

**Efecto de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP)
en la extracción de antocianinas de flor de
Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y evaluación de
su potencial como colorante natural**

Modesto Andrés Guillén Ordóñez

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP)
en la extracción de antocianinas de flor de
Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y evaluación de
su potencial como colorante natural**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Modesto Andrés Guillén Ordoñez

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Efecto de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP) en la extracción de antocianinas de flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) y evaluación de su potencial como colorante natural

Modesto Andrés Guillén Ordóñez

Resumen. Campos eléctricos pulsantes (CEP) es una tecnología emergente que puede facilitar la extracción de compuestos. Las antocianinas son pigmentos naturales que pueden fungir como colorantes en la industria. El objetivo del estudio fue optimizar el proceso de extracción de antocianinas en subproducto de Jamaica y evaluar su potencial como colorante natural en yogur de mora. Se realizó un tratamiento de CEP sobre el extracto con 20 combinaciones de carga eléctrica (0.2-1.0 kV/cm), área de partícula (0.03-0.15 cm²) y tiempo (110-448 ms). Se mantuvo constante la frecuencia de pulso (12.5 kHz) y ancho de onda (0.04 ms) en un sistema de ondas cuadradas monopolares positivas, analizado mediante un diseño factorial de tres factores bajo la metodología Superficie de Respuesta (Fase I). Se analizaron propiedades físico-químicas como pH, sinéresis (%) y color escala Hunter L*a*b*; y sensoriales sobre la aceptación de panelistas de dos proporciones del extracto de antocianinas (1 y 1.5 ml). Se hizo un ANDEVA y separación de medias Duncan (P < 0.05) en SAS® 9.4 (Fase II). El valor óptimo de concentración de antocianinas fue 805 mg/L en 0.48 kV/cm, 0.08 cm² y 250 ms para los parámetros mencionados previamente. La mayor proporción de antocianinas utilizadas como colorante tuvo diferencia sobre pH (4.20) y porcentaje de sinéresis (42.07%). El uso de antocianinas generó un color diferente al colorante usando actualmente; consecuentemente, el tratamiento de mayor proporción de antocianinas tuvo mejor aceptación en parámetros de sabor, consistencia y aceptación general. Se recomienda realizar una encapsulación del compuesto para evitar degradación. **Palabras clave:** Compuestos bioactivos, polifenoles, procesamiento no térmico, leche fermentada.

Abstract. Pulsed electric field (PEF) is an emergent technology that could facilitate compounds extraction. Anthocyanins are natural pigments that work as colorant in the industry. The aim of the study was to optimize extraction process of anthocyanin from hibiscus byproduct and to evaluate its potential as colorant in blackberry yogurt. A PEF treatment was applied to the extract with 20 different combinations of electric charge (0.2-1.0 kV/cm), particle area (0.03-0.15 cm²) and time (110-448 ms). Pulse frequency (12.5 kHz) and pulse width (0.04 ms) remained constant in a positive monopolar square waveform pulse, analyzed through a factorial design of three factors with surface respond method (Phase I). Physical and chemical properties like pH, syneresis and color in Hunter L*a*b* scale; and sensorial acceptance of panelist were analyzed using two amount of anthocyanin extract (1 ml and 1.5 ml). ANOVA and Duncan meaning test (P < 0.05) were conducted in SAS® 9.4 (Phase II). The optimal value for anthocyanin extraction was 805 mg/L in 0.48 kV/cm, 0.08 cm² and 250 ms for previous parameters. The highest proportion of anthocyanin used as colorant had an impact over pH (4.20) and syneresis (42.07%). The use of anthocyanins generated a different color compared to the conventional colorant currently used. Consequently, treatment with highest proportion of anthocyanins had better acceptance over taste, consistence and general acceptance parameters. It is recommended to encapsulate the anthocyanins to avoid degradation in future studies.

Key words: Bioactive compounds, polyphenols, non-thermic treatment, fermented milk.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	21
5. RECOMENDACIONES	22
6. LITERATURA CITADA.....	23
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Niveles de axiales y factoriales de variables independientes del diseño factorial completo sobre extracción de antocianinas.....	6
2. Valores codificados y reales del diseño factorial completo sobre la extracción de antocianinas.....	6
3. Formulación de muestras para los tratamientos del diseño factorial completo para la extracción de antocianinas.....	7
4. Formulación de yogurt de mora	8
5. Formulación de yogurt de mora con extracto de Jamaica concentrado al 5%	8
6. Concentración de antocianinas de flor de Jamaica por diseño fraccionado completo.	10
7. Coeficientes de regresión en función de las variables X_1 , X_2 y X_3 para concentración de antocianinas.....	11
8. Análisis de pH y sinéresis en yogurt de mora	17
9. Análisis de color en escala Hunter $L^*a^*b^*$ en yogurt de mora.....	17
10. Análisis de color para Croma y hue en yogurt de mora	18
Figuras	Página
1. Diagrama de flujo para elaboración de yogurt de mora con antocianinas.....	8
2. Efecto de la carga eléctrica (kV/cm) y área de partícula (cm ²) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).....	13
3. Efecto de la carga eléctrica (kV/cm) y tiempo (ms) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).....	14
4. Efecto del tiempo (ms) y área de partícula (cm ²) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).....	14
5. Función de utilidad en relación a carga eléctrica (kV/cm), área de partícula (cm ²) y tiempo (ms) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).....	16
6. (a) Diagrama espacial de color $L^*a^*b^*$ (b) diagrama de dispersión para (Δ) control, (Θ) 1 ml de antocianinas y (Φ) 1.5 ml de antocianinas.....	18
7. Diagrama radial del análisis sensorial con atributos evaluados en yogurt de mora con promedio de 100 panelistas.....	20

Anexos	Página
1. Valor de F calculado ($P < 0.10$) para la concentración de antocianinas.....	28
2. Sintaxis de SAS® 9.4 para análisis físico-químicos	28
3. Sintaxis SAS® 9.4 para análisis sensorial.....	29
4. Sintaxis SAS® 9.4 correlación de variables.....	30
5. Análisis sensorial en parámetros de sabor, acidez, consistencia y aroma en yogur de mora.....	30
6. Análisis sensorial en parámetros de color, apariencia y aceptación general	30
7. Circuito máquina generadora de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP).	31
8. Concentración de antocianinas por roto evaporador.	31
9. Cuantificación de antocianinas por métodos de pH diferencial.	32
10. Muestras preliminares de yogur de mora con extracto del subproducto de flor de Jamaica.....	32
11. Tratamientos del análisis sensorial.....	33
12. Correlación de datos físico-químicos y sensoriales.....	34

1. INTRODUCCIÓN

La flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) es perteneciente a la familia de las Malváceas con orígenes asiáticos y extensiones en América. Es una planta herbácea anual propia de climas secos subtropicales, montañosos, de matorral espinoso. Sus flores son de color rojo en la base y más pálido en los extremos, contienen un cáliz carnosos y generalmente de un color rojo intenso (Sáyago y Goñi 2010). Además, su producción se basa solo en la elaboración de jugos y no tiene un enfoque diferente en cuanto a sus otros beneficios. Las flores de *Hibiscus sabdariffa* L contienen antocianinas, flavonoides y polifenoles; los cuales se ha recalcado que poseen un rol de agente antioxidante o que contribuyen a mecanismos de protección cardíaca (Kuriyan *et al.* 2010).

Por otro lado, las antocianinas últimamente han ganado atención por ser compuestos bioactivos que generan beneficios a la salud. Dicho compuesto fue nombrado primero por Ludwig Marquat, la palabra antocianina proviene del griego *anthos* (que significa flor) y *kyanos* (que significa azul) (Sui 2017). Existen 539 tipos de antocianinas que han sido aisladas de plantas, de las cuales se han identificado 277 después de 1992 (Mateus y Freitas 2009). La estabilidad de los diferentes extractos de *Hibiscus sabdariffa* depende de las antocianinas para mantener sus actividades biológicas las cuales dependen del pH, temperatura, concentración y condiciones oxidantes, entre otros (Castañeda 2014).

Hay seis tipos de antocianinas comunes (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y maldivina) cuyas estructuras pueden variar por la sustitución glicosídica en la tercera y quinta posición (Lee *et al.* 2005). Por consiguiente, la aplicación de rosa de Jamaica en diversos alimentos se ha tornado una opción llamativa, debido a su gran aporte de compuesto bioactivos tales como, compuestos fenólicos y antocianinas (Sotomayor y Vargas 2017).

Sin embargo, dicho compuesto natural es utilizado como colorante natural en alimentos por su aporte a la salud. Recientes investigaciones han sido impulsadas por consumidores y beneficios nutricionales para reemplazar colorantes artificiales por los naturales. Usualmente, dichos pigmentos son menos estables, más costosos, con menor fuerza de tinción y un limitado rango de tonos. Anteriormente, estudios mostraron que el consumo diario de antocianinas en la dieta de Estados Unidos se estimaba entre 180 y 215 mg (Sui 2017; Hertog *et al.* 1993; Kuehnau 1976). Por otro lado, en el año 2002 se mostró un promedio de 12.5 mg/día en consumo de dicho compuesto, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (NHANES por sus siglas en inglés) (Sui 2017).

El tratamiento de campos eléctricos pulsantes (CEP) es considerado un tratamiento no térmico debido al ligero incremento de temperatura que tiene el producto expuesto al mismo (Villacrés-Brazales y Casas-Murillo 2015; Robles *et al.* 2012). Algunos de los factores que afectan la efectividad del tratamiento se encuentran relacionados con las condiciones que se quiera lograr en el experimento. Estos parámetros se pueden agrupar en: 1) factores técnicos, que están relacionados con el equipo y los parámetros de procesamiento, 2) factores biológicos, que se relacionan con los microorganismos y 3) factores del medio o también relacionados con el tipo y la condición del medio a tratar (Cerón-Carrillo *et al.* 2010). De la misma manera, el tratamiento de CEP facilita la extracción de compuestos bioactivos en tejidos vegetales como antocianinas. Estudios conducidos en extracción de antocianinas en diferentes plantas han mostrado dependencias en diferentes factores, como ser el tipo de solvente, concentración, tiempo y temperatura de extracción (Puértolas *et al.* 2013).

