

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA
**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**TÉCNICA DE ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
ANTOCIANINAS EN MATERIAS PRIMAS DE LA REGIÓN DE
AYACUCHO**

**Tesis de pregrado para optar el Título Profesional de
Ingeniero Agroindustrial**

Presentado por

Henry MARTINEZ RIVERA

**AYACUCHO – PERÚ
2015**

A Dios,
que con su amor infinito
me regala tanto en esta vida.

*A mis padres Máximo y Felicitas,
por su apoyo y sustento permanente.*

*A mis hermanos: Lider, Malini y Zenobio
por impulsarme y estar pendiente de mí.*

*A mi cuñado Juan Carlos,
por su cariño y su sustento sincero.*

*A mi novia Angélica Lisbet,
por su amor y apoyo continuo.*

*A la Ingeniera Gloria Taype,
por su apoyo y por ser como una madre para mí.*

AGRADECIMIENTOS

Parte del desarrollo experimental del presente trabajo de tesis, requiere mi más sincero reconocimiento y agradecimiento al *Laboratorio de Transferencia de Masa y Laboratorio de Investigación* de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, expresados en las personas del Mag. Alfredo Arias Jara, Ing. Gabriel Cerrón Leandro y demás profesores y amigos de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga – Ayacucho.

Igualmente expreso mi sincero reconocimiento y agradecimiento a mi *Alma Máter*, forjadora de mi formación profesional, que es la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a través de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia y de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Agroindustrial, que ha posibilitado la oportunidad de proseguir y culminar con mis estudios y concluir con la presente investigación.

Mis sinceros reconocimientos a la mística profesional y permanente apoyo de mi asesor **Mag. Alfredo Arias Jara**, por depositar su confianza en mí, por sus consejos, su paciencia, por darme ánimos y serenidad cuando era necesario, y por su valiosa amistad.

A mi familia por el amor que a diario me brindan, por apoyarme incondicionalmente por ser fuente de mis alegrías y por impulsarme a seguir adelante. Y a todos mis amigos que participaron directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo, por las risas compartidas, por sus sugerencias, por alentarme en todo momento, por acompañarme en los momentos de tensión y también de calma, y sobre todo por formar parte de mi vida.

H. Martínez R.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

SIMBOLOGÍA

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE ANEXOS

CAPÍTULO I

PLANEAMIENTO DEL PROYECTO

1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1.1	Descripción del contexto	1
1.1.2	Delimitación del problema	3
1.1.3	Formulación del problema	3
1.2	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	4
1.3	OBJETIVOS	5
1.4	ANTECEDENTES	5
1.5	HIPÓTESIS	8
1.6	VARIABLES	9
1.7	ASPECTOS METODOLÓGICOS	9
1.8	MATRIZ DE CONSISTENCIA	12

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1	ANTOCIANINAS	13
2.1.1	Generalidades	13
2.1.2	Estructura Química	14
2.1.3	Biosíntesis	16
2.1.4	Distribución en la naturaleza	17
2.1.5	Propiedades biológicas	17
2.1.6	Factores que afectan su estabilidad	18

2.2	RADICALES LIBRES	26
2.2.1	Producción de radiales libres de oxígeno	26
2.2.2	Reactividad de los radiales libres y estrés oxidativo	27
2.2.3	Daño molecular inducido por radicales libres	28
2.3	ANTIOXIDANTES	28
2.3.1	Niveles de la acción antioxidante	28
2.4	ESPECTROFOTOMETRÍA	29
2.4.1	Ley de LAMBERT	30
2.4.2	Ley de BEER	30
2.5	MATERIAS PRIMA CON CONTENIDO DE ANTOCIANINAS	36
2.6	EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS	37
2.6.1	Análisis de antocianinas por espectrofotometría UV-Vis	38
2.6.2	Cuantificación del total de antocianinas mediante el método de pH diferencial	39

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

3.1	MÉTODO	41
3.1.1	Evolución en materias prima de la región de Ayacucho	41
3.1.2	Determinación de la humedad	43
3.1.3	Preparación del extracto	44
3.1.4	Los reactivos	45
3.1.5	Manejo del espectrofotómetro GENESYS 6	45
3.1.6	Método de pH diferencial	51
3.2	EVALUACIÓN DE LA ABSORBANCIA	52
3.3	MATERIALES E INSTRUMENTOS	53

CAPÍTULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1	PRUEBAS EXPLORATORIAS	54
4.1.1	Pruebas básicas de evaluación espectrofotométrica	55
4.1.2	Regulación de concentración de antocianina	56
4.1.3	Evaluación espectrofotométrica en función de pH	57

4.1.4	Evaluación del rango de absorbancia y factor de dilución	59
4.1.5	Evaluación espectrofotométrica de la muestra patrón	60
4.2	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN MUESTRAS	60
4.2.1	Preparación de la muestra	61
4.2.2	Temperatura de extracción del analito	65
4.2.3	Extracción con agua	68
4.2.4	Extracción con solución etanólica	69
4.2.5	Reproducibilidad de los resultados	70
4.3	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO POR pH DIFERENCIAL	71
4.4	EVALUACIÓN DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES DE LA REGIÓN	74
4.4.1	En la cáscara de la uva negra	74
4.4.2	En la parte externa de la Fresa	77
4.4.3	En la cáscara de la Ciruela	79
4.4.4	Mora	81
4.4.5	Papa nativa (médula interna)	83
4.4.6	Papa nativa (epidermis)	85
4.4.7	Epidermis del Camote morado	87
4.4.8	Maíz morado (cutícula del grano)	90

CAPÍTULO V

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1	PRUEBAS EXPLORATORIAS	93
5.2	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN MUESTRAS	95
5.3	ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO POR pH DIFERENCIAL	97
5.4	EVALUACIÓN DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES DE LA REGIÓN DE AYACUCHO.	98
5.5	PROPUESTA DEFINITIVA DEL MÉTODO DE pH DIFERENCIAL	100
5.6	ANÁLISIS Y CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	105

CONCLUSIONES	112
RECOMENDACIONES	114
BIBLIOGRAFÍA	115
Textos y revistas especializadas	115
Páginas de internet	116
	117
ANEXO	118

RESUMEN

Esta investigación se enmarca en la determinación de la técnica de análisis espectrofotométrica del contenido de antocianinas en materias primas de la región de Ayacucho. Se inició el estudio con el diagnóstico regional de materias primas de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas. Luego se estandarizó la técnica de análisis espectrofotométrica para diferentes tipos de muestras a fin de realizar la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas a través del método espectrofotométrico de pH diferencial y posteriormente aplicar en la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias primas identificadas en el diagnóstico regional. Por lo tanto, las actividades específicas de este trabajo son:

1. Realizar el diagnóstico regional de materias primas de interés agroindustrial con contenido potencial de antocianinas.
2. Estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica de pH diferencial en las diferentes muestras para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.
3. Valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias primas identificadas en el diagnóstico regional.

La identificación de antocianina se determinó por el **método diferencia de pH** conocido como espectrofotometría por pH diferencial, que es un método espectrofotométrico rápido y sencillo basado en la antocianina estructural, en la transformación que se produce con un cambio en el pH.

La preparación de la muestra para el análisis espectrofotométrico se fundamenta en la extracción de antocianina de la muestra, para lo cual se realizó colocando 5 g de la muestra (%H conocida) con 200 mL de solución etanólica al 80 %, acidificado con HCl (pH = 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos y luego se filtró, recolectando con cuidado el extracto. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución

etanólica a la misma temperatura y por el mismo tiempo, seguidamente se filtra y colecta el extracto. Los filtrados o extractos fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL, enrasándose al volumen de la fiola utilizando la solución etanólica.

Para la evaluación espectrofotométrica se utilizó **dos sistemas tampón**: ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y ácido clorhídrico/acetato de sodio de pH 4,5 (0,4 M). Luego, se toma una muestra o alícuota del extracto y se diluye apropiadamente (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm); por decir, para 1 mL de una muestra o extracto se añade 24 mL de la correspondiente solución tampón (que sería un factor de dilución de 25) y se mide la absorbancia en un Espectrofotómetro Genesys 6, frente a un blanco a 520 y 700 nm.

El factor de dilución no necesariamente debe ser 25, generalmente depende de la tonalidad o concentración del extracto en el volumen inicial normalizado, el criterio de dilución debe ser tal que al leer la absorbancia a 520 nm los valores estén dentro del rango establecido (0,2 a 1,4); se recomienda utilizar como factor de dilución referente: 2, 5, 9, 15, 20, 25, 30 y 34. Luego, se determinó el contenido de antocianinas según el método de pH diferencial, de acuerdo a **Giusti-Wrosstad** (2001).

La determinación del contenido de antocianinas en la coronta de maíz morado, cutícula del grano del maíz morado, en la cáscara de la uva negra, en la parte externa de la fresa, cáscara de ciruela, mora, en la epidermis de las papas nativas, en la medula interna de las papas nativas y en la epidermis del camote evaluadas reportan un contenido de 34,67; 31,29; 13,31; 3,90; 8,85; 21,34; 0,347; 0,311 y 0,975 mg/g de antocianina respectivamente (expresados por g de materia en base seca).

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas pertenecen a un gran y muy distribuido grupo de metabolitos secundarios que se conocen colectivamente como flavonoides. Las antocianinas naturales más comunes son las 3-O-glicósidos y las 3,5-di-O-glicósidos.

Las antocianinas son los responsables del color rojo, púrpura y azul; tonalidades presentes en frutas, verduras y granos. Hay 6 antocianinas comunes (pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina), cuyas estructuras pueden variar por sustitución glucosídico en las posiciones 3 y 5. Las variaciones adicionales se producen por acilación de los grupos de azúcar con ácidos orgánicos.

El interés por las antocianinas se ha incrementado debido a su potencial uso como colorantes naturales y por sus potenciales beneficiosas en la salud; últimamente, la seguridad de los pigmentos sintéticos ha sido cuestionada, conduciendo a la reducción en el número de colorantes permitidos. Las antocianinas son pigmentos solubles en agua, lo que facilita su incorporación en los sistemas acuosos alimentarios. Estas cualidades hacen que estos colorantes naturales sean atractivos como pigmentos naturales inocuos con considerable potencial en la industria de los productos con un rango de pH ácido. Además de su color se ha reportado que las antocianinas tienen beneficios para la salud como potentes antioxidantes y pueden incrementar la agudeza visual.

