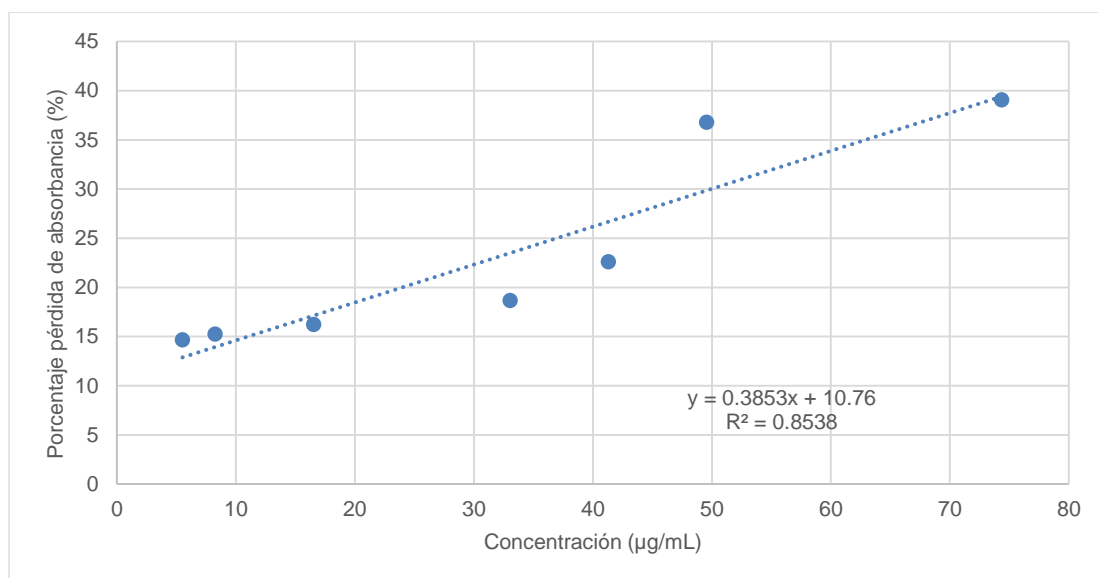
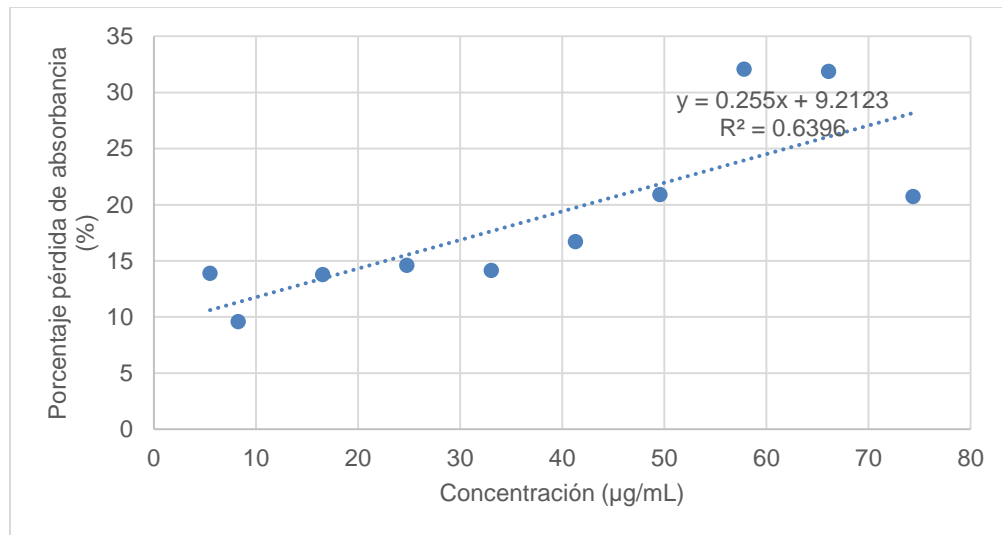


Figura 44. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de col roja en la semana 8.



2. Bebidas con extracto de zanahoria negra

Figura 45. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de zanahoria en la semana 1.