Debido a la aplicabilidad de este compuesto en la industria alimentaria, se han conjugado productos como bebidas suaves, confitería, lácteos, bebidas en polvo y raramente en alimentos congelados (Mateus y Freitas 2009). Desde una perspectiva económica la mejor fuente de extracción sería por sub productos industriales para otorgarle un valor agregado al alimento. Por dicha razón, se ha prestado más atención a los desechos industriales para aprovechar las cualidades bioquímicas que aún poseen.

El propósito del experimento fue optimizar la extracción de antocianinas provenientes del subproducto de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) utilizando campos eléctricos pulsantes para evaluarla como colorante natural en yogur de mora. Por lo tanto, se establecieron los siguientes objetivos:

- Determinar el punto máximo de optimización para extracción de antocianinas del subproducto de flor de Jamaica.
- Evaluar las propiedades físico-químicas de las antocianinas extraídas como colorante natural en yogur de mora.
- Evaluar las propiedades sensoriales del yogur de mora con extracto del subproducto de flor de Jamaica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Fase I. Optimización de la concentración de antocianinas de flor de Jamaica con efecto de campos eléctricos pulsantes (CEP).

Preparación de la muestra. Se recolectó el subproducto de flor de Jamaica en la planta hortofrutícola y se almacenó en bolsas plásticas. Seguidamente, se pesaron 250 gramos del material para remover humedad en un deshidratador de alimentos marca Excalibur modelo 35261 por cuatro horas a 33 °C y 3 m/s de velocidad de aire. La muestra deshidratada se colocó en un molino de martillo marca Thomas con un filtro de partícula de 1 mm. Todo el producto, incluido el material sin filtrar se almacenó en bolsa plástica. Consecuentemente, se realizó una separación granulométrica con tamices marca Gilson de 20, 30, 40, 60 y 100 mesh; se dividieron las muestras según tamaño de partícula correspondiente al diseño experimental.

Extracción de antocianinas con campos eléctricos pulsantes. Para la preparación de los tratamientos se utilizó 15% de relación sólido-líquido, 41.59% de etanol y ocho horas de extracción según recomendaciones de Sotomayor-Carrasco y Vargas-Arroyo (2017); las muestras se mezclaron en un agitador magnético cubiertas con papel aluminio. Asimismo, los tratamientos fueron sometidos en una máquina generadora de campos eléctricos pulsantes (CEP), las variables como carga eléctrica (kV/cm), área de partícula (cm²) y tiempo (ms) se establecieron correspondientemente al diseño. Puesto que, la capacidad máxima de tiempo en la máquina generadora de CEP es de 11 ms, se dividió la cantidad total del tiempo establecido por la metodología para aplicar los pulsos calculados. La cámara de tratamiento fue lavada entre cada muestra. Por consiguiente, todas las unidades tratadas se incubaron hasta alcanzar el tiempo recomendado. Consecuentemente, las muestras se centrifugaron a 4,000 rpm a 25 °C por 30 minutos.

Cuantificación de antocianinas. Se prepararon las soluciones en un vaso de precipitación con 24.5 ml de agua destilada y 0.5 ml del extracto por tratamiento (dilución 50X), se homogenizó con un agitador magnético. A continuación, se tomaron 0.5 ml de la solución previa y se añadió a un tubo de ensayo con 4.5 ml de solución buffer pH 1 (0.025 M KCl) y a 4.5 ml de solución buffer pH 4.5 (0.4 M NaC₂H₃O₂), los cuales fueron cubiertos totalmente con papel aluminio (dilución 10X) (Sotomayor-Carrasco y Vargas-Arroyo 2017). Posteriormente, se dejó en reposo por dos horas en oscuridad. Consecuentemente, los extractos fueron analizados en un espectrofotómetro de UV-Visible para determinar absorbancia a 520 nm y 700 nm respectivamente para cada tubo de ensayo, se calibró la máquina con agua destilada como blanco. Para determinar la concentración de antocianinas

se utilizó la ecuación [1] y la [2] de pH diferencial, el cual se consideró a cianidina-3-glucósido como principal antocianina presente en el extracto de flor de Jamaica.

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \left(\frac{\text{Absorbancia ajustada}}{\text{Coeficiente de extinción molar}} \right) \times PM \times 1000 \times FD \quad [1]$$

$$\text{Absorbancia ajustada} = (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}1.0} - (\text{Abs}_{520} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH}4.5} \quad [2]$$

Dónde:

PM (peso molecular) = 457.6 gr/mol de cianidina-3-glucósido.

Coeficiente de extinción molar = 29,600 de cianidina-3-glucósido.

1000 = factor de conversión molar a ppm (mg/L)

FD = factor de dilución (50X × 10X = 500X)

Diseño experimental. Para estudiar el efecto de carga eléctrica (kV/cm), área de partícula (cm²) y tiempo (ms) sobre la extracción de antocianinas de flor de Jamaica, se usó un diseño factorial completo 2³, mediante la metodología de superficie respuesta. El diseño fue de composición central rotacional de 2do orden (DCCR), incluyendo seis puntos axiales y seis puntos centrales, con un total de 20 tratamientos. Por consiguiente, se utilizó la ecuación [3] para codificar los parámetros del proceso (-1, 0, +1).

$$x_i = \left(X_i - \frac{z}{\Delta x_i} \right) \quad [3]$$

Dónde:

x_i = valor codificado de la X_i .

X_i = valor real de la variable.

z = valor real de la variable en el punto central.

ΔX_i = valor del intervalo de la variable x_i .

Para obtener un entorno experimental más acotado se delinearón las variables axiales $-\alpha$ y $+\alpha$, este valor depende del número factorial ($F = 2^k$) (Chicaiza-Guishcaso y Flores-Granados 2016). La K se representa como el número de variables independientes, los cuales se determinan por la ecuación 4.

$$\alpha = (F)^{\frac{1}{4}} = (2^k)^{\frac{1}{4}} = 1.682 \quad [4]$$

Para calcular el número de unidades experimentales para la metodología de diseño factorial completo se utilizó la ecuación 5.

$$n = 2^k + 2k + m \quad [5]$$

Dónde:

2^k = número de puntos factoriales.

$2k$ = número de puntos axiales.

m = número de réplicas del punto central.

La distribución de los tratamientos se definió así:

$2^k = 2^3 = 8$ puntos factoriales.

$2K = 2 \times 3 = 6$ puntos axiales.

$m = 6$ repeticiones de puntos centrales.

Total = 20 unidades experimentales.

Para el análisis de los resultados se describe en un sistema de tres variables independientes y una variable dependiente, teniendo como respuesta una combinación de niveles, como se muestra en la ecuación 6.

$$Y = F(X_1, X_2, X_3 \dots, X_k) \quad [6]$$

Por otra parte, se realizó un análisis de regresión para ajustar el polinomio de segundo orden con las variables independientes por cada variable respuesta. La expresión general para predecir el comportamiento de la variable dependiente se describe en la ecuación 7.

$$Y_i = (\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon) \quad [7]$$

Dónde:

Y_i = función respuesta.

X_1, X_2, X_3 = valores de las variables independientes.

B_0 = coeficiente relativo con la interpretación del eje.

$\beta_1, \beta_2, \beta_3$ = coeficientes lineales estimados por el método de mínimos cuadrados.

$\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ = coeficientes de variables cuadráticas.

β_{12} = coeficiente de interacción entre variables independientes.

ε = error.

Para mostrar la significancia del modelo propuesto se realizó un análisis de residuos, explicado por la comparación de proporción de la varianza (R^2) y así definirlo como predictivo o tendencioso. De la misma manera, la significancia de la “falta de ajuste” y la comparación del valor F calculado contra el valor F tabular para una significancia del 10% (Sotomayor-Carrasco y Vargas-Arroyo 2017; Rodrigues 2015).

Los rangos de cada variable se establecieron según la literatura consultada (Vorobiev y Lebovka 2016; Sari y Velioglu 2011; Villacrés-Brazales y Casas-Murillo 2015). En el cuadro 1 se muestran los valores axiales y laterales de cada variable.

Cuadro 1. Niveles de axiales y factoriales de variables independientes del diseño factorial completo sobre extracción de antocianinas.

Variables	Niveles				
	$-\alpha$	-1	0	1	$+\alpha$
Carga eléctrica (kV/cm) (X_1)	0.2	0.3	0.4	0.8	1.0
Área de partícula (cm ²) (X_2)	0.03	0.05	0.08	0.12	0.15
Tiempo (ms) (X_3)	110	167	250	333	390

Los valores codificados y reales del diseño experimental completo con tres variables para los tratamientos se dividieron en axiales, factoriales y centrales (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores codificados y reales del diseño factorial completo sobre la extracción de antocianinas.

Tratamientos	Niveles codificados			Niveles reales		
	X_1^1	X_2^2	X_3^3	X_1	X_2	X_3
1	-1.00	-1.00	-1.00	0.3	0.05	167
2	1.00	-1.00	-1.00	0.8	0.05	167
3	-1.00	1.00	-1.00	0.3	0.12	167
4	1.00	1.00	-1.00	0.8	0.12	167
5	-1.00	-1.00	1.00	0.3	0.05	333
6	1.00	-1.00	1.00	0.8	0.05	333
7	-1.00	1.00	1.00	0.3	0.12	333
8	1.00	1.00	1.00	0.8	0.12	333
9	-1.68	0.00	0.00	0.2	0.05	250
10	1.68	0.00	0.00	1.0	0.05	250
11	0.00	-1.68	0.00	0.4	0.03	250
12	0.00	1.68	0.00	0.4	0.15	250
13	0.00	0.00	-1.68	0.4	0.08	110
14	0.00	0.00	1.68	0.4	0.08	390
15©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250
16©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250
17©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250
18©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250
19©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250
20©	0.00	0.00	0.00	0.4	0.08	250

© Puntos centrales.

¹carga eléctrica (kV/cm), ²área de partícula (cm²), ³tiempo (ms)

Previo a realizar los tratamientos se hizo la mezcla de extracción con 41.59% de etanol, 15% relación sólido-líquido y ocho horas según Sotomayor-Carrasco y Vargas-Arroyo (2017). Se realizó un cambio en el porcentaje de relación sólido-líquido debido a que no se solubilizó con el porcentaje recomendado. Dicha formulación se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Formulación de muestras para los tratamientos del diseño factorial completo para la extracción de antocianinas a partir de flor de jamaica.