En el Perú existen muchas especies que contiene antocianina, una de sus regiones que producen este tipo de especies es Ayacucho, en el cual podemos mencionar al maíz morado, uva, higo, fresa, etc. La presente investigación es determinar y precisar de manera explícita la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas, la cual puede ser aplicada a diversos materiales o especies de la región que reporten un contenido potencial de antocianinas.

SIMBOLOGÍA

Notación alfabética:

$\% H$	Porcentaje de humedad
$\% AT_{mx}$	Porcentaje de antocianina total en base seca
A	Absorbancia
A_m	Absorbancia monomérica
AT_{mx}	Antocianina total en base seca
F_D	Factor de dilución
m_x	Peso de la muestra en base seca
m_{Hr}	Peso de la muestra húmeda requerida para el análisis.
PM	Peso molecular
l	longitud de paso de celda en cm
V_{in}	Extracto del volumen inicial normalizado

Notación griega:

ϵ	coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido(26900)
------------	--

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Pág.
Figura N° 2.1 Estructura más común de la antocianidina glucosilada.	13
Figura N° 2.2 Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.	15
Figura N° 2.3 Biosíntesis de la cianidina.	16
Figura N° 2.4 Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH.	19
Figura N° 2.5 Interacciones de antocianinas.	22
Figura N° 2.6 Formación de complejo a través de interacción intermolecular.	22
Figura N° 2.7 Copigmentación como efecto hiperocrómico y desplazamiento batocrómico.	24
Figura N° 2.8 Espectro de absorción de los compuestos diferentes.	29
Figura N° 2.9 Ley de Lambert	30
Figura N° 2.10 Ley de Beer	31
Figura N° 2.11 Curva Espectral	34
Figura N° 2.12 Curva de calibración.	34
Figura N° 2.13 Interpolación gráfica.	35
Figura N° 2.14 Espectros UV-Vis de las antocianinas aciladas y 3,5-glucosiladas (línea continua).	39
Figura N° 4.1 Curvas de absorbancia del extracto de antocianina (0,50 g/250 mL) en agua destilada sin modificación de pH.	55
Figura N° 4.2 Curvas de absorbancia para extracto (0,25 g/ 250 mL) de concentrado de antocianina sin modificación de pH.	57
Figura N° 4.3 Curvas de absorbancia del extracto en agua destilada y en medios ácidos con modificación de pH	58
Figura N° 4.4 Curvas de absorción en agua destilada y medios ácidos para una dilución 1:24	59
Figura N° 4.5 Curvas de absorción del concentrado proporcionado por <i>Globe Natural</i>	60
Figura N° 4.6 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, extracto obtenido a una T= 20 °C y	

t= 2 horas.	66
Figura N°4.7 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, muestra obtenido a una T= 60 °C y t= 2 horas	67
Figura N° 4.8 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, muestra obtenido a ebullición y t= 7 a 8 min, en dos etapas	68
Figura N° 4.9 Absorbancia para muestra extraída solamente con agua destilada.	69
Figura N° 4.10 Absorbancia en el análisis de muestras sólidas extraídas con solución etanólica al 80 %.	70
Figura N° 4.11 Absorbancia en el análisis de muestras de coronta de maíz morada.	72
Figura N° 4.12 Curva de absorbancia en la evaluación de la concentración de antocianina en la cáscara de la uva.	76
Figura N° 4.13 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la parte externa de la fresa	78
Figura N° 4.14 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la cáscara de la ciruela.	80
Figura N° 4.15 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la mora	82
Figura N° 4.16 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la papa (médula interna)	85
Figura N° 4.17 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la papa (epidermis)	87
Figura N° 4.18 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la epidermis del camote	89
Figura N° 4.19 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en maíz morado (cutícula del grano)	91

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla N° 2.1	Color y distribución de las principales antocianidinas en algunas materias prima.	36
Tabla N° 2.2	Contenido de antocianinas totales en materias prima comunes.	37
Tabla N° 3.1	Ayacucho: producción agrícola, según principales cultivos, 2008 – 2013 (Toneladas).	42
Tabla N° 3.2	Algunos cultivos agrícolas seleccionados por poseer características potenciales de antocianina.	43
Tabla N° 4.1	Proporción de dilución extracto: agua destilada, para un extracto de 0,50 g/250 mL.	55
Tabla N° 4.2	Proporción de dilución extracto: agua destilada, para un extracto de 0,25 g/250 mL.	56
Tabla N° 4.3	Alícuotas de extracto en agua destilada y en medios ácidos con solución buffer	58
Tabla N° 4.4	valores promedios obtenidos del mismo tipo de muestra con las mismas condiciones y parámetros.	71
Tabla N° 4.5	Resumen de la evaluación de productos agroindustriales de la región de Ayacucho.	92
Tabla N° 5.1	Resumen de los resultados obtenidos del análisis del contenido de antocianinas en las materias prima de la región.	98
Tabla N° 5.2	Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en la presente investigación con resultados obtenidos en la revisión bibliográfica.	111

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
A-01 Curva de la regulación de concentración de la antocianina sin modificación de pH.	117

CAPÍTULO I

PLANEAMIENTO DEL PROYECTO

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1 Descripción del contexto

Uno de los principales retos en la industria de colorantes naturales es que muchos fabricantes todavía no se enfrentan al reemplazo de los artificiales, principalmente por los mitos que existen en cuanto a su utilización y los costos de producción.

Los consumidores buscan etiquetas limpias, sin aditivos, es decir productos que se consideren naturales. Esta tendencia ha incentivado a que los fabricantes de alimentos busquen reemplazar los colorantes sintéticos por naturales, lo cual representa un reto para los fabricantes de colores naturales, quienes vienen demostrando que no es imposible lograr formulaciones estables para distintas aplicaciones. Con esta tendencia hacia el consumo de productos más naturales y saludables, especialmente en alimentos para niños, el uso de colorantes naturales podría convertirse en una herramienta de marketing muy poderosa.

La tendencia hacia el consumo de lo natural es cada vez más fuerte y se evidencia cuando los consumidores piden mayor información sobre los ingredientes y aditivos que contienen los productos que consumen. Pero, ¿qué tan consciente es el consumidor sobre el origen de los colorantes que se mencionan en las etiquetas? ¿La demanda por colorantes naturales justifica su uso a pesar de implicar un mayor costo?

Los colores y los sabores pueden diferenciar un producto, a la vez que ayudan a satisfacer la demanda de los consumidores por nuevos atributos¹.

En el año 2009 el mercado global de colorantes alimenticios obtuvo un valor aproximado de unos US\$ 1,45 billones, según "***The Global Market for Good Colours,***" informe mercantil publicado por Leatherhead Food Research en agosto de 2010. Actualmente se consumen entre 40,000 y 50,000 toneladas de colorantes alimenticios mundialmente, y, aunque las condiciones económicas actuales han limitado el crecimiento anual del mercado, el informe predice que a mediados de la década el valor del mercado mundial aumentará a US\$ 1,6 billones, un crecimiento de 10% del valor actual. Se anticipa que el crecimiento futuro del mercado provendrá de los colores naturales y de alimentos que sirven como colorante.

Los alimentos constituyen el 67% del mercado mundial de colorantes alimenticios; seguido por gaseosas con 28% y bebidas alcohólicas con 5%. Europa domina el mercado global con 36% del mercado, seguido por el mercado estadounidense (28%), Japón (10%) y China (8%); el 18% restante proviene de países desarrollados como Canadá y Australia y de nuevos mercados alimenticios como los de India y Brasil.

En una escala menor, los colorantes son sumamente importantes para ciertas divisiones alimenticias, incluyendo la confitería, la repostería y las

¹ <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14761-los-colorantes-naturales-del-momento>

bebidas. El informe “*The Global Market for Good Colours*” afirma que la tartrazina provee el distintivo amarillo de la gaseosa nacional peruana, Inca Kola. Los snacks, los cereales de desayuno, pastas y dulces como mermeladas, también aprovechan las propiedades de los ingredientes colorantes².

El nivel de exportaciones de la antocianina, muestra un crecimiento continuo desde el año 2008 hasta la actualidad, por lo que se infiere que goza de gran potencial y es muy requerida en los mercados por sus beneficios para la salud y de prominente utilidad industrial.

1.1.2 Delimitación del problema

La investigación no presenta una delimitación espacial ni temporal específica; debido a que la investigación y sus resultados no se circunscriben a una topología geográfica exclusiva, porque su evaluación y resultados pueden ser extendidos a cualquier región en las que se requieran aplicar la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas, inclusive no sólo a materias prima, sino a muchas otras líneas y procesos que requieran su análisis en diversas aplicaciones industriales; así como tampoco tiene una delimitación temporal exclusiva que se limite a algún periodo de evaluación, porque la investigación y sus resultados analiza la cantidad existente de antocianinas en diferentes tipos de materias prima, con investigación y experimentación sistematizada, que presente innovaciones tecnológicas que permitan la transferencia tecnológica a nuestra realidad industrial, tanto regional como nacional.

1.1.3 Formulación del problema

En vista a que no se cuenta con una publicación en el cual especifique una técnica adecuada de manera explícita para la determinación cuantitativa de antocianinas presentes en las diversas materias prima de la región de Ayacucho, la cual pueda permitir y facilitar una evaluación

² www.industriaalimenticia.com/articles/83014-tendencias-globales-en-colorantes

cuantitativa al estudiante y al ingeniero para realizar sus estudios de colorantes con presencia de antocianinas a nivel de laboratorio y planta piloto. Ello actualmente es una limitación importante en los métodos tradicionales de solución a estos problemas. Es por ello el interés de que se utilice técnicas, que den mayor confiabilidad y flexibilidad.

Por la gran importancia que tiene la determinación de antocianinas para el proceso de industrialización de colorantes naturales, se propone desarrollar una metodología con el cual se posibilite la determinación cuantitativa de antocianinas para diversas materias prima de la región de Ayacucho que evidencien contenido potencial de antocianinas.

Problema general

- ¿Es posible desarrollar la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho?

Problemas específicos:

- ¿Es viable realizar un diagnóstico regional de materias prima de interés agroindustrial con contenido potencial de antocianinas?
- ¿Es posible estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas?
- ¿Es factible aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias prima identificadas en el diagnóstico regional?

1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presencia de antocianinas en las diversas variedades pigmentadas de frutas y vegetales, hace que éstos sean un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por ello el estudio de

antocianinas ha despertado un interés sin precedente, en vista de esto se hace más sencillo investigar la técnica adecuada, estandarizada y comprobada en la práctica disponiendo la técnica de determinación cuantitativa de antocianinas, que brinda al estudiante y al ingeniero una alternativa de solución práctica en la determinación del contenido de antocianinas. La técnica que se presenta permitirá comprender y facilitar el análisis espectrofotométrico de antocianinas en materias prima con potencial de antocianinas y de interés agroindustrial de la región, constituyendo una herramienta de trabajo versátil para los estudiantes de ingeniería y otros interesados.