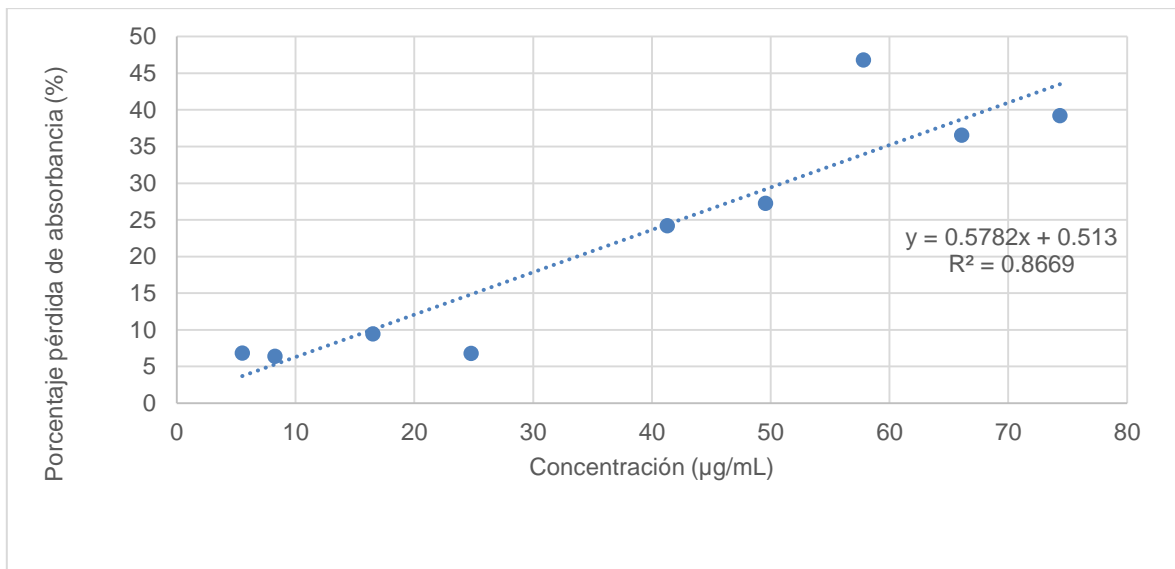
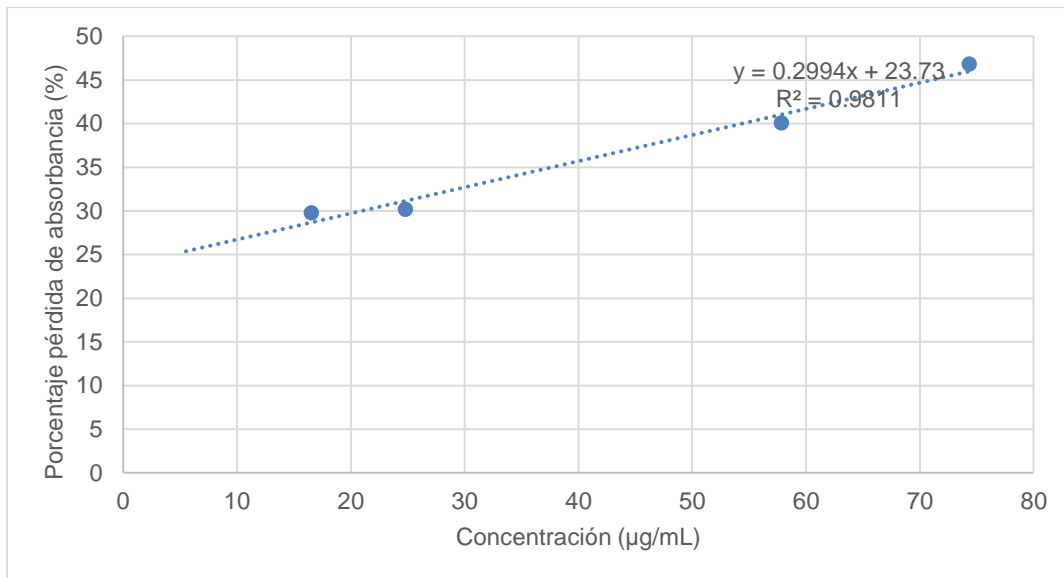


Figura 46. Diagrama de porcentaje de pérdida de absorbancia vs concentración, de bebida con extracto de zanahoria en la semana 8.



F. Tabla nutricional de la bebida saborizada de fresa

Figura 47. Tabla de información nutricional de bebida saborizada de fresa.

Información Nutricional	
Tamaño de porción: 8 oz. fl. (237mL)	
Porciones por envase: 1.5	
Cantidad por Porción	
Energía 0 kJ (0 kcal)	
%Valor Diario*	
Grasa Total 0g	0%
Grasa Saturada 0g	0%
Sodio 30 mg	1%
Carbohidratos 0g	5%
Azúcares 0g	
Proteína 0g	
*Los porcentajes de los Valores Diarios están basados en una dieta de 8400 kJ (2000 kcal) de acuerdo a FDA.	