Etanol (%)		Tiempo (h)	Relación sólido-líquido (%)	
Agua (ml)	Etanol (ml)		Harina de flor (g)	Solución (ml)
7.4	5.3	8	2.3	15

Concentración de antocianinas. Se utilizó un Rotavapor RII marca Buchi para concentrar el extracto de Jamaica según el punto óptimo calculado. El equipo se reguló a 37 °C en baño maría, 10 °C para el condensador, 40 rpm y aplicación de presión al vacío. El concentrado se cubrió con papel aluminio para evitar entrada de luz. Sin embargo, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de antocianinas debido a una interacción entre agua y catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Castañeda 2014).

Fase II. Evaluación de antocianinas como colorante natural.

Pruebas preliminares. Se realizaron tres pruebas en yogur natural para definir la formulación de antocianinas que se ajustara a los colores deseados en yogur de mora. La cantidad de colorante natural añadido brindó colores diferentes y se seleccionaron las dos pruebas que mostraron mayor potencial; 0.02 y 0.03 ml de antocianinas en 20 gramos de yogur natural.

Preparación de muestra. A dos kilogramos de yogur sin colorante, saborizado con mora y se agregó 1 y 1.5 ml de antocianinas para un kilogramo respectivamente. Además, se utilizó un kilogramo de yogur de mora preparado por la planta de Lácteos de Zamorano, la formulación se muestra en el cuadro 4. Consecuentemente, las muestras fueron almacenadas en refrigeración. El diagrama de flujo del yogur de mora de Zamorano se ilustra en la figura 1 y la formulación del yogur con el extracto de Jamaica en el cuadro 5.

Cuadro 4. Formulación de yogur de mora.

Ingredientes	Cantidad (Kg)	Porcentaje (%)
Leche estandarizada	82.67	76.63
Leche descremada en polvo	7.02	6.51
Azúcar	6.40	5.93
Estabilizador	0.50	0.46
Cultivo láctico	0.06	0.06
Esencia de mora	0.12	0.11
Colorante	0.02	0.02
Concentrado de mora	10.97	10.17
Sorbato de potasio	0.12	0.11

Fuente: Planta de lácteos Zamorano.

Cuadro 5. Formulación de yogur de mora con extracto de Jamaica concentrado al 5%.

Tratamientos	Yogur base (g)	Extracto de flor de Jamaica concentrado al 5% (ml)
1	1000	1.00
2	1000	1.50

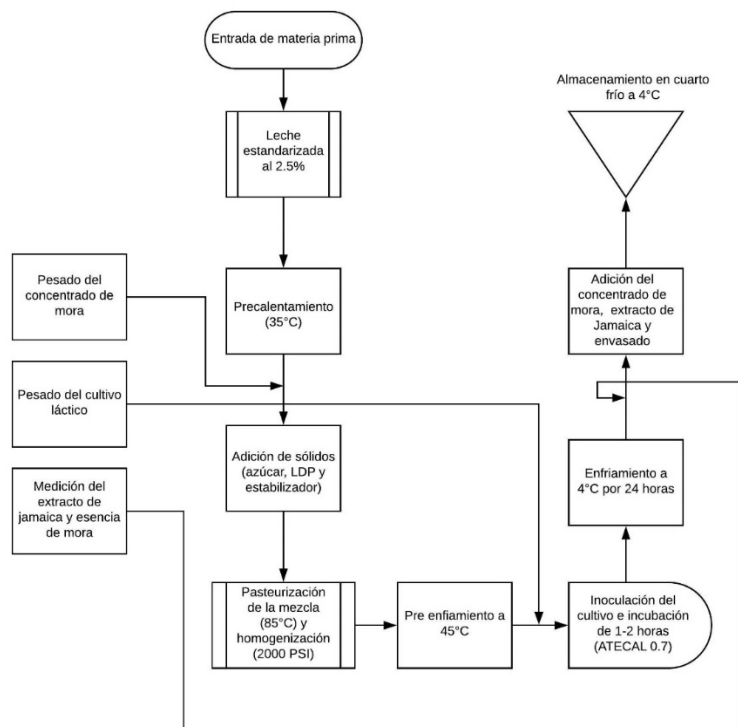


Figura 1. Diagrama de flujo para elaboración de yogur de mora con antocianinas.

Fuente: Planta de Lácteos Zamorano.

Medición de color. Se utilizó el ColorFlex de Hunterlab® para analizar los valores L*, a*, b* en los diferentes tratamientos. El valor L* indica la luminosidad en una escala de cero (negro) a 100 (blanco), mientras que +a* indica tendencia a rojo y -a* tendencia a verde, el valor -b* muestra inclinación a amarillo y -b* inclinación a azul (Sotomayor y Vargas 2017). Los datos fueron triplicados utilizando 10 ml de muestra.

Se tomaron los valores de cromaticidad a* y b* para calcular los índices de saturación de color (croma) y el ángulo de tono (hue) con las ecuaciones 8 y 9 respectivamente.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad [8]$$

$$Hue = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad [9]$$

Medición de pH. Se realizó el análisis por medio del método estándar AOAC 981.12 (AOAC 2005). Se pesó una muestra de 10 gramos de yogur y se diluyó en una relación 1:1 con agua destilada, se realizó con un potenciómetro de campo OHAUS® ST20. El equipo fue calibrado con soluciones buffer de pH 4 y 7, todos los análisis se hicieron por triplicado.

Medición de sinéresis. Se utilizó la metodología propuesta por Al-Kadamany *et al.* en el (2002). Se pesaron 20 gramos de yogur y se esparcieron en papel filtro Whatman® #2, la filtración se facilitó con una bomba al vacío durante 10 minutos. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La sinéresis expresada en % libre de peso se calculó con la ecuación 10:

$$\% \text{peso libre} = \frac{\text{peso inicial de muestra} - \text{peso final de muestra}}{\text{peso inicial de muestra}} \times 100 \quad [10]$$

Análisis sensorial.

Para el análisis sensorial se realizó una prueba de aceptación con 100 panelistas no entrenados. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos, donde 1 significa “me disgusta extremadamente” y 9 “me gusta extremadamente”. Se valoraron atributos de sabor, apariencia, aroma, acidez, color, consistencia y aceptación general. Además, se colocaron tres muestras por cada panelista con el tratamiento control y las otras dos con diferentes proporciones de antocianinas en yogur de mora.

Análisis estadístico.

Para ambos análisis (físico-químicos y sensoriales) se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias Duncan ($P < 0.05$) para observar diferencias significativas entre tratamientos, por medio de programa SAS® versión 9.4. Además, para observar la relación entre todas las variables observadas, se realizó una correlación de factores para poder determinar el porcentaje de relación que poseen.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase I. Optimización de la concentración de antocianinas de flor de Jamaica con efecto de campos eléctricos pulsantes (CEP).

Por medio del método de pH diferencial se cuantificó la concentración de antocianinas (mg/L) según los diferentes tratamientos (Cuadro 6). Los rangos de las variables independientes fueron 0.2-1.0 kV/cm para carga eléctrica, 0.03-0.15 cm² para área de partícula y 110-390 ms para tiempo. Dicha concentración se expresó en (mg/L). El contenido apropiado de antocianinas en materiales vegetativos varía de 20 a 3,000 mg/L expresado como cianidina-3-glucósido (Lee 2005).

Cuadro 6. Concentración de antocianinas de flor de Jamaica por diseño fraccionado completo.

Tratamientos	Carga eléctrica (kV/cm)	Área de partícula (cm ²)	Tiempo (ms)	Concentración (mg/L)
1	0.3	0.05	167	1,157
2	0.8	0.05	167	1,424
3	0.3	0.12	167	1,323
4	0.8	0.12	167	1,432
5	0.3	0.05	333	1,299
6	0.8	0.05	333	1,486
7	0.3	0.12	333	1,319
8	0.8	0.12	333	1,315
9	0.2	0.05	250	1,142
10	1.0	0.05	250	1,496
11	0.4	0.03	250	1,321
12	0.4	0.15	250	1,198
13	0.4	0.08	110	1,118
14	0.4	0.08	390	1,535
15	0.4	0.08	250	1,235
16	0.4	0.08	250	1,198
17	0.4	0.08	250	1,211
18	0.4	0.08	250	1,287
19	0.4	0.08	250	1,263
20	0.4	0.08	250	1,243

Según los coeficientes, el análisis se categorizó como tendencioso y significativo debido a que el coeficiente de variación fue mayor a 30% ($R^2 = 0.83$), indicando que el 83% de los datos se ajustaron al modelo estadístico. Así también, por medio de una prueba F el modelo se clasificó como predictivo debido a que el F calculado (2.524) fue mayor al F tabular (2.416). Por otro lado, se considera que es un modelo tendencioso ya que la falta de ajuste fue significativa ($P < 0.10$). Dentro de los modelos de análisis de regresión la falta de ajuste nos explica cuanto el modelo logra describir de la relación de las variables independientes con las dependientes (Rodrigues 2016). Consecuentemente, el modelo estadístico fue clasificado como tendencioso y no predictivo, debido a que no cumple todos los factores analizados (Cuadro 7).

Cuadro 7. Coeficientes de regresión en función de las variables X_1 , X_2 y X_3 para concentración de antocianinas.

Factor	Coefficiente de regresión
Intercepto	602.14*
X_1^1 (L ^x)	1133.71*
X_1 (Q ^y)	-3.83
X_2^2 (L)	4476.82*
X_2 (Q)	4539.61
X_3^3 (L)	0.47
X_3 (Q)	0.01*
$X_1 \times X_2$	-3412.17*
$X_1 \times X_3$	-2.12*
$X_2 \times X_3$	-15.62*
Falta de ajuste	0.021*
R²	0.832
F calculado	2.524
F tabular	2.416

Coefficientes con * indican significancia ($P < 0.10$).

^xrelación lineal, ^yrelación cuadrática.

¹carga eléctrica (kV/cm), ²área de partícula (cm²), ³tiempo (ms).