1.3 OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.

Objetivos específicos:

- Realizar un diagnóstico regional de materias prima de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas.
- Estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras (sólido, semisólido y líquidos) para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.
- Aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias prima identificadas en el diagnóstico regional.

1.4 ANTECEDENTES

En el ámbito local y regional aún no existen trabajos de investigación o una publicación relacionada a las técnicas de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias prima de la región de

Ayacucho. A continuación se menciona algunos antecedentes bibliográficos relacionados al estudio de antocianinas.

a) Araujo (1995) *Estudio de la extracción del colorante del maíz morado (Zea mays L.) con el uso de enzima.* Para evaluar los principales factores que influyen en la extracción del antocianinas de Maíz Morado (*Zea mays L.*), determina el contenido de estas en el grano y coronta y la relación en peso de cada uno de ellos. En la que determina que el grano representa el 79,21% y la coronta 20,79% en peso del maíz morado. Tomando en cuenta a estos rendimientos se tiene que por cada 100 g de maíz morado entero se obtiene 180,75 mg de antocianina a partir del grano y 699,58 mg a partir de coronta molida, por estos resultados se decidió extraer la antocianina a partir de la coronta. Los parámetros óptimos utilizados fueron: tiempo de maceración 12 horas, temperatura ambiente (20 °C), pH 2 del solvente, relación coronta solvente 1/10. Luego de la maceración realizo una molienda húmeda. En segunda etapa estudia el uso de enzima (complejo enzimático), siendo el complejo enzimático Extrazyme (celulasa, β glucanasa, hemicelulasa, pectinasa y xylanas) que permite aumentar en 24,3% dicha extracción con respecto al método convencional sin uso de enzima. El índice de degradación (ID) de antocianinas nos indica la eficiencia de la aplicación de los parámetros.

b) Fernández (1995) *Estudio extracción y pre-purificación de antocianinas de maíz morado.* En una primera etapa estudia la influencia de los parámetros de maceración de la coronta la combinación de la maceración y calentamiento en el rendimiento de la extracción de las antocianinas. En una segunda etapa estudia la purificación del extracto mediante precipitación con acetato de plomo básico y resinas de intercambio iónico. se obtuvieron buenos resultados mediante la precipitación de acetato de plomo básico a pH 6,0, recuperándose 90% de antocianinas.

- c) **Quispe et al., (2006)** *Extracción del colorante a partir de la coronta de maíz morado por el método de lixiviación.* El maíz morado fueron caracterizados presentado una humedad de 12%, el rendimiento entre la mazorca y la coronta fue de 19,52% para una relación de 5 a 1. Para la evaluación de la lixiviación se caracterizó de la siguiente forma: corontas molidas de grano grueso, mediano y fino, variando la preparación de extracto acuoso acidificado con ácido cítrico, con acidez iónica de 3,2, 3,1 y 3,0; para la temperatura de extracción de 85 °C, 90 °C, y 95 °C se obtuvo como resultado de la lixiviación cuando se usa coronta molida fina en agua acidulada con una acidez iónica de 3,2 a una temperatura de 90 °C en un tiempo de contacto de 70 minutos a volumen constante; con un rendimiento de 9,78% de antocianinas.
- d) **Giusti et al., (2009)** *cuantificación de antocianinas mediante el uso de espectrofotometría con el método de pH diferencial.* El extracto obtenido de los frutos secos congelados de *B. boliviana* Lechler (peso de la muestra = 2,996 g y solución agua/ acetona 30:70 v/v) fue diluida con dos buffers de pH 1,0 y pH 4,5, luego se procedió con la lectura utilizando un espectrofotómetro UV-visible Hewlett Packard 8453; las mediciones fueron realizadas a 520 nm (máxima longitud de onda determinada) y a 700 nm, el contenido de antocianinas monoméricas fue calculado como cianidina-3- glucósido, usando como coeficiente de extensión molar 26900 L/ (cm.mg) y como peso molecular 449,6 g/L. Al final como resultado se obtuvo la concentración de antocianina en peso de 7 g/100 g de fruto seco separado de las semillas de *Berberis boliviana* Lechler.

1.5 HIPÓTESIS

Hipótesis general

Hs

- La técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas permite su aplicación a las materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.

Ho

- La técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas no permite su aplicación a las materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.

Hipótesis específicos:

Hs1

- El diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial permite identificar a las materias prima con contenido potencial de antocianinas.

Ho1

- El diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial no permite identificar a las materias prima con contenido potencial de antocianinas.

Hs2

- La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras posibilita la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Ho2

- La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras no posibilita la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Hs3

- El análisis espectrofotométrico de antocianinas se valora en la evaluación de las materias prima con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.

Ho3

- El análisis espectrofotométrico de antocianinas no se valora en la evaluación de las materias prima con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.

1.6 VARIABLES

1) Independiente

X = Materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.

Indicadores:

X1 = Materias prima de la región con contenido potencial de antocianinas.

X2 = Contenido significativo de antocianinas en las materia prima.

X3 = Posibilidad de industrialización.

2) Dependiente

Y = Técnica de análisis espectrofotométrico de antocianinas.

Indicadores:

Y1 = Instrumento de análisis espectrofotométrico UV/ visible.

Y2 = Muestra patrón de antocianina y curva de calibración.

Y3 = Estandarización y aplicación.

1.7 ASPECTOS METODOLÓGICOS

Tipo y nivel de investigación

Investigación aplicada y de alto grado de correlación basado en los fenómenos de transferencia en ingeniería de procesos, con capacidad predictiva de aplicación.

Busca desarrollar una técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias prima de la región de Ayacucho.

Método empleado

El trabajo está basado sustancialmente en el método experimental, con la revisión y recolección de información sobre actividades tecnológicas vigentes y de vanguardia, en operaciones de determinación y extracción de antocianinas en diferentes tipos de especies con contenido potencial de antocianinas, trabajos experimentales exploratorios e intensivos, evaluaciones experimentales exploratorias y sistematizadas, con evaluación y análisis de resultados, complementado con una interpretación, para fines de modelamiento predictivo, técnicos y de aplicación industrial.

El trabajo utiliza métodos experimentales vinculados al diagnóstico regional de materias prima de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas, luego la estandarización de la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras (sólido, semisólido y líquidos) para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas y finalmente su aplicación para la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias prima identificadas en el diagnóstico regional.

Universo y muestra

Dado que la investigación no es la evaluación de un universo definido, desde la cual se tenga que determinar la muestra representativa que infiera estadísticamente al universo, el trabajo experimental exige la disponibilidad de muestras representativas de especies con contenido potencial de antocianinas, que permitan desarrollar los diversos análisis experimentales para observar los efectos respuesta a la a la técnica planteada, con resultados que manifiesten una repetitividad y confiabilidad experimental.

Técnicas de recolección de datos

Exploración de literatura en general, información y publicaciones relativas al tema.

Experimentación directa en los distintos niveles de evaluación.

Análisis físico químico en las diversas etapas del proceso.

Aplicaciones y mediciones piloto.

Técnicas de análisis de información

Análisis lógico y estadístico de resultados.

Contrastación con los fundamentos y supuestos científicos.

Equipos e Instrumentos

Espectrofotómetro.

Equipo de titulación volumétrica.

Medidores de temperatura.

Balanza analítica.

pH metro.

Centrífuga.

Materiales de vidrio y otros menores.

1.8 MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO DE LA TESIS		TÉCNICA DE ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICA DE ANTOCIANINAS EN MATERIAS PRIMAS DE LA REGIÓN DE AYACUCHO			AUTOR: Henry Martínez Rivera
PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	DISEÑO METODOLÓGICO	
<p>1) Problema principal</p> <p>¿Es posible desarrollar las técnicas de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias primas con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho?</p> <p>2) Problemas secundarios</p> <p>a) ¿Es viable realizar un diagnóstico regional de materias primas de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas?</p> <p>¿Es posible estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas?</p> <p>b) ¿Es factible aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias primas identificadas en el diagnóstico regional?</p>	<p>1) Objetivo general</p> <p>Desarrollar técnicas de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias primas con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.</p> <p>2) Objetivos específicos</p> <p>a) Realizar un diagnóstico regional de materias primas de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas.</p> <p>b) Estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras (sólido, semisólido y líquidos) para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.</p> <p>c) Aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias primas identificadas en el diagnóstico regional.</p>	<p>1) Hipótesis General</p> <p>La técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas permite su aplicación a las materias primas con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.</p> <p>2) Hipótesis específicas</p> <p>a) El diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial permite identificar a las materias primas con contenido potencial de antocianinas.</p> <p>b) La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras posibilita la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.</p> <p>c) El análisis espectrofotométrico de antocianinas se valora en la evaluación de las materias primas con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.</p>	<p>1) Variable independiente e indicadores</p> <p>Variable independiente</p> <p>✓ Materias primas con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Materias primas de la región con contenido potencial de antocianinas Contenido significativo de antocianinas en las materias primas Posibilidad de industrialización <p>2) Variable dependiente</p> <p>Variable dependiente</p> <p>✓ Técnica de análisis espectrofotométrico de antocianinas</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Instrumento de análisis espectrofotométrico UV/visible. Muestra patrón de antocianina y curva de calibración. Estandarización y aplicación. 	<p>Tipo de Investigación Aplicada</p> <p>Nivel de Investigación Experimental y explicativa</p> <p>Método Descriptivo Deductivo Analítico Comparativo</p> <p>Diseño Experimental progresivo por objetivos.</p> <p>Población Materias primas de la región de Ayacucho con contenido potencial de antocianinas.</p> <p>Muestra Muestreo básico por análisis a nivel de laboratorio.</p> <p>Técnicas Análisis documental. Observación. Análisis instrumental (espectrofotometría)</p> <p>Instrumentos Equipos y materiales de laboratorio. Reactivos e insumos químicos. Materiales de escritorio.</p>	

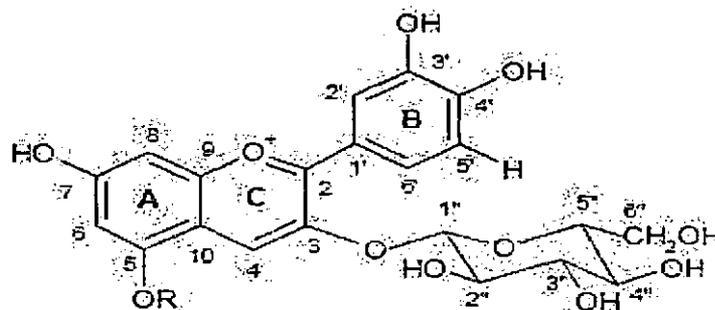
CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTOCIANINAS

2.1.1 Generalidades

La palabra antocianina deriva del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de los frutos o flores, es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano.