Así mismo, se obtuvo la ecuación 8 que expresa la concentración de antocianinas (mg/L). Después de un análisis de varianza en base al valor F y P, un polinomio de segundo orden se ajustó en respuesta a la variable dependiente.

$$\text{Conc.} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 602 + 1134X_1 + 4477X_2 + 0.005X_3^2 - 3412X_1 \times X_2 - 2X_1 \times X_3 - 16X_2 \times X_3 \quad [8]$$

Donde:

X_1 = carga eléctrica (kV/cm)

X_2 = área de partícula (cm²)

X_3 = tiempo (ms)

Las variables de carga eléctrica (kV/cm) y área de partícula (cm²) presentaron interacciones y se generó un gráfico de superficie en respuesta al modelo. Ambos parámetros evaluados tuvieron un efecto (figura 2) en la concentración de antocianinas (mg/L). Campos eléctricos pulsantes es una tecnología que causa electroporación de las membranas celulares por la aplicación de un campo eléctrico intermitente de alta intensidad en períodos de microsegundos (Luengo *et al.* 2014). Es por ello, que los compuestos dentro de la célula vegetal viajan a través de los espacios electroporados. Entonces, la cantidad de componentes extraídos con el disolvente depende de la cantidad de células dañadas, lo cual a su vez, afecta el rendimiento de la extracción (Cerón-Carrillo *et al.* 2010). El valor óptimo encontrado para la extracción fue de 0.48 kV/cm y 0.08 cm² para carga eléctrica y área de partícula respectivamente. Para los tejidos vegetales, una eficiente electroporación puede observarse en campos eléctricos moderados entre 200-1000 V/cm (Vorobiev y Lebovka 2016).

Por otro lado, el área de partícula tuvo efecto en la extracción del compuesto. Actualmente, no se encontró literatura disponible que sustente el efecto del área de partícula sobre la extracción de antocianinas. De todas maneras, es conocido que las partículas más pequeñas incrementan la extracción de varios compuestos a menos que ocurra aglomeración (Sari y Velioglu 2011; Asep *et al.* 2008; Nagy y Simámdi 2008; Giao *et al.* 2009). Debido a que un tamaño de partícula menor incrementa el área de contacto entre el solvente y la matriz; además, indica un mayor grado de desintegración celular (Brunton y Luengo 2017).

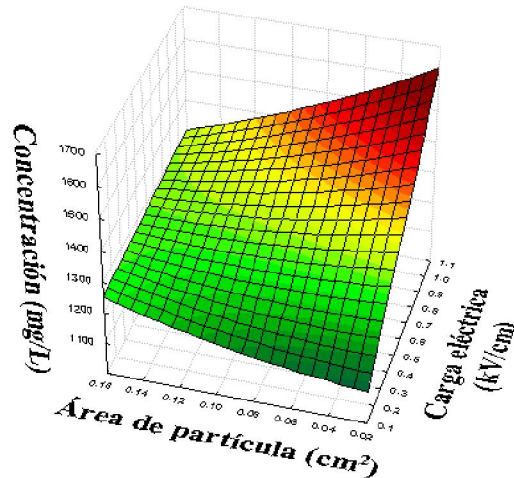


Figura 2. Efecto de la carga eléctrica (kV/cm) y área de partícula (cm²) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).

La carga eléctrica y tiempo tuvieron significancia sobre la extracción de antocianinas con 0.48 kV y 250 ms respectivamente. No hay un método simple para la estimación teórica del tiempo de daño celular en tejidos vegetales, tampoco en membranas o en simples células esféricas (Raso y Heinz 2006). Por ende, se observa un comportamiento indirectamente proporcional (Figura 3); dado que a mayor carga eléctrica menor el tiempo de tratamiento necesario. El tiempo característico de daño celular decrece con el incremento de la temperatura y campo eléctrico (Lebovka *et al.* 2005).

En cambio, la carga eléctrica proporciona la facilidad de extracción dependiendo del tiempo. Un estudio encontró cambios intracelulares por CEP entre 0.35 y 0.52 kV/cm (Fincan y Dejmek 2002). Por consiguiente, utilizar un mayor tiempo con alta carga eléctrica implicaría desperdicio de energía en el proceso. Cuando altos voltajes son aplicados, los tiempos cortos en milisegundos resultan en bajo costo energético en el tratamiento, y no hay significancia en el incremento de la temperatura (Brunton y Luengo 2017).

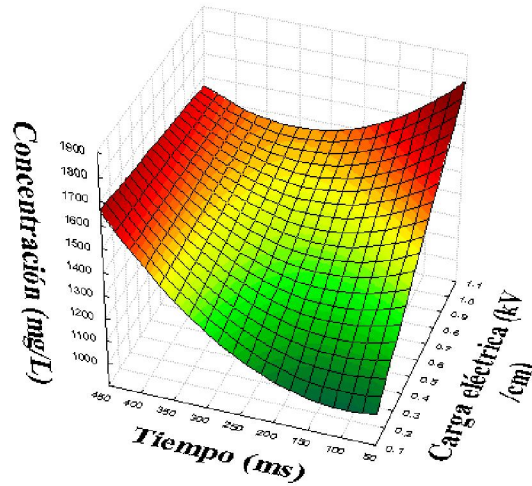


Figura 3. Efecto de la carga eléctrica (kV/cm) y tiempo (ms) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).

Las variables tiempo y área de partícula tuvieron como puntos óptimo 250 ms y 0.08 cm² respectivamente. Se observó que a medida disminuía el área de partícula y aumentaba el tiempo de tratamiento, mayor era la extracción de antocianinas (Figura 4). Consecuentemente, el punto óptimo del área de partícula no fue el más bajo; esto puede deberse a que hubo aglomeración de partículas por la humedad presente en el ambiente. Se debe prevenir la aglomeración y deformación de partículas (Coelho y Palavra 2015).

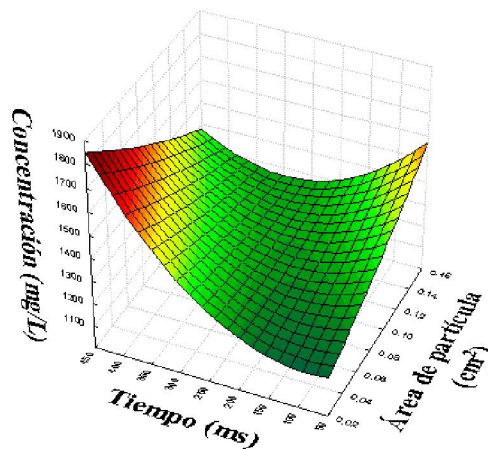


Figura 4. Efecto del tiempo (ms) y área de partícula (cm²) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).

Después de identificar las variables representativas en el modelo, los puntos óptimos de extracción fueron: 0.48 kV/cm de carga eléctrica, 0.08 cm² en área de partícula y 250 ms

en tiempo (Figura 5). La combinación de los puntos óptimos dio como resultado 805 mg/L de antocianinas expresadas como cianidina-3-glucósido. En un estudio de extracción de antocianinas en subproducto de mora con CEP realizado por Bobinaité y colaboradores (2016) reportaron un rango de concentración de 64.4-93.1 mg/100g como resultado, el cual coincidió con el resultado de este estudio (80.5 mg/100g).

Después de concentrar al 5% el extracto de antocianinas de flor de Jamaica con los puntos óptimos recomendados, la cuantificación expresada como cianidina-3-glucósido fue de 16,081 mg/L, siendo 20 veces mayor al extracto sin concentrar.

Fase II. Evaluación de antocianinas como colorante natural.

Los resultados de pH (Cuadro 8) muestran diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos; el yogur + 1.5 ml de antocianinas mostró el valor más bajo (4.20 ± 0.01) en comparación al control (4.52 ± 0.02). Dado que, los ácidos orgánicos (málico y ascórbico) presentes en el extracto de Jamaica disminuye el pH en los productos lácteos (Castillo 2017; Charley 2012). Por lo tanto, el volumen agregado a la proporción de yogur de mora modificó su pH. Según Walstra *et al.* en el 2006 en su libro de “*Dairy science and technology*”, el yogur se incuba a 45 °C por 2.5 horas hasta alcanzar una acidez aproximada entre 90 y 100 mM (pH \approx 4.2). Esto difiere de Bylund (2015) en su libro “*Dairy processing handbook*”, que establece que cuando el pH óptimo es alcanzado (4.5 típicamente) el yogur se debe enfriar.

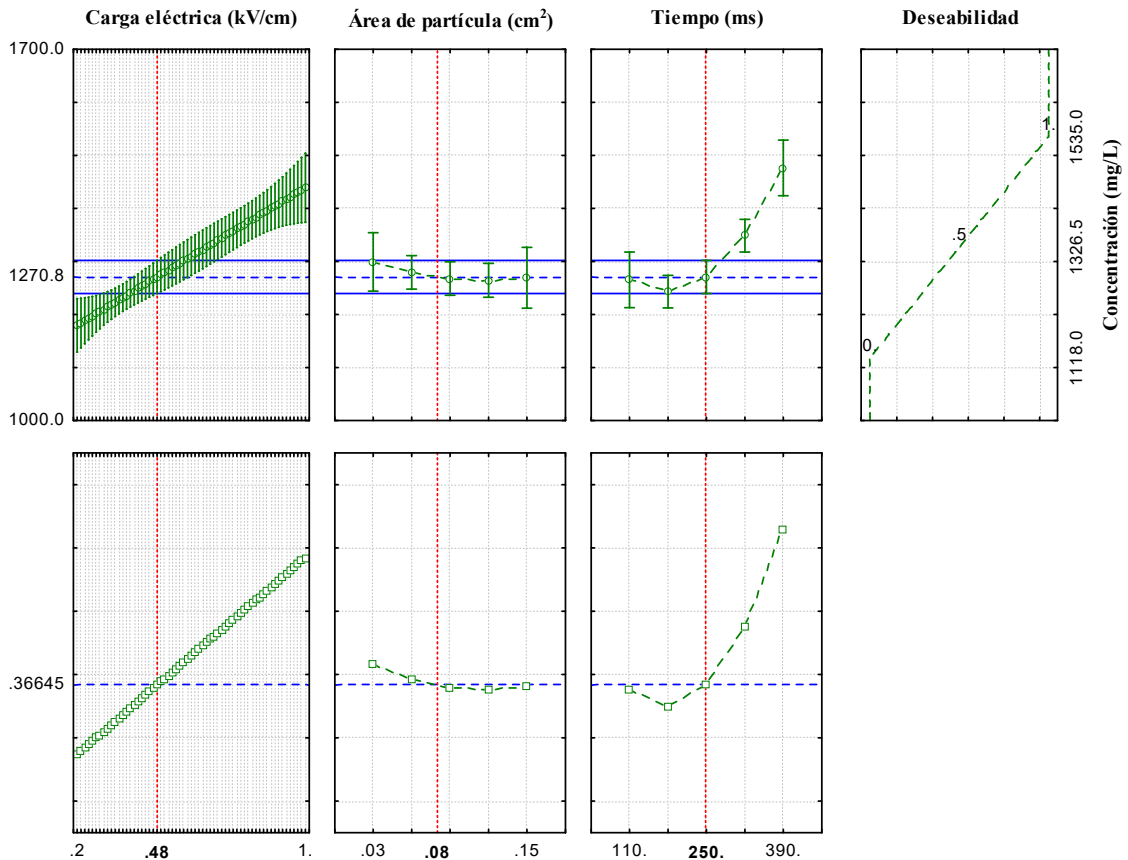


Figura 5. Función de utilidad en relación a carga eléctrica (kV/cm), área de partícula (cm²) y tiempo (ms) sobre la concentración de antocianinas (mg/L).

Evaluación de sinéresis.

Para el análisis de sinéresis se calculó el porcentaje en peso libre o la diferencia de peso por pérdida de fase líquida. Por ende, el tratamiento de yogur + 1.5 ml antocianinas tuvo mayor porcentaje de pérdida líquida en comparación a los otros dos tratamientos, los cuales también tuvieron diferencia significativa ($P < 0.05$). Sinéresis está relacionada con la inestabilidad del gel conectivo y su pobre habilidad de atrapar todo el suero (Izadi *et al.* 2015; Lucey y Singh 1998). Por lo tanto, algunas proteínas son desnaturizadas y precipitadas de la solución cuando son calentadas arriba de ciertas temperaturas o ajustando la solución a pH moderadamente ácidos o básicos (Smith 2010). Debido a esto, se evidenció una creciente pérdida de solución a medida que la proporción de extracto de Jamaica en la formulación aumentaba. Adicionalmente, los polifenoles pueden influir en el reordenamiento de una matriz, lo cual puede resultar en tamaños de poro más grandes en la matriz del gel, generando mayor sinéresis (Felix da Silva *et al.* 2017).

Cuadro 8. Análisis de pH y sinéresis en yogur de mora.

Tratamientos	pH	Sinéresis (%)
	Media \pm D.E. ¹	Media \pm D.E.
Yogur + CA ³	4.52 \pm 0.02 ^a	31.52 \pm 1.71 ^c
Yogur + 1 ml antocianinas	4.30 \pm 0.01 ^b	36.50 \pm 0.66 ^b
Yogur + 1.5 ml antocianinas	4.20 \pm 0.01 ^c	42.07 \pm 0.98 ^a
C.V.² (%)	0.32	3.77

^{abc} tratamientos seguidos de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

¹ Desviación estándar, ² Coeficiente de Variación, ³ Colorante Artificial

Análisis de color.

Los tratamientos tuvieron diferencia significativa ($P < 0.05$) en análisis de color. En el parámetro L* (luminosidad), el tratamiento de yogurt + 1ml antocianinas mostró mayor luminosidad en comparación a los demás. Mientras tanto, el tratamiento yogurt + 1.5 ml antocianinas mostró menos luminosidad. La luminosidad en leche fermentada decrece con la disminución de pH, congelación y adición de frutas maduras (Sánchez-Bravo *et al.* 2018; García-Pérez *et al.* 2017). Por otro lado, yogurt + 1.5 ml antocianinas fue el tratamiento que más se acercó al color rojo (a*) debido a las características del extracto. En un estudio realizado por Ersus Bilek *et al.* (2017), se encapsularon antocianinas de zanahorias negras, el análisis de color indicó un valor en a* de 18.12 \pm 0.03, similar al valor encontrado en este estudio (14.82 \pm 0.11). No obstante, el control presentó mayor tendencia al color azul (-b*) con -5.03 \pm 0.08 en comparación a los demás tratamientos (cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis de color en escala Hunter L*a*b* en yogur de mora.

Tratamientos	L* ¹	a* ²	b* ³
	Media \pm D.E. ⁴	Media \pm D.E.	Media \pm D.E.
Control + CA ⁵	65.99 \pm 0.08 ^b	8.03 \pm 0.11 ^c	-5.05 \pm 0.16 ^c
Yogur + 1 ml antocianinas	67.12 \pm 0.08 ^a	10.55 \pm 0.61 ^b	0.61 \pm 0.09 ^a
Yogur + 1.5 ml antocianinas	59.16 \pm 0.08 ^c	14.82 \pm 0.09 ^a	-1.28 \pm 0.11 ^b
C.V.⁶ (%)	0.13	0.64	0.24

^{abc} tratamientos seguidos de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

¹luminosidad, ²rojo, ³amarillo, ⁴Desviación estándar, ⁵Colorante Artificial, ⁶Coeficiente de variación.

Asimismo, se calcularon los valores de croma y ángulo de tono (hue) para cada tratamiento (Cuadro 10). En relación a croma, esta es una medida cuantitativa de saturación, que indica la intensidad de color percibida por los consumidores (Molina *et al.* 2018; Pathare *et al.* 2013). El tratamiento yogurt + 1.5 ml antocianinas tuvo mayor diferencia significativa ($P < 0.05$) que los demás tratamientos, esto se debe a la concentración en la cual se encontraba el extracto de Jamaica (5%) y debido a su baja luminosidad (Cuadro 10). Para el ángulo de

tono (hue), el tratamiento que más se inclinó al color morado fue el control con un valor de $328^\circ \pm 0.18$. Wallace y Giusti en el (2008) determinaron el color en yogur con antocianinas de *Berberis boliviana* L; el resultado de croma (14.00) se asimila con los resultados obtenidos por el tratamiento de mayor diferencia significativa (yogur + 1.5 ml antocianinas = 14.87 ± 0.18), pero difiere del ángulo de tono con 355° .

Cuadro 10. Análisis de color para Croma y hue en yogur de mora.

Tratamientos	Croma	Hue (°)
	Media \pm D.E. ¹	Media \pm D.E.
Control + CA ²	9.48 ± 0.49^c	328 ± 0.18^b
Yogur + 1 ml antocianinas	10.57 ± 0.65^b	3.33 ± 0.60^c
Yogur + 1.5 ml antocianinas	14.87 ± 0.39^a	355 ± 0.10^a
C.V.³ (%)	3.96	0.29

^{abc} tratamientos seguidos de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

¹Desviación estándar, ²Colorante Artificial, ³Coefficiente de Variación.

El posicionamiento de los tratamientos mostró diferencia de 27° (figura 6a) entre el tratamiento control + CA y yogur 1.5 ml antocianinas; así mismo, 8.3° entre yogur 1.5 ml antocianinas y yogur 1.0 ml antocianinas. Comúnmente se encuentra una relación inversa entre la luminosidad y croma (Hernández-Martínez *et al.* 2017). Los tratamientos con menor o cero proporción de antocianinas mostraron menor luminosidad (figura 6b) en comparación al tratamiento con mayor contenido antocianínico.

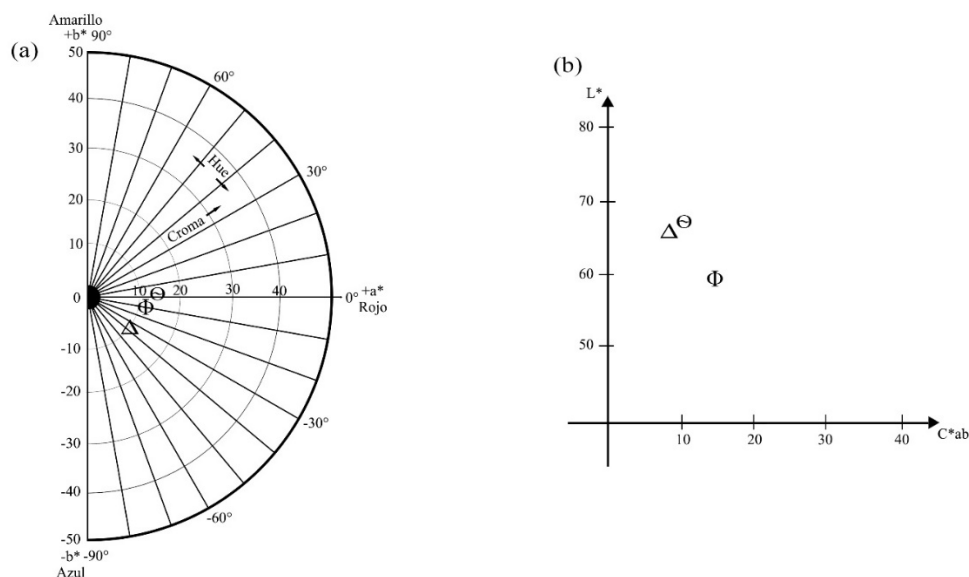


Figura 6. (a) Diagrama espacial de color $L^*a^*b^*$ (b) diagrama de dispersión para el (Δ) control, (Θ) 1 ml de antocianinas y (Φ) 1.5 ml de antocianinas.

Análisis sensorial.

Para los análisis sensoriales, se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$) entre tratamientos para la variable de sabor (Figura 7). El tratamiento yogur + 1.5 ml antocianinas, con mayor proporción de extracto de Jamaica, tuvo mayor aceptación (7.44 ± 1.37) entre los panelistas en comparación a los demás. Esto difiere a un estudio realizado por Carvalho Alves *et al.* en el 2013, ya que indica que el sabor recibió menor puntuación con la mayor concentración del extracto debido a la evaporación que se usó para remover el solvente, ocasionando un aumento en los compuestos fenólicos y creando un sabor astringente y ácido en las muestras de yogur. Según Marchiani *et al.* (2016) en la evaluación de un yogur enriquecido con pulpa de uva; la muestra control fue aceptable y mostró puntuación más alta por su apariencia, aroma, sabor y textura.. No obstante, los resultados del estudio mostraron lo contrario a lo investigado debido a la inclinación de los panelistas por este tratamiento. Por lo que, esta característica acidulante de las antocianinas hace que sea un colorante más preferible hacia los consumidores por motivo a su moderada acidez en alimentos como el yogur (He y Giusti 2010).