Cianidina 3-glucósido, R=H
Cianidina 3,5-glucósido, R=glucosa

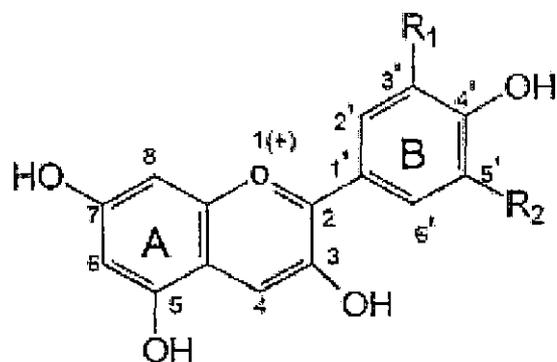
Figura N° 2.1 Estructura más común de la antocianidina glucosilada (*Malacrida C et al.*, 2005).

Las antocianidinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilio, y debido a la poca solubilidad de estas en el agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza sino en su forma glucosilada, siendo una de las más abundantes la cianidina 3-glucósido

2.1.2 Estructura química

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta (*Wang y Xu, 2007; Kalt et al., 2003*) en hojas, flores y frutos. Estos compuestos pertenecen a la familia de los flavonoides. Son glucósidos de antocianidinas, es decir, que están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); ambos unidos por una cadena de tres átomos de carbono (*Aguilera Ortiz et al., 2011*). Variaciones estructurales del anillo B producen las seis antocianidinas conocidas (*Figura N° 2.2*). El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (*Garzón G.2008; Francis L .1978; y Remesy et al., 2006*).

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



Aglicona	Substitución		λ _{máx} (nm)
	R1	R2	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH3	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH3	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura N° 2.2 Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (**Garzón, 2008**).

Dentro de los sacáridos glucosilantes se encuentran la D-glucosa, D-galactosa, D-xilosa, L-ramnosa, D-arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa.

Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sináptico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Se ha demostrado que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura (**Fredes C.2009**).

2.1.3 Biosíntesis

Las antocianinas se sintetizan a partir de la condensación de dos moléculas precursoras (*Figura N° 2.3*): Malonil CoA y p-cumaril-CoA, las que más tarde formaran anillos A y B respectivamente.

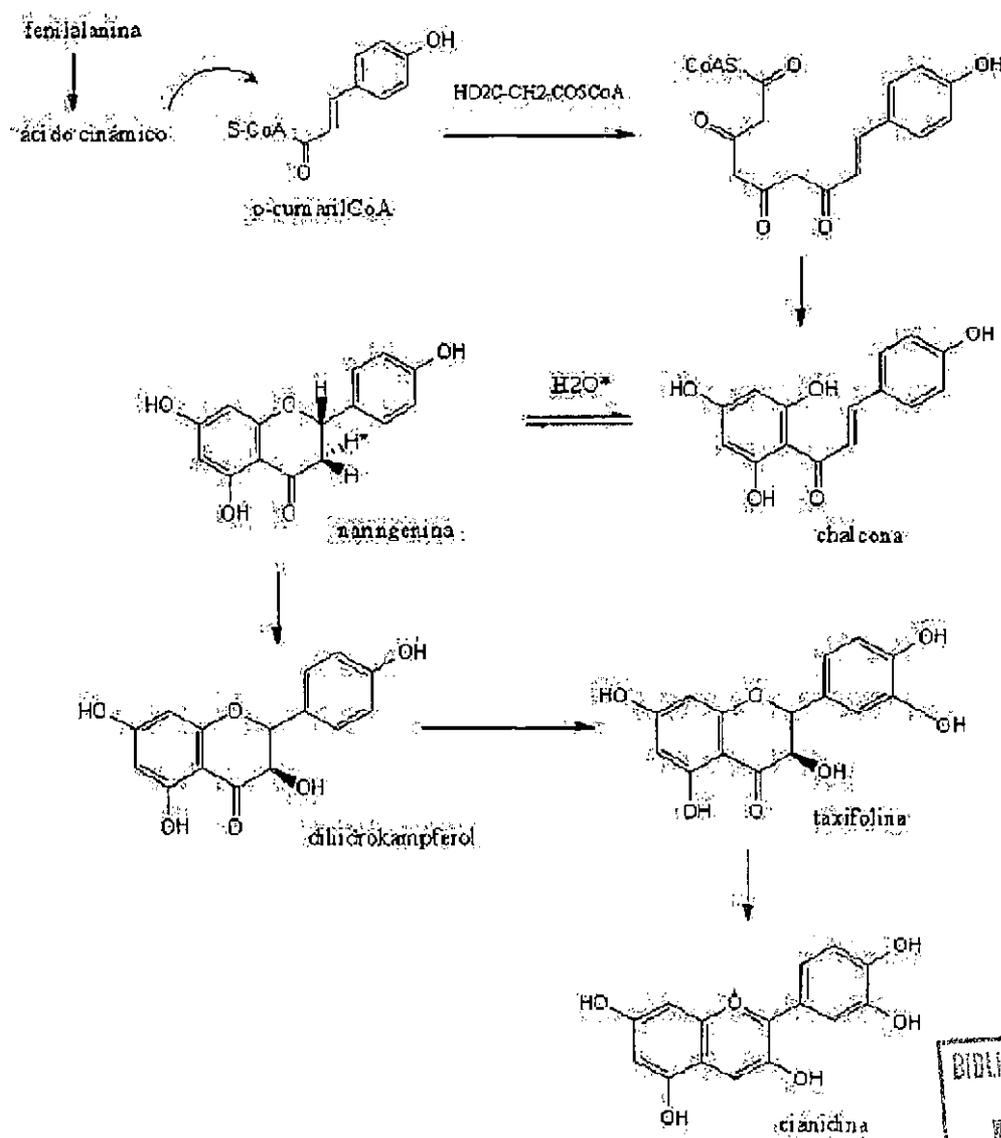


Figura N° 2.3 Biosíntesis de la cianidina (*Gauche C. et al., 2010.*)

Las antocianinas son sintetizadas por varias rutas. Sobresalen dos, la del ácido shikímico y la del ácido malónico. En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y Ciclo de Cálvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, pcoumárico, caféico, ferúlico, clorogénico y fenilalanina. Cabe

resaltar que esta ruta sintética también es compartida por otros compuestos fenólicos. La principal reacción de biosíntesis de los flavonoides es la condensación de los acilos provenientes de cumaril-CoA y tres moléculas de malonil CoA catalizada por la enzima chalcona isomerasa que lleva a cabo la isomerización de chalcona a flavona, la misma que es convertida en flavones o antocianinas. Los pasos finales en la síntesis de antocianinas son las acilaciones y las glucosilaciones, primero en el C-3, para estabilizar el catión flavilio (*Gauche C. et al., 2010*).

2.1.4 Distribución en la naturaleza

Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de las frutas como manzanas, peras, zarzamoras; de flores como la Jamaica y rosas; y verduras como la col morada y maíz morado. La función que cumplen es la de atraer seres vivos para propósitos de polinización y dispersión de semillas. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas. Existen factores adicionales que afectan el color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura, luz, entre otros (*Jiménez M. et al., 2004*).

2.1.5 Propiedades biológicas

Estudios epidemiológicos efectuados en varios países evidencian que el consumo de los frutos y vegetales reducen enfermedades coronarias además de minimizar los riesgos de cáncer. Se ha descrito que algunos compuestos fenólicos de origen vegetal presentan dentro de la célula actividad antioxidante, reduciendo la concentración de radicales libres, y en algunos casos logran establecer grupos de quelación con iones metálicos. Los mecanismos involucrados de los agentes antioxidantes establecen donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en los alimentos pueden reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación. Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se

encuentran las antocianinas debido a la presencia de sustituyentes oxidrilo, las cuales son moléculas con alto poder antioxidante (*Repo R et al.*, 2008).

2.1.6 Factores que afectan su estabilidad

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

2.1.6.1 pH

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad (*Figura N° 2.4*). A pH 1,0 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas (*Figura N°2.4.A*), a valores de pH entre 2,0 y 4,0 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la formas quinodales (*Figura N° 2.4.B. C y D*) de color azul. A pH entre 5,0 y 6,0 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora (*Figura N°2.4.E*), y chalcona, de color amarillo (*Figura N°2.4.F*), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7,0 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (*Moldovan et al.*, 2012; *Castañeda-Ovando et al.*, 2009a; *Garzón*, 2008). A pH entre 4,0 y 6,0, pH característico de las frutas y hortalizas frescas o procesadas, se observa una mezcla en equilibrio de las formas catión flavilio, bases quinodales y carbinol, como así también de la forma chalcona (*Moldovan et al.*, 2012).

Por otra parte, **Bordignon et al.**, (2009) estudiaron la extracción de antocianinas de frutillas en el rango de pH de 1,0 a 13,0 y obtuvieron que la mejor extracción fue al valor más bajo de pH. En el estudio de cinética de degradación de antocianinas presentes en extractos de arándanos agrios (*Viburnum opulus L.*) durante el almacenamiento a los pH 3,0 y 7,0, **Moldovan et al.**, (2012), obtuvieron que la menor degradación se produjo con el valor más bajo de pH.