Por otro lado, los tratamientos (Figura 7) no tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$) en acidez. Las sugerencias de un estudio realizado por He y Giusti en el (2010) anuncian que para obtener mayor preferencia por los consumidores deben disminuir la acidez usando edulcorantes o diferente yogur con baja acidez.

La consistencia del yogur está relacionada con la viscosidad. Los resultados mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) para el tratamiento yogur + 1.5 ml antocianinas (7.56 ± 1.19). Según, Bylund (1995) señala que en algunas áreas la personas prefieren yogures líquidos altamente viscosos, mientras que en otros países prefieren un yogur en forma de gel suave.

Referente al aroma, no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos percibidos por los panelistas. Esto se debe a que las concentraciones del extracto añadido al yogur no fueron suficientes para ejercer un cambio sensorial en el producto o la percepción fue afectada por la susceptibilidad fisiológica del panelista. En la cavidad bucal, los carbohidratos-polifenol-proteicos salivales pueden dar inicio al desencadenamiento de compuestos aromáticos y polifenoles. Dichos carbohidratos son capaces de encapsular los compuestos volátiles, principalmente aquellos aromas con naturaleza hidrofóbica de acuerdo a estudios realizados previamente *in vitro* con vino y saliva (Esteban-Fernández *et al.* 2018; Muñoz-González *et al.* 2014; Mitropoulou *et al.* 2011).

En cuanto a color (Figura 7), los panelistas tuvieron mayor aceptación hacia el tratamiento yogur + 1.5 ml antocianinas (7.36 ± 1.36) y control (6.94 ± 1.84), diferenciándose del tratamiento yogur + 1 ml antocianinas (6.15 ± 1.90). Debido a la diferencia ventajosa en saturación de color, ya que fueron los más aceptados por la percepción del mismo. En un estudio realizado por Carvalho Alves *et al.* (2013), se evaluó el efecto del extracto de antocianinas obtenidas de jaborcaba sobre el yogur, los resultados en análisis sensorial indicaron que a medida que la concentración aumentaba, la aceptabilidad crecía en relación al color y apariencia. Siendo, yogur + 1.5 ml antocianinas (7.14 ± 1.48) y el control (6.79 ± 1.74) similares en apariencia. Consecuentemente, la tinción del colorante artificial en yogur y la mayor proporción del extracto de Jamaica tuvieron mayor preferencia sobre los

resultados. De igual modo, desde acidez moderada a condiciones neutrales la pérdida de protones del catión flavilio genera una base quinooidal azul (Rodríguez-Amaya 2016).

En términos de aceptación general, el tratamiento yogur + 1.5 ml antocianinas (7.63 ± 1.09) mostró mayor diferencia significativa ($P < 0.05$) según (Figura 7). Es así que, los panelistas mostraron mayor afección al tratamiento con mayor concentración de extracto de Jamaica. Esto difiere de Cid-Ortega y Guerrero-Beltrán (2015), quienes argumentaron que el yogur con extracto de Jamaica es menos aceptable que el control debido a la probabilidad del exceso de acidez brindada por el concentrado causando un sabor no satisfactorio. No obstante, los panelistas establecieron comentarios referentes al control como “color muy opaco”, “necesita más color” y “no se parece al color del empaque”. Existe una correlación alta negativa (-0.9675) entre la aceptación general y el valor L* (luminosidad). Iwalokun y Shittu (2007) demostraron que el extracto de cálices de Jamaica en yogur de fresa mostró mayor aceptación sensorial.

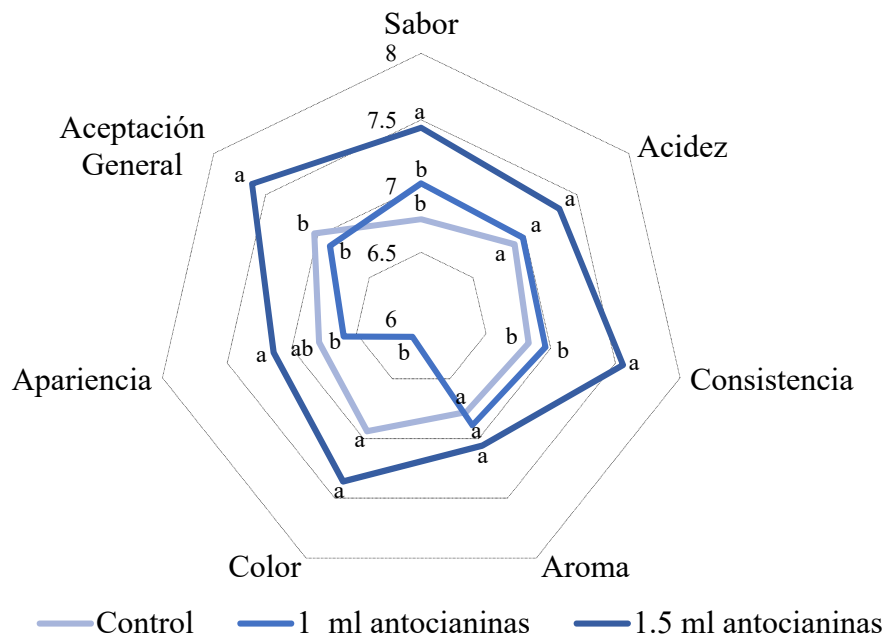


Figura 7. Diagrama radial del análisis sensorial con atributos evaluados en yogur de mora con promedio de 100 panelistas.

4. CONCLUSIONES

- El punto óptimo para la extracción de antocianinas del subproducto de flor de Jamaica es de 0.48 kV/cm de carga eléctrica, 0.08 cm² en área de partícula y 250 ms de tiempo.
- La adición de antocianinas como colorante natural en yogur de mora tuvo cambios significativos en pH, sinéresis, luminosidad, a*, croma y hue en comparación al colorante sintético.
- El tratamiento yogur + 1 ml antocianina presentó similitud al control + CA en análisis sensorial a excepción de color.
- Los panelistas presentaron mayor afición hacia el yogur con mayor concentración (yogur + 1.5 ml antocianinas) de extracto del subproducto de Jamaica en parámetros de sabor, consistencia y aceptación general. Dicho tratamiento, presentó similitud con el control en color, apariencia, acidez y aroma.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar la cuantificación de antocianinas por HPLC para determinar el tipo y la cantidad de antocianinas existentes en el extracto y yogur de mora.
- Realizar una encapsulación de antocianinas con almidón-alginato para evitar la degradación del compuesto.
- Evaluar la capacidad de antocianinas como colorante natural antes de la fermentación del yogur.
- Realizar un análisis microbiológico con diferentes concentraciones de antocianinas sobre la inhibición de *Listeria monocytogenes*.
- Realizar una prueba de discriminación (triángulo) para determinar si se encuentra diferencia entre los tratamientos.
- Realizar un análisis de costo-utilidad para determinar las ganancias que se obtendrían con el colorante natural en comparación al artificial.

6. LITERATURA CITADA

Al-Kadamany E, Toufeili I, Khattar M, Abou-Jawdeh Y, Harakeh S, Haddad T. 2002. Determination of shelf life of concentrated yogurt (labneh) produced by in-bag straining of set yogurt using hazard analysis. *Journal of Dairy Science*. 85(5):1023–1030. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74162-3.

Association of Official Agricultural Chemist (AOAC). 2005. pH of Acidified Foods: Quantitative Chemistry [981.12 method]. USA: [publisher unknown]; [accessed 03/11/18]. <http://www.eoma.aoac.org/methods/info.asp?ID=18372>.

Asep EK, Jinap S, Tan TJ, Russly AR, Harcharan S, Nazimah SAH. 2008. The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. *Journal of Food Engineering*. 85(3):450–458. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.08.008.

Bobinaitė R, Pataro G, Raudonis R, Vškešlis P, Bobinas Č, Šatkauskas S, Ferrari G. 2016. Improving the extraction of juice and anthocyanin compounds from blueberry fruits and their by-products by pulsed electric fields. In: Jarm T, Kramar P, editors. 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. Vol. 53. Singapore: Springer Singapore. p. 363–366 (IFMBE Proceedings).

Brunton N, Luengo E. 2017. Pulsed electric fields for extraction of secondary metabolites from plants. Dublin, Ireland: Springer International Publishing. 15 p. ISBN: 10.1007/978-3-319-32886-7_175.

Bylund G. 2015. Dairy processing handbook. 3rd ed., revision 1. Lund: Tetra Pak Processing Systems AB. 482 p. ISBN: 9176111326.

Carvalho Alves AP de, Corrêa AD, Pinheiro ACM, Oliveira FC de. 2013. Flour and anthocyanin extracts of jaboticaba skins used as a natural dye in yogurt. *International Journal Food Science Technology*. 14:n/a-n/a. doi:10.1111/ijfs.12110.

Castañeda R CA. 2014. Bioactive compounds and therapeutic properties of jamaican flowers (*Hibiscus sabdariffa* L.). Scientific magazine of chemistry faculty in San Carlos University of Guatemala. 24.

Castillo Araúz RL. 2017. Efecto de uso del extracto de la Flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) como colorante natural y fuente de antioxidantes en las características fisicoquímicas de yogur sabor a fresa [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 40 p.

Cerón-Carrillo TG, Palou E, López-Malo A. 2010. Pulsos eléctricos: fundamentos y aplicaciones en alimentos: Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas, Puebla, Sta. Catarina Mártir, Cholula, Puebla, 72810, Mexico. 1(9-26).

Charley H. 2012. Tecnología de alimentos procesos químicos y físicos en la preparación de alimentos. 1th ed. Nuevo León (México). Editorial Limusa. 768 p.

Chicaiza Guishcaso VG, Flores Granados EA. 2016. Evaluación de extracción, encapsulación y capacidad antioxidante de las antocianinas de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) [Tesis] . Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 41 p.

Cid-Ortega S, Guerrero-Beltrán JA. 2015. Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: A review. J Food Sci Technol. 52(11):6859–6869. doi:10.1007/s13197-015-1800-9.

Coelho JAP, Palavra AMF. 2015. Supercritical fluid extraction of compounds from spices and herbs. In: Fornari T, Stateva RP, editors. High Pressure Fluid Technology for Green Food Processing. Cham: Springer International Publishing. p. 357–396 (Food engineering series).

Ersus Bilek S, Yılmaz FM, Özkan G. 2017. The effects of industrial production on black carrot concentrate quality and encapsulation of anthocyanins in whey protein hydrogels. Food and Bioproducts Processing. 102:72–80. doi:10.1016/j.fbp.2016.12.001.

Esteban-Fernández A, Muñoz-González C, Jiménez-Girón A, Pérez-Jiménez M, Pozo-Bayón MÁ. 2018. Aroma release in the oral cavity after wine intake is influenced by wine matrix composition. Food Chem. 243:125–133. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.101.

Felix da Silva D, Junior NNT, Gomes RG, Dos Santos Pozza MS, Britten M, Matumoto-Pintro PT. 2017. Physical, microbiological and rheological properties of probiotic yogurt supplemented with grape extract. J Food Sci Technol. 54(6):1608–1615. eng. doi:10.1007/s13197-017-2592-x.

Fincan M, Dejmeck P. 2002. *In situ* visualization of the effect of a pulsed electric field on plant tissue. Journal of Food Engineering. 55(3):223–230. doi:10.1016/S0260-8774(02)00079-1.

García-Pérez FJ, Lario Y, Fernández-López J, Sayas E, Pérez-Alvarez JA, Sendra E. 2005. Effect of orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. Color research and application. 30(6):457–463. doi:10.1002/col.20158.

Giao MS, Pereira CI, Fonseca SC, Pintado ME, Malcata FX. 2009. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chem.* 117(3):412–416. doi:10.1016/j.foodchem.2009.04.020.

He J, Giusti MM. 2010. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review Food Science Technology.* 1:163–187. eng. doi:10.1146/annurev.food.080708.100754.

Hernández-Martínez AR, Torres D, Molina GA, Esparza R, Quintanilla F, Martínez-Bustos F, Estevez M. 2017. Stability comparison between microencapsulated red-glycosidic pigments and commercial FD&C Red 40 dye for food coloring. *Journal Material Science.* 52(9):5014–5026. doi:10.1007/s10853-016-0739-1.

Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutritional Cancer Center.* 20(1):21–29. eng. doi:10.1080/01635589309514267.

Iwalokun B, Shittu M. 2007. Effect of *Hibiscus sabdariffa* (calyce) extract on biochemical and organoleptic properties of yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition.* 6(2):172–182. doi:10.3923/pjn.2007.172.182.

Izadi Z, Nasirpour A, Garoosi GA, Tamjidi F. 2015. Rheological and physical properties of yogurt enriched with phytosterol during storage. *Journal Food Science Technology.* 52(8):5341–5346. eng. doi:10.1007/s13197-014-1593-2.

Kuehnau J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 24:117–191. eng.

Kuriyan R, Kurman D, Rajendran R, Kurpad A. 2010. An evaluation of the hypolipidemic effect of an extract of *Hibiscus sabdariffa* leaves in hyperlipidemic Indias: a double blind, placebo controlled trial. Division of Nutrition, St. John's Research Institute. doi:10.1186/1472-6882-10-27

Lebovka NI, Praporscic I, Ghnimi S, Vorobiev E. 2005. Temperature enhanced electroporation under the pulsed electric field treatment of food tissue. *Journal of Food Engineering.* 69(2):177–184. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.08.037.

Lee J, Durst R, Wrolstad R. 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.* 1(5). PMID:16385975. 10p.

Lucey JA, Singh H. 1997. Formation and physical properties of acid milk gels: A review. *Food Research International.* 30(7):529–542. doi:10.1016/S0963-9969(98)00015-5.

- Luengo E, Condón-Abanto S, Álvarez I, Raso J. 2014. Effect of pulsed electric field treatments on permeabilization and extraction of pigments from *Chlorella vulgaris*. *J Membr Biol.* 247(12):1269–1277. eng. doi:10.1007/s00232-014-9688-2.
- Marchiani R, Bertolino M, Belviso S, Giordano M, Ghirardello D, Torri L, Piochi M, Zeppa G. 2016. Yogurt enrichment with grape pomace: effect of grape cultivar on physicochemical, microbiological and sensory properties. *J Food Qual.* 39(2):77–89. doi:10.1111/jfq.12181.
- Mateus N, Freitas V de. 2009. Anthocyanins as food colorants. In: Winefield C, Davies K, Gould K, editors. *Anthocyanins*. New York, NY: Springer New York. p. 284–304.
- Molina CV, Lima JG, Moraes ICF, Pinho SC. 2018. Physicochemical characterization and sensory evaluation of yogurts incorporated with beta-carotene-loaded solid lipid microparticles stabilized with hydrolyzed soy protein isolate. *Food Science Biotechnology.* 21:351. doi:10.1007/s10068-018-0425-y.
- Nagy B, Simándi B. 2008. Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. *The Journal of Supercritical Fluids.* 46(3):293–298. doi:10.1016/j.supflu.2008.04.009.
- Pathare PB, Opara UL, Al-Said FA-J. 2013. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocessing and Technology Journal.* 6(1):36–60. doi:10.1007/s11947-012-0867-9.
- Puértolas E, Cregenzán O, Luengo E, Alvarez I, Raso J. 2013. Pulsed-electric-field-assisted extraction of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food Chemistry.* 136(3-4):1330–1336. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.080.
- Raso J, Heinz V, editors. 2006. *Pulsed electric fields technology for the food industry: Fundamentals and applications*. New York: Springer. XIV, 245 str. (Food engineering series). ISBN: 978-0387-31053-4.
- Robles M, Robles R, Camarillo-Cadena M, Hernández-Arana A, Welti-Chanes J, Hernández-Sánchez H. 2012. Efecto de los Campos Eléctricos Pulsantes sobre la estructura de la A-Lacto albumina bovina. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11(3):373-382.
- Rodrigues M. 2015. Experimental design and process optimization. *Canada Journal Chemistry Engineer.* 94(2):402. doi:10.1002/cjce.22379.
- Rodriguez-Amaya DB. 2015. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science.* 7:20–26. doi:10.1016/j.cofs.2015.08.004.
- Sánchez-Bravo P, Zapata P, Martínez-Esplá A, Carbonell-Barrachina Á, Sendra E. 2018. Antioxidant and anthocyanin content in fermented milks with sweet cherry is affected by the starter culture and the ripening stage of the cherry. *Beverages.* 4(3):57. doi:10.3390/beverages4030057.

Sari F, Velioglu YS. 2011. Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. *Journal of Food Composition and Analysis*. 24(8):1130–1135. doi:10.1016/j.jfca.2011.04.003.

Sáyago S, Goñi I. 2010. *Hibiscus sabdariffa* L: Antioxidant fiber source. Complutense University of Madrid España. doi:10.1007/978-981-10-2612-6..

Smith DM. 2010. Protein separation and characterization procedures. In: Nielsen SS, editor. *Food Analysis*. Boston, MA: Springer US. p. 261–281 (Food Science Texts Series).

Sotomayor Carrasco MF, Vargas Arroyo DA. 2017. Optimización de extracción, microencapsulación y evaluación de la capacidad antioxidante de antocianinas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) mediante secado por aspersion [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 44 p.

Sui X. 2017. Impact of food processing on anthocyanins. Singapore: Springer Singapore. 147 p. ISBN: 978-981-10-2611-9.

Villacrés Brazales AS, Casas Murillo DE. 2015. Efectos de pretratamientos en la actividad de polifenol oxidasa extraída de manzana (*Malus domestica*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano-Honduras. 38 p.

Vorobiev E, Lebovka N. 2016. Selective extraction of molecules from bioaterials by pulsed electric field tratment. Integral laboratory of sustainable matter. doi:10.1007/978-3-319-26779-1_163-1

Wallace TC, Giusti MM. 2008. Determination of color, pigment, and phenolic stability in yogurt systems colored with nonacylated anthocyanins from *Berberis boliviana* L. as compared to other natural/synthetic colorants. *Journal Food Science*. 73(4):C241-8. eng. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00706.x.

Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2006. Dairy science and technology. 2nd ed. Boca Raton: CRC/Taylor & Francis. 782 p. ISBN: 0-8247-2763-0.

7. ANEXOS

Anexo 1. Valor de F calculado ($P < 0.10$) para la concentración de antocianinas.

Fuente de Variación	SQ	GL	Q	F calculado	F tabular
Regresión linear	140395.63	9	15599.51		
Residual	61804.64	10	6180.46	2.524	2.416
Total Corregido	202200.28	19			

Anexo 2. Sintaxis de SAS® 9.4 para análisis físico-químicos.

```
DATA YOGURT;
INPUT Tratamiento $ Rep pH Purga L Cromo Hue;
DATALINES;
YOGURT_CONTROL 1 4.55 33.83 66.02 9.56 41.93
YOGURT_CONTROL 2 4.51 30.97 65.90 9.64 42.50
YOGURT_CONTROL 3 4.51 29.76 66.06 9.23 40.08
YOGURT_bajo 1 4.31 36.12 67.22 9.72 4.19
YOGURT_bajo 2 4.29 35.96 67.11 10.99 3.21
YOGURT_bajo 3 4.30 37.43 67.02 10.99 2.59
YOGURT_alto 1 4.20 43.38 59.20 14.89 4.88
YOGURT_alto 2 4.21 41.81 59.05 14.98 5.48
YOGURT_alto 3 4.19 41.01 59.23 14.75 4.53
;
PROC GLM;
CLASS Tratamiento Rep;
MODEL pH Purga L Cromo Hue= Tratamiento Rep;
MEANS Rep Tratamiento/duncan;
PROC GLM;
PROC GLM CLOSE;
run;
```