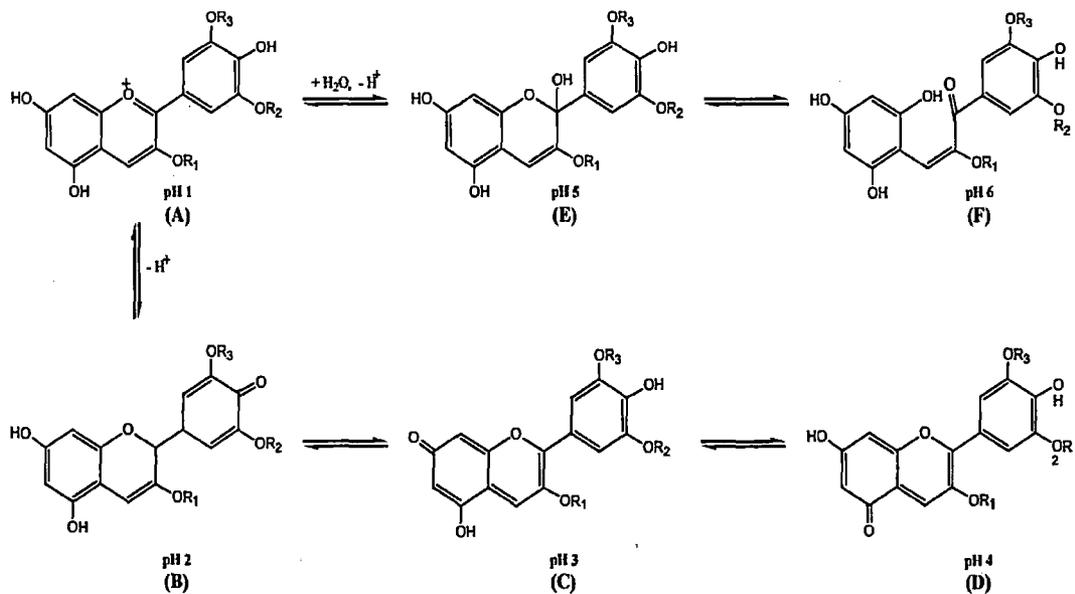


Figura N° 2.4 Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde R1=H o glúcido, R2 y R3= H o metilo (**Castañeda-Ovando et al.**, 2009a).

También **Laleh et al.**, (2006) investigaron sobre la influencia del pH en extractos de antocianinas de 4 especies de berberís, observando que cuanto más bajo fue el pH menor fue el deterioro de las antocianinas.

De acuerdo a estas investigaciones se puede señalar que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. Es por esto que las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en

alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (*Aguilera Ortiz.et al.*, 2011).

2.1.6.2 Temperatura

La temperatura es otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas (*Min-Sheng y Po-Jung*, 2007). Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60 °C) se degradan según una cinética de primer orden. En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosidadas o acetiladas (*Fennema*, 2000). Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la consecuente producción de chalconas incoloras (*Garzón*, 2008).

En términos generales, a temperaturas más elevadas provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas, especialmente durante un tratamiento térmico o el almacenamiento. Sin embargo, puede ser favorable para el proceso de extracción de las antocianinas de diferentes tipos de materias primas, debido a la mayor transferencia de antocianinas desde la matriz que lo contiene hacia el seno de la disolución extractiva.

2.1.6.3 Agua

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora según el mecanismo que se explicó en el apartado 2.1.6.1. Sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación.

Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (**Kopjar y Piližota, 2009; Lewis y Walker, 1995**).

Dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas, resulta conveniente su eliminación para disminuir las probabilidades de ataque nucleofílico al catión flavilio.

2.1.6.4 Copigmentación

La copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de la estructura del catión flavilio in vivo (**Sari et al., 2012; Kopjar et al., 2011; Gradinaru et al., 2003**). Las formas coloreadas de las antocianinas pueden estabilizarse por interacción con componentes, llamados copigmentos, que existen en las células de las flores, frutas y berries (**Rein, 2005**). Los copigmentos pueden ser flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos y grupos acilo aromáticos, entre otros (**Sari et al., 2012; Lewis y Walker, 1995**).

La copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido (**Mazza, 1995**) y puede ocurrir a través de una serie de interacciones. Los mecanismos más importantes son las: copigmentación intermolecular, copigmentación intramolecular, autoasociación y formación de complejos de metales (**Figura N° 2.5**).

En la copigmentación intermolecular se sugiere que las antocianinas y los copigmentos, que pueden ser flavonoides incoloros y otros compuestos fenólicos, interactúan a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas débiles, formando complejos. Este tipo de copigmentación puede producirse tanto con el catión de flavilio como con las formas de

base quinonoidal de la antocianina. Dado que estas dos formas de equilibrio de las antocianinas son casi planas y con electrones π deslocalizados, las interacciones de estas con copigmentos, que tengan características estructurales similares, son mucho más fáciles y probables (*Rein, 2005*).

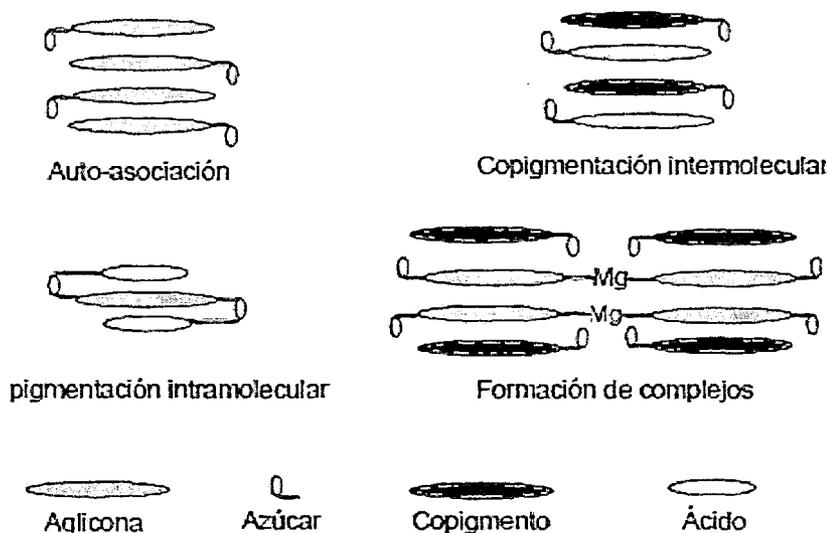


Figura N° 2.5 Interacciones de antocianinas (*Rein, 2005*).

La disposición solapada de las dos moléculas (antocianina y copigmento) (*Figura N° 2.6*), previene el ataque nucleofílico de moléculas de agua en la posición 2 del catión flavilio, evitando la formación de la pseudobase no coloreada (*Rein, 2005*).

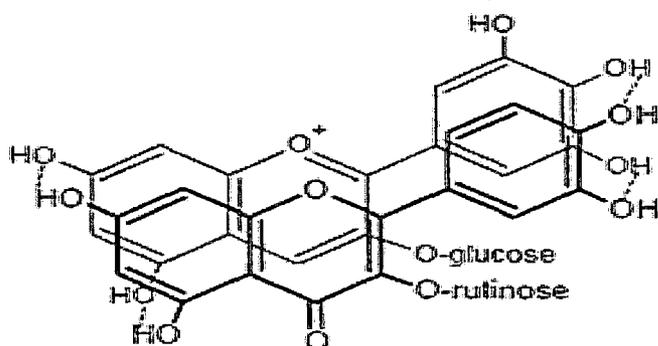


Figura N° 2.6 Formación de complejo a través de interacción intermolecular.

En la copigmentación intramolecular el copigmento es parte de la molécula de antocianina y consiste en un grupo acilo que está unido covalentemente a un resto de glucósido de la antocianina. En esta última, los residuos aromáticos de grupos acilo interactúan con el catión flavilio cargado positivamente, a través de interacciones hidrofóbicas, formando una conformación apilada tipo sándwich. En esta conformación tipo sándwich, los residuos de glucósidos son considerados como espaciadores, que permiten el plegado del grupo acilo en la aglicona (**Sari et al.**, 2012; **Rein**, 2005).

Esta disposición hace que el ataque nucleofílico, de moléculas de agua por ejemplo, en el C-2 y en el C-4 de la antocianina, esté obstaculizado (**Rein**, 2005).

El número de grupos acilo, su estructura y la posición de unión a residuos de glucósidos, así como la estructura y el número de sacáridos afecta a la copigmentación intramolecular. Las antocianinas poliaciladas son más estables que las monoaciladas. En estas últimas las moléculas de agua pueden atacar a los sitios no protegidos de la aglicona, por lo que la estabilización es parcial (**Rein**, 2005).

La autoasociación y formación de complejos de metal son también medios a través del cual se produce la copigmentación (**Sari et al.**, 2012; **Rein**, 2005; **Lewis y Walker**, 1995). **Garzón** (2008) señala que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio, protegiendo la molécula de antocianina.

Cuando las antocianinas se encuentran en solución acuosa, el efecto de la copigmentación es dependiente del tipo y la concentración de la misma, del copigmento, la temperatura, el pH y la composición del medio (**Rain**, 2005; **Baulis et al.**, 1994).

El fenómeno de copigmenación se observa como un cambio batocrómico o como un efecto hipercrómico. El cambio batocrómico ($\Delta\lambda_{\text{máx}}$), consiste en un cambio de la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) en el rango visible hacia una mayor longitud de onda. Este efecto también se denomina “efecto de azulado”, ya que el color de la antocianina cambia de rojo a tonalidades azules. En el efecto hipercrómico ($\Delta\lambda$) la intensidad del color de la antocianina (A) es reforzada por la copigmentación. La *Figura N° 2.7* muestra el cambio en la longitud de onda máxima de absorción (desplazamiento batocrómico) y en la intensidad de color (efecto hipercrómico) para cianidina 3- glucósido copigmentada con ácido rosmarínico (*Rein, 2005*).

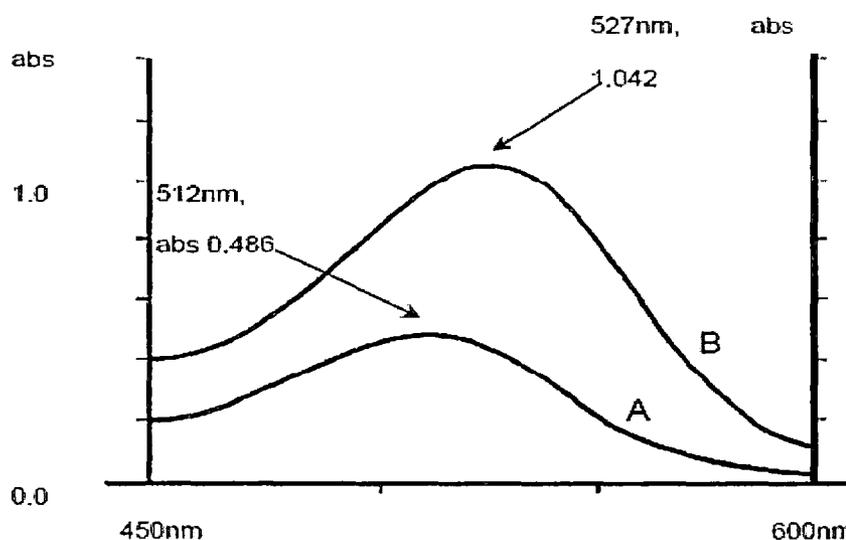


Figura N° 2.7 Copigmentación como efecto hipercrómico y desplazamiento batocrómico. A) Cianidina-3-glucósido, B) Cianidina-3-glucósido + ácido rosmarínico (*Rain, 2005*).

De lo expuesto se puede señalar que resulta interesante buscar alternativas de copigmentación para evitar el ataque nucleofílico de agua al catión flavilio, impidiendo así la decoloración del pigmento antociánico. Entre las alternativas podría considerarse mantener una alta concentración de antocianinas para aumentar las posibilidades de autoasociación, o bien incorporar algún compuesto que actúe como copigmento.

2.1.6.5. Oxígeno

Las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta en la que éstas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También, pueden reaccionar con radicales de oxígeno actuando como antioxidantes. Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura (**Rein**, 2005).

Además se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, formando peróxido de hidrógeno. Esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en C-2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados de color café (**Fennema**, 2000).

Garzón (2008) publicó que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargonidina-3-glucósido, proveniente de la fresa, causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. También señaló un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución.

Las investigaciones de **Garzón y Wrolstad** (2002), confirmaron la existencia de una mayor pérdida de antocianinas de fresa cuando está presente el ácido ascórbico, tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos (**Garzón**, 2008).

Por lo tanto, para reducir las posibilidades de deterioro de las antocianinas es importante eliminar el oxígeno del medio.

2.1.6.6 Luz

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas (*Delgado-Vargas et al.*, 2000).

Ferreira Ozela et al., (2007), al estudiar el efecto de la luz sobre la estabilidad de las antocianinas en extracto de frutos de espinaca blanca, concluyeron que la luz ejerce un efecto adverso sobre su estabilidad. *Laleh et al.*, (2006) llegaron a la misma conclusión en su investigación referida a la estabilidad de antocianinas presentes en extractos de frutos de 4 especies de berberies, como así también *Devi et al.*, (2012) al estudiar la estabilidad de antocianinas extraídas de salvado de sorgo rojo. Por lo tanto, resulta importante proteger, no solo del oxígeno, sino también de la luz a los productos ricos en antocianinas.

2.2 RADICALES LIBRES

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. También pueden ser radicales libres los iones metálicos y el átomo de hidrogeno. Su vida es muy breve (del orden del milisegundo o menos), aunque los núcleos asimétricos contribuyen a la formación de radicales de larga vida (*Organización Panamericana de la Salud*, 1997).

2.2.1 Producción de radicales libres de oxígeno

Se forman de manera ilimitada durante el metabolismo celular normal, por lo que entre las fuentes endógenas de radicales libres del oxígeno se pueden mencionar las cadenas de transporte de electrones mitocondrial y microsomal, reacciones catalizadas por oxidasas y oxigenasas, reacciones

de auto oxidación de metales, actividad de células fagocíticas (granulocitos, macrófagos, células endoteliales) y transporte de oxígeno por la hemoglobina (*Ferramola A. et al., 2006*).

2.2.2 Reactividad de los radicales libres y estrés oxidativo

La reactividad de los radicales libres es muy diferente, algunos son relativamente estables, pero la mayoría de los que tienen interés biológico son extremadamente reactivos e inestables y, como resultado tienen una vida media muy corta. El radical hidroxilo es el más reactivo de los radicales oxigenados y por su corta vida media (pocos microsegundos) su radio de acción efectivo en la célula es de aproximadamente 30 \AA .

Los radicales libres pueden actuar como oxidantes o reductores. Cuando reaccionan con un compuesto se pueden formar otros radicales libres, es decir, se producen reacciones en cadena, por ejemplo, la peroxidación lipídica. Aunque el radical libre inicial origina solamente efectos locales, los radicales secundarios derivados y los productos de degradación formados pueden tener efectos biológicos distantes del sitio donde se generó el primer radical. Cuando dos radicales actúan entre sí, se puede formar una molécula estable, con lo cual se terminan las reacciones en cadena.

El radical superóxido (O_2^*) no es particularmente reactivo pero es potencialmente tóxico. Puede influir directamente en la homeostasis local, por ejemplo, oxidando catecolaminas, y lo que es más importante, puede transformarse en el radical hidroxilo (OH^*) que es muy peligroso. El H_2O_2 no es especialmente tóxico para las células, pero puede atravesar membranas y esto es importante, porque el medio extracelular posee muy pocos mecanismo de defensa antioxidante. En presencia de trazas de iones metálicos de transición se forman radicales hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno (Reacción de Fenton) y también por interacción entre el radical superóxido y H_2O_2 (reacción Haber-Weiss) (*Ferrer Y et al., 2009*).

2.2.3 Daño molecular inducido por radicales libres

Los radicales libres ejercen efectos útiles y nocivos. Entre los útiles se puede mencionar el papel de defensa que cumplen los producidos por los fagocitos en la destrucción de organismos invasores; además, algunas reacciones enzimáticas transcurren posiblemente por mecanismos radicales (caso de la ciclo oxigenasa y tromboxano sintetasa). En cambio, los efectos nocivos son numerosos, por dañar lípidos, proteínas, carbohidratos, entre otros (**Zorrilla A.2002**).

2.3 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias que neutralizan los radicales libres o sus acciones. La naturaleza ha dotado a cada célula con adecuados mecanismos de protección contra cualquier efecto perjudicial de los radicales libres: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, tioredoxina, enlaces tiol y disulfuro son sistemas amortiguadores de cada célula. La alfa tocoferol (vitamina E) es un nutriente esencial el cual funciona como antioxidante rompedor de cadenas, el cual previene la propagación de las reacciones de radicales libres en todas las membranas celulares. El ácido ascórbico (vitamina C) es también parte del mecanismo normal de protección. Otros antioxidantes no enzimáticos incluyen a los carotenoides, flavonoides, y polifenoles relacionados, ácido lipoico, el glutatión entre otros (**Venero J, 2002**).

2.3.1 Niveles de la acción antioxidante

Los antioxidantes capaces de neutralizar a los radicales libres o sus acciones, actúan a diferentes fases. Actúan a niveles de prevención, interceptación y reparación. La acción preventiva, busca evitar la formación de los radicales libres de oxígeno (ROS). Estos incluyen a la SOD, que cataliza la dismutación O_2^* a H_2O_2 y la catalasa que lo transforma en agua. La interceptación de los radicales libres es principalmente por secuestro del radical, los radicales peroxilo son los principales afectados en esta etapa. Los efectores incluyen a varios antioxidante como las vitaminas A y E, glutatión, otros compuestos con

grupo tiol, carotenoides, flavonoides, entre otros. En el nivel de reparación y reconstitución están comprometidos sistemas enzimáticos principalmente (**Gutiérrez A et al., 2007**).

2.4 ESPECTROFOTOMETRÍA

La espectrofotometría es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Cuando se hace incidir luz monocromática (de una sola longitud de onda) sobre un medio homogéneo, una parte de la luz incidente es absorbida por el medio y otra transmitida, como consecuencia de la intensidad del rayo de luz sea atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido. Dependiendo del compuesto y el tipo de absorción a medir, la muestra puede estar en fase líquida, sólida o gaseosa. En las regiones visibles y ultravioleta del espectro electromagnético, la muestra es generalmente disuelta para formar una solución.

Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida: *Absorbancia*, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto (Figura N°2.8).

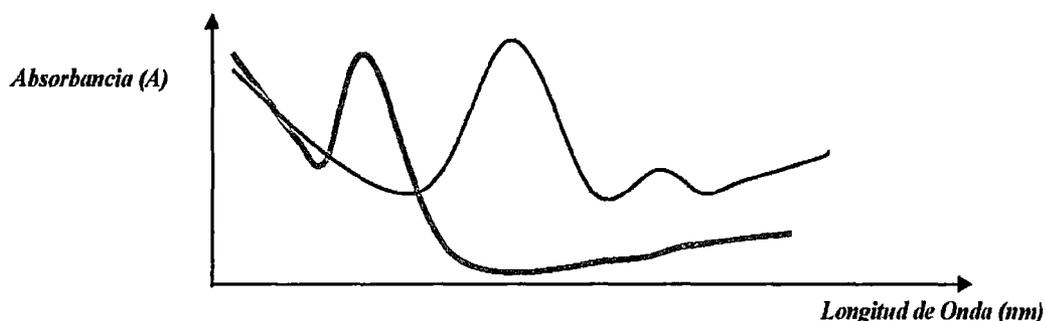


Figura N° 2.8 Espectro de absorción de dos compuestos diferentes.

2.4.1 Ley de Lambert

Esta ley establece que cuando pasa luz monocromática por un medio homogéneo, la disminución de la intensidad del haz de luz incidente es proporcional al espesor del medio, lo que equivale a decir que la intensidad de la luz transmitida disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente el espesor del medio absorbente (*Figura N°2.9*).

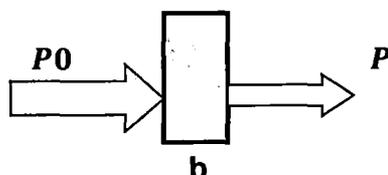


Figura N° 2.9 Ley de Lambert

La siguiente relación matemática da cuenta de esta ley:

$$\frac{P}{P_0} = e^{-kb} \quad 2.1$$

- P_0 : Intensidad de la luz incidente
- P : Intensidad de la luz transmitida
- b : Espesor del medio absorbente
- k : Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, del espesor del medio absorbente y de la naturaleza del medio.

2.4.2 Ley de Beer

La intensidad de un haz de luz monocromática disminuye exponencialmente al aumentar aritméticamente la concentración de la sustancia absorbente, cuando este haz pasa a través de un medio homogéneo (*Figura N° 2.10*).

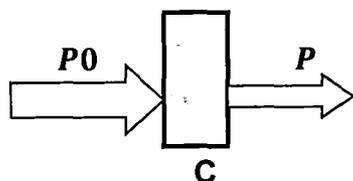


Figura N° 2.10 Ley de Beer

La relación matemática que da cuenta de esta ley se muestra a continuación:

$$\frac{P}{P_0} = e^{-kC} \quad 2.2$$

Dónde:

P_0 : Intensidad de la luz incidente

P : Intensidad de la luz transmitida

C : Concentración de la solución

k : Constante, cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz incidente, de la concentración de la solución, y frecuentemente, de la naturaleza del medio.

Ambas leyes se combinan en una sola, generando la **Ley de Lambert-Beer**

$$\frac{\text{Log } P_0}{P} = abC \quad \text{ó} \quad A = abC \quad 2.3$$

$$A = \text{Log } \frac{P_0}{P} = -\text{Log } T \quad 2.4$$

Donde:

a : Absortividad

b : Longitud o espesor del medio (longitud de la cubeta)

C : Concentración de la solución

$\frac{P}{P_0} = T$: Transmitancia

Los términos de absorbancia y transmitancia son definidos a continuación

Transmitancia (T):

Es la razón entre la luz monocromática transmitida (P) por una muestra y la energía o luz incidente (P₀) sobre ella. Tanto la energía radiante incidente como la transmitida deben ser **medidas** a la misma longitud de onda.

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-abC} \quad \text{ó} \quad \%T = \frac{100P}{P_0} \quad 2.5$$

Se acostumbra a considerar la transmitida como la razón de la luz transmitida por la muestra y la luz transmitida por un estándar arbitrario. Este estándar puede ser el líquido (solvente) en que esta disuelta la muestra: aire, blanco analítico (solución que contiene todos los componentes de la solución problema menos la sustancia problema) u otra sustancia elegida arbitrariamente.

Debido a que la transmitancia de este estándar no es necesariamente 100%, es necesario especificar el estándar con la cual la muestra es comparada.

Absorbancia (A):

Se define como la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en solución. Matemáticamente, corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia: T, transmitancia expresada como fracción decimal %T, transmitancia expresada como porcentaje.

$$A = -\text{Log } T = 2 - \text{Log}\%T \quad 2.6$$

Pero:

$$T = \frac{P}{P_0} = 10^{-abC} \quad 2.7$$

Luego:

$$A = \text{Log} \left(\frac{P}{P_0} \right) = -\text{Log} 10^{-abc} \quad 2.8$$

$$A = abc \quad 2.9$$

Esta ecuación indica que la absorbancia es una función lineal de la concentración, donde **a** es una constante de proporcionalidad llamada absorptividad. La magnitud de **a** depende de las unidades de **b** y **c**. Si la concentración **C** está expresada en moles por litro y la longitud de la cubeta **b** en centímetros, la constante **a** recibe el nombre de absorptividad molar (**ξ**). Luego:

$$A = \xi b C \quad 2.10$$

Mediciones de transmitancia y absorbancia

Las mediciones de absorbancia o transmitancia se hacen por comparación entre la muestra problema y un estándar arbitrario o referencia. Como la referencia debe poseer un porcentaje de transmitancia de 100%, esta es llamada referencia de 100%, o una absorbancia de cero.

Selección de longitud de onda de trabajo

La longitud de onda del trabajo corresponde, generalmente, a la longitud de onda en la cual la absorbancia del analito (sustancia a analizar) es máxima (λ_{max}). Para seleccionar el λ_{max} , se hace un espectro de absorción o curva espectral, y que consiste en una gráfica de la absorbancia de una solución de la sustancia absorbente de concentración adecuada, medida a distintas longitudes de onda y en ella se determina el λ_{max} (*Figura N° 2.11*)

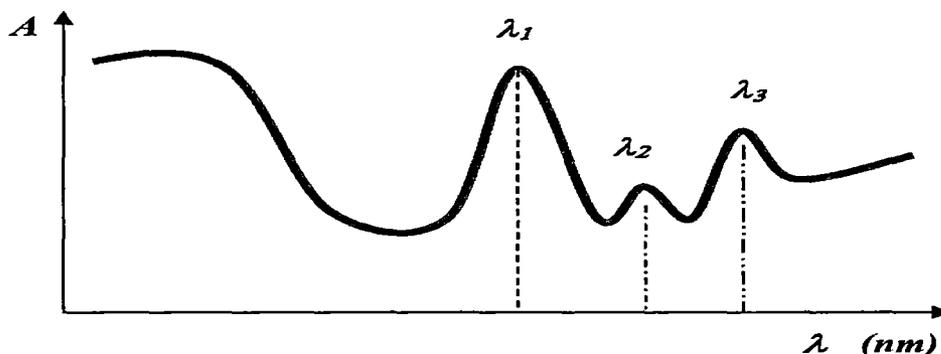


Figura N° 2.11 Curva espectral (en este ejemplo $\lambda_{\text{máx.}} = \lambda_1$)

Las mediciones de absorbancia se hacen en la zona de longitudes de onda donde se espera que absorba la sustancia problema. Si se trata de sustancias coloreadas, las mediciones se realizan en la zona visible del espectro electromagnético (380 a 800 nm). En el caso de sustancias no coloreadas, las mediciones se realizan en la región ultravioleta del espectro electromagnético (200 a 380 nm)

Curva de calibración

Uno de los métodos más utilizados para determinar la concentración de una muestra problema, es el método de la curva de calibración. Esta curva de calibración es una gráfica que relaciona la concentración de al menos cinco soluciones de estándar de concentraciones conocidas, con la absorbancia de cada uno de ellos determinados a la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx.}}$) (Figura N° 2.12).

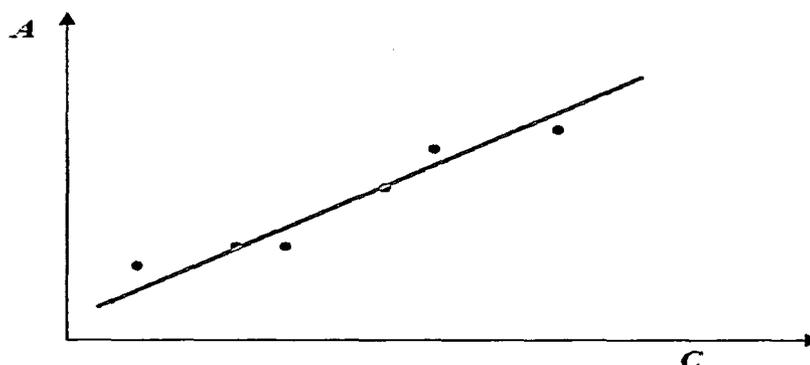


Figura N° 2.12 Curva de calibración para un analito.

Una vez obtenida la gráfica se determina la función matemática que presenta dicha recta a través del tratamiento estadístico de regresión de los mínimos cuadrados, la cual relaciona la absorbancia y la concentración de un analito. La siguiente ecuación matemática corresponde a dicha función:

$$A = mC + n \quad 2.11$$

A: Absorbancia.

n: Intercepto de la recta

m: Pendiente de la recta y que corresponde al producto entre la absorptividad a de la muestra y el espesor b de la cubeta.

Luego se mide la absorbancia de la solución problema y se interpola su valor en la gráfica o se reemplaza en la ecuación (2.11), para obtener el valor de concentración del analito.

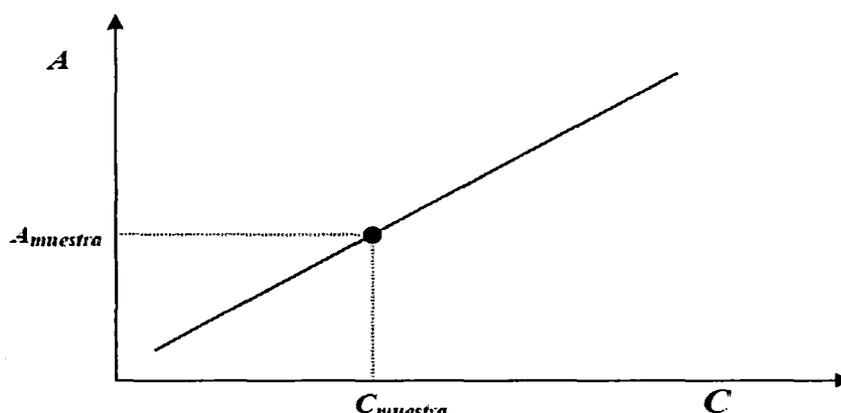


Figura N° 2.13 Interpolación gráfica.

La concentración de la solución problema debe estar comprendida en el rango de concentración que comprende la curva de calibración. Si la concentración de la solución problema es menor que la concentración del estándar más diluido, debe usarse el método de adición estándar, que consiste en adicionar un volumen determinado de un estándar concentrado a la solución problema, antes de realizar la lectura y que

permite que esta lectura este dentro de las obtenidas para la curva de calibración. En el caso contrario, si la concentración del analito es mayor que la concentración del estándar más concentrado la solución problema deberá ser diluida.

Al hacer la curva de calibración, se debe emplear la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{máx.}}$), para obtener una recta con la máxima pendiente y así tener mayor sensibilidad y precisión al hacer las mediciones.

La medición de la absorbancia de la solución problema debe hacerse a la misma longitud de onda que fue hecha la curva de calibración.

2.5 MATERIAS PRIMA CON CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

El estudio de las antocianinas en diferentes materias prima, ha tomado fuerza en las últimas décadas, no solo por su capacidad colorante, sino también por su capacidad antioxidante. Estas materias prima se identifican por presentar ciertas características en sus diferentes partes morfológicas como: hoja, tallo, fruto, raíz, etc. Se especifica con mayor detalle en la *Tabla N° 2.1* y *Tabla N° 2.2*.

Tabla N° 2.1 Color y distribución de las principales antocianidinas en algunas materias prima (*Wang H et al., 1997*).

Frutos y vegetales	Color	Compuesto
Uva concordia, mirtillo, bilberry, grosella negra.	Rojo azulado	Delfinidina
Fresa, mora, ruibarbo, grosella negra, cereza, col roja, bilberry, arandino, saúco, uva concordia, maíz, ciruela, frambuesa, cebolla roja.	Rojo naranja	Cianidina
Fresa, maíz.	Naranja	Pelargonidina
Uva, mirtillo, bilberry.	Rojo azulado	Malvidina
Cereza, arándano	Rojo	Peonidina

Tabla N° 2.2 Contenido de antocianinas totales en materias prima comunes.

Fruto	Contenido de antocianinas totales (mg/100 g)
Manzana	83-326
Bilberry	300-320
Mora	83-326
Grosella negra	130-400
Mirtillo	25-495
Col roja	25
Cereza	4-450
Arándano	60-200
Saúco	450
Uvas	6-600
Kivi	100
Cabollas rojas	7-21
Ciruelas	2-25
Rábanos rojos	11-60
Frambuesa negra	300-400
Frambuesa roja	20-60
Fresas	15-35

Fuente: *Burin B et al.*, 2010

2.6 EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

La extracción de pigmentos naturales, debe llevarse a cabo teniendo en cuenta los factores que pueden afectar la integridad de los mismos; por lo cual este es un paso muy importante debido a que los resultados obtenidos dependen en gran parte del proceso de extracción realizado.

Las antocianinas son compuestos solubles en solventes polares y comúnmente se extraen de sus fuentes naturales usando metanol o etanol con pocas cantidades de algunos ácidos como ácido clorhídrico, acético y fórmico, ya que el ácido mantiene el pH ácido lo que previene el desplazamiento de los equilibrios químicos de hidratación y formación

de chalconas. Adicionalmente el uso de ácidos débiles previene la degradación de las antocianinas no aciladas las cuales presentan mayor labilidad. Sin embargo, durante el proceso de evaporación del solvente acidificado puede ocurrir degradación de las antocianinas aciladas, por la hidrólisis parcial o total de los ácidos enlazados a los azúcares, especialmente en antocianinas aciladas con ácidos dicarboxílicos como el ácido malónico. Por lo anterior se recomienda para la extracción de estos pigmentos el uso de ácidos débiles como el trifluoroacético, tartárico o cítrico (*Revilla E et. al.*, 1998).

2.6.1 Análisis de antocianinas por espectrofotometría UV-Vis.

Debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos. Sus espectros de absorción se caracterizan por tener dos bandas separadas una en la región visible entre 465 y 550 nm y otra más pequeña en el UV alrededor de 275 nm (*Harborne, J.B.et al.*, 1995). Es así como se pueden identificar las antocianinas por su absorción en la región visible (*Andersen, Ø. Et al.*, 2004).

La glicosidación conlleva a un desplazamiento hipsocrómico de los máximos de absorción en el visible. Así por ejemplo, entre ($\lambda_{\text{máx.}}$ 520 nm) de la pelargonidina y de la pelargonidina-3-glucósido (505 nm), ocurre un desplazamiento de $\Delta\lambda$ de 15/nm; entre cianidina ($\lambda_{\text{máx.}}$ 535 nm) y cianidina-3-glucósido ($\lambda_{\text{máx.}}$ 523 nm) un $\Delta\lambda$ de 12/nm, entre delphinidina ($\lambda_{\text{máx.}}$ 544 nm) y delphinidina-3-glucósido ($\lambda_{\text{máx.}}$ 534 nm) un $\Delta\lambda$ de 10/nm (*Harborne, J.B et al.*, 1995).

Los derivados acilados no muestran diferencia con respecto a los correspondientes no acilados en la zona del visible, sin embargo, en la región del ultravioleta suelen presentar un máximo adicional en el intervalo de λ 310 - 335 nm, correspondiente a la absorción del grupo acilo (*Figura N° 2.14*); la esterificación con ácido p-cumárico aumenta la

absorción en torno a 308 - 313 nm y con ácido caféico en λ 326 - 329 nm. Este hombro no se presenta cuando el ácido sustituyente es el ácido acético (*Wrolstad R et al.*, 1974).

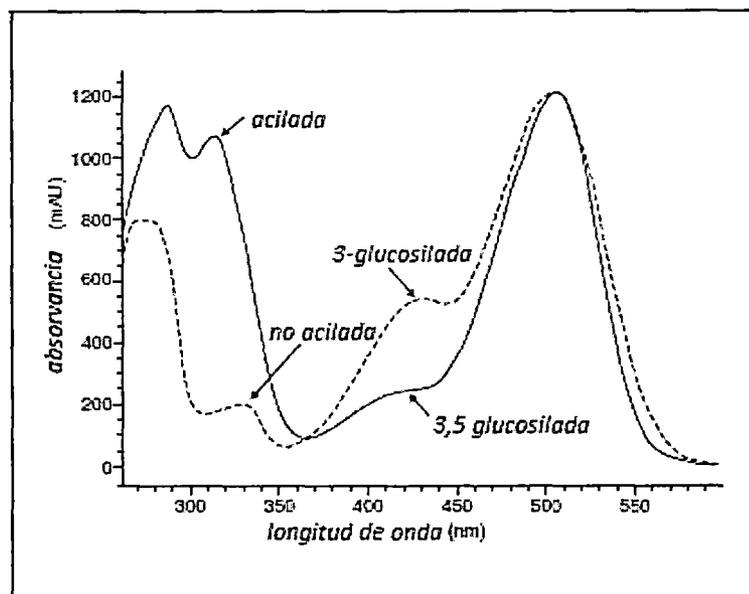


Figura N° 2.14 Espectros UV-Vis de las antocianinas aciladas y 3,5-glucosiladas (línea continua); no aciladas y 3-glucosiladas (línea discontinua) (*Harborne, J.B.*, 1998)

2.6.2 Cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5. El método del **pH diferencial** se basa en esta reacción, permitiendo de una manera segura y rápida medir el total de antocianinas monoméricas.

Se utiliza un espectrofotómetro UV- visible; las mediciones se realizan a las longitudes de onda de 520 nm (máxima longitud de onda determinada) y a 700 nm.

El contenido de antocianinas monoméricas es calculado como cianidina-3-glucósido, usando como coeficiente de extinción molar 26900 y como peso molecular 449,2. Los cálculos se realizan usando las siguientes expresiones (*Giusti y Wroslad, 2001*):

Cálculo de absorbancia final

$$A = \text{Absorbancia} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5} \quad 2.12$$

Las mediciones de la absorbancia requiere el uso de soluciones tampón normalizados para las lecturas a pH = 1,0 y a pH = 4,5. Previamente a la determinación de la absorbancia de la muestra o alícuota en el extracto para el análisis, es importante indicar la influencia de la concentración del analito en el extracto para decidir el grado de dilución de la muestra, con la finalidad de enmarcar la absorbancia en el rango recomendable entre 0,2 a 1,4 para la lectura final.

Las revisiones bibliográficas no presentan de forma clara y explícita las preparaciones cuantitativas de las soluciones tampón y los criterios de manejo y dilución para efectos de determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Concentración de pigmentos monoméricas en el extracto

Expresado como cianidina -3-glucósido:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) = \frac{(A) (PM) (FD) (100)}{\epsilon(l)} \quad 2.13$$

Donde:

- PM : Peso Molecular, Cianidina 3-glucósido = 449,2
- FD : Factor de dilución
- ϵ : Coeficiente de extinción molar = 26900
- l : Longitud de la celda = 1

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

En vista de que la investigación es de carácter aplicada, con alto grado de correlación y con capacidad predictiva en la determinación de antocianinas, la metodología utilizada para su desarrollo está basada en la evaluación experimental, con ensayos de diverso nivel, con la observación exhaustiva, la cuantificación y el análisis de la información recabada en el monitoreo controlado de la variable estudiada, conducentes a la determinación espectrofotométrica del contenido de antocianinas en diversas muestras.

La evaluación experimental se realizó con diferentes muestras de materias prima, que cumplen las características de poseer antocianinas como: maíz morado, uva, fresa, mora, etc.

3.1 MÉTODOS

3.1.1 Evaluación en materias prima de la región de Ayacucho

Para la investigación se procede a consultar diferentes revisiones bibliográficas de fuentes confiables, para identificar qué productos son los más principales con interés Agroindustrial en la región de Ayacucho, los cuales estadísticamente están ranquiados a nivel nacional y mundial.

Tabla N° 3.1 Ayacucho: producción agrícola, según principales cultivos, 2008 – 2013 (Toneladas).

Principales Cultivos	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Achiote	190	196	217	230	233	229
Aji	36	36	60	42	38	63
Ajo	1 984	1 375	1 354	1 302	1 677	1 623
Alfalfa	269 682	311 853	319 564	321 547	296 946	266 889
Arroz Cáscara	912	679	980	769	1 015	693
Arveja Grano Seco	3 561	3 661	3 610	2 089	3 475	4 393
Arveja Grano Verde	3 227	3 151	3 021	2 744	4 217	4 834
Betarraga	156	271	347	283	364	488
Cacao	6 313	6 278	6 263	6 180	6 186	6 188
Café	4 423	4 405	4 441	4 373	4 402	4 434
Camote	392	316	439	486	253	327
Cebada Grano	13 580	14 472	13 467	7 394	12 844	15 856
Cebolla	2 927	2 864	3 253	2 486	3 523	4 008
Chirimoya	406	434	461	475	513	417
Coco	141	138	136	137	144	143
Col	699	674	915	852	899	1 285
Granadilla	18	20	51	55	56	56
Haba Grano Seco	5 447	5 236	5 011	3 746	5 855	6 746
Haba Grano Verde	3 369	3 306	3 442	3 388	4 291	5 090
Lima	179	190	214	212	209	198
Limón	659	645	682	661	731	705
Maíz Amarillo Duro	1 812	1 699	2 080	2 064	2 309	2 450
Maíz Amiláceo	16 623	16 596	16 260	10 412	17 099	17 443
Maíz Choclo	7 128	8 314	8 836	6 947	9 963	11 892
Mandarina	256	251	374	380	380	371
Mango	299	328	341	336	392	435
Manzana	459	426	494	483	498	494
Maracuyá	36	48	48	49	48	48
Mashua	3 991	3 932	3 697	2 911	4 187	3 909
Melocotón	981	958	1 166	1 272	1 847	1 924
Membrillo	58	50	39	35	62	61
Naranja	3 802	3 813	3 791	3 759	3 807	3 770
Oca	5 737	5 454	5 269	3 983	5 786	5 678
Olluco	10 788	10 157	9 844	6 869	11 855	12 081
Orégano	48	41	36	37	30	30
Pallar Grano Seco	53	49	53	26	25	31
Palta	2 272	2 656	4 540	4 638	5 261	5 291
Papa	247 904	235 152	191 923	137 887	329 853	283 721
Papaya	2 520	2 186	2 183	2 201	2 169	2 164
Pepino		44	13	19	18	24
Pera	43	47	56	56	88	84
Piña	3 283	3 316	3 205	3 151	3 101	2 704
Plátano	6 377	6 568	6 548	6 362	6 601	6 524
Quinua	1 721	1 771	2 368	1 444	4 188	4 925
Tarhui o Chocho	24	139	114	326	669	677
Tomate	2 259	1 891	2 346	1 353	1 526	1 349
Trigo	10 173	10 774	9 326	5 964	10 840	11 249
Tuna	15 317	15 546	16 250	15 795	15 350	15 008
Uva	75	70	70	68	78	80
Yuca	9 640	11 244	7 986	6 930	5 653	6 006
Zanahoria	2 259	2 294	2 099	1 875	2 021	2 230

Fuente: Ministerio de Agricultura y Riego.

De la misma forma se idéntica los productos que tienen menor importancia comercial o los que recientemente son considerados importantes por diferentes propiedades de carácter nutricional y de la salud, tal como se observa en el *Tabla N° 3.1*. Posteriormente