Anexo 3. Sintaxis SAS® 9.4 para análisis sensorial.

```

DATA SENSORIALYOGURT;
INPUT Tratamiento $      Rep  Panelista  Sabor Apariencia Aroma Acidez Color
Consistencia  Aceptacion_general;
DATALINES;
Control 1 1 8 9 9 9 9 9 9
Control 1 2 8 7 7 9 8 7 7
Control 1 3 4 6 7 6 8 8 6
Control 1 4 8 7 7 8 7 7 7
Control 1 5 7 7 6 8 8 6 7
Control 1 6 2 9 6 5 5 4 5
Control 1 7 7 7 6 5 7 6 7
Control 1 8 8 8 8 8 9 8 8
Control 1 9 6 7 6 5 6 6 6
Control 1 10 8 7 8 7 8 7 8
Control 1 11 7 7 7 7 7 8 8
Control 1 12 6 7 6 4 5 5 6
Control 1 13 7 8 8 6 9 7 7
Control 1 14 7 8 7 7 8 7 8
Control 1 15 7 6 7 7 6 7 7
Control 1 16 6 7 8 8 9 6 6
Control 1 17 4 5 5 6 6 7 6
Control 1 18 8 8 8 7 9 7 8
Control 1 19 6 7 7 7 7 7 7
Control 1 20 6 7 6 7 8 8 7
Control 1 21 8 8 7 7 8 8 8
Control 1 22 8 7 8 7 6 8 7
Control 1 23 8 8 8 8 8 8 8
Control 1 24 9 9 9 8 9 7 9
Control 1 25 7 7 7 8 6 6 7
Control 1 26 7 8 8 6 8 6 8
Control 1 27 8 7 6 9 6 8 7
Control 1 28 7 7 6 9 7 7 7

alto_antocianinas 3 16 9 8 7 9 8 9 9
alto_antocianinas 3 17 8 8 5 6 8 7 8
alto_antocianinas 3 18 8 8 8 8 6 8 7
alto_antocianinas 3 19 9 8 6 3 8 7 8
alto_antocianinas 3 20 7 6 7 7 8 6 8
alto_antocianinas 3 21 7 8 7 8 8 9 9
alto_antocianinas 3 22 5 8 8 6 9 9 9
alto_antocianinas 3 23 8 7 7 9 7 5 8
alto_antocianinas 3 24 8 8 3 8 8 9 6
alto_antocianinas 3 25 6 7 5 9 7 8 9
alto_antocianinas 3 26 9 8 7 6 7 8 8
alto_antocianinas 3 27 8 5 7 9 6 8 8
alto_antocianinas 3 28 8 7 6 7 7 8 9
alto_antocianinas 3 29 8 8 9 9 7 8 8
alto_antocianinas 3 30 5 7 7 8 7 7 7
alto_antocianinas 3 31 8 4 7 8 4 5 6
alto_antocianinas 3 32 9 6 6 9 8 9 7
alto_antocianinas 3 33 5 4 4 7 4 8 8
alto_antocianinas 3 34 9 7 7 7 5 7 6
;
PROC GLM;
CLASS Tratamiento Rep Panelista;
MODEL Sabor Apariencia Aroma Acidez Color Consistencia
Aceptacion_general= Tratamiento Rep Panelista;
MEANS Tratamiento/duncan;
PROC GLM;
PROC GLM CLOSE;
run;

```

Anexo 4. Sintaxis SAS® 9.4 correlación de variables.

```

DATA Antocianinas;
INPUT L a b crom a hue Sineresis pH Sabor Apariencia Aroma
Acidez Color Consistencia Aceptacion;
DATALINES;
66.02 8.08 -5.11 9.56 -41.93 33.83 4.55 6.85 7.24 7.09 7.09 7.36
7.00 7.15
65.90 8.13 -5.19 9.64 -42.50 30.97 4.51 6.73 6.42 6.61 6.85 6.64
6.64 6.91
66.06 7.88 -4.81 9.23 -40.08 29.76 4.51 6.68 6.71 6.65 6.76 6.82
6.85 7.03
67.22 9.69 0.71 9.72 4.19 36.12 4.31 6.94 6.61 6.73 6.88 6.36 6.85
6.82
67.11 10.97 0.61 10.99 3.21 35.96 4.29 7.00 6.58 7.03 7.03 6.06 7.27
6.97
67.02 10.98 0.50 10.99 2.59 37.43 4.3 7.12 6.62 6.91 7.03 6.03 6.76
6.85
59.20 14.84 -1.26 14.89 -4.88 43.38 4.2 7.21 7.00 7.06 7.39 7.24 7.48
7.52
59.05 14.91 -1.42 14.98 -5.48 41.81 4.21 7.58 7.42 7.33 7.24 7.73 7.55
7.70
59.23 14.70 -1.16 14.75 -4.53 41.01 4.19 7.53 7.00 6.79 7.35 7.12 7.65
7.68
;
PROC CORR;
VAR L a b crom a hue Sineresis pH Sabor Apariencia Aroma
Acidez Color Consistencia Aceptacion;
RUN;

```

Anexo 5. Análisis sensorial en parámetros de sabor, acidez, consistencia y aroma en yogur de mora.

Tratamientos	Sabor	Acidez	Consistencia	Aroma
	Media ± D.E. ¹	Media ± D.E.	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control + CA ²	6.75 ± 1.50 ^b	6.90 ± 1.71 ^a	6.83 ± 1.58 ^b	6.78 ± 1.49 ^a
1 ml antocianinas	7.02 ± 1.69 ^b	6.98 ± 1.58 ^a	6.96 ± 1.38 ^b	6.89 ± 1.30 ^a
1.5 ml antocianinas	7.44 ± 1.37 ^a	7.33 ± 1.48 ^a	7.56 ± 1.19 ^a	7.06 ± 1.45 ^a
C.V.³ (%)	21.24	22.22	19.49	19.84

^{ab} tratamientos seguidos de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05)

¹Desviación estándar, ²Colorante Artificial, ³Coefficiente de variación.

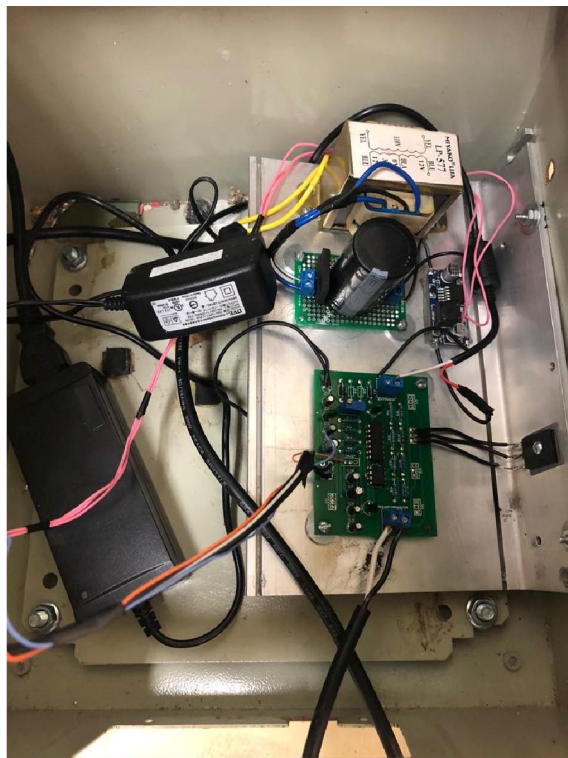
Anexo 6. Análisis sensorial en parámetros de color, apariencia y aceptación general

Tratamientos	Color	Apariencia	Aceptación General
	Media ± D.E. ¹	Media ± D.E.	Media ± D.E.
Control + CA ²	6.94 ± 1.84 ^a	6.79 ± 1.74 ^{ab}	7.03 ± 1.40 ^b
1 ml antocianinas	6.15 ± 1.90 ^b	6.60 ± 1.63 ^b	6.88 ± 1.44 ^b
1.5 ml antocianinas	7.36 ± 1.36 ^a	7.14 ± 1.48 ^a	7.63 ± 1.09 ^a
C.V.³ (%)	25.44	23.84	18.39

^{ab} tratamientos seguidos de diferente letra en cada columna son significativamente diferentes (P < 0.05)

¹Desviación estándar, ²Colorante Artificial, ³Coefficiente de variación.

Anexo 7. Circuito máquina generadora de Campos Eléctricos Pulsantes (CEP).



Anexo 8. Concentración de antocianinas por roto evaporador.



Anexo 9. Cuantificación de antocianinas por métodos de pH diferencial.



Anexo 10. Muestras preliminares de yogur de mora con extracto del subproducto de flor de Jamaica.



Anexo 11. Tratamientos del análisis sensorial.



Anexo 12. Correlación de datos físico-químicos y sensoriales.

	L*	a*	b*	Croma	Hue	Sinéresis	pH	Sabor	Apariencia	Aroma	Acidez	Color	Consistencia
L*	1.0000	-0.8691	-0.0571	-0.9391	-0.2154	-0.7832	0.6410	-0.8076	-0.6834	-0.4487	-0.8435	-0.7565	-0.8514
a*	0.0023	1.0000	0.8840	0.0002	0.5777	0.0125	0.0628	0.0085	0.0424	0.2257	0.0043	0.0183	0.0036
b*	1.0000	0.1464	0.5264	0.9831	0.6537	0.9575	-0.9250	0.9368	0.5229	0.5544	0.8880	0.4113	0.8810
Croma	0.3631	0.9871	0.0562	<0.0001*	0.9871	0.59830	0.0004	0.0002	0.1486	0.1213	0.0014	0.2714	0.0017
Hue	0.3383	0.9871	0.0562	0.3631	0.9871	0.59830	-0.7982	0.5041	-0.1198	0.2551	0.3082	-0.4400	0.3175
Sinéresis	1.0000	0.3383	0.3631	1.0000	0.1663	0.0004	0.0044	0.0005	0.0895	0.1204	0.0007	0.1308	0.0010
pH	0.7121	-0.8824	0.0016	0.0728	0.9931	0.3872	0.2406	0.4236	0.3758	0.8152	0.3190	0.0077	0.0077
Sabor	0.0314	0.0016	0.0728	0.9931	0.3872	0.2406	0.9120	0.0006	0.0006	0.0006	-0.7256	-0.0815	-0.7445
Apariencia	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
Aroma	0.5042	0.9215	-0.8419	0.9189	0.5972	0.5555	0.9100	0.54301	0.8970	0.8970	0.8970	0.8970	0.8970
Acidez	0.1663	0.0004	0.0044	0.0005	0.0895	0.1204	0.0007	0.1308	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010	0.0010
Color	0.7121	-0.8824	0.0016	0.0728	0.9931	0.3872	0.2406	0.4236	0.3758	0.8152	0.3190	0.0077	0.0077
Consistencia	0.0314	0.0016	0.0728	0.9931	0.3872	0.2406	0.9120	0.0006	0.0006	0.0006	-0.7256	-0.0815	-0.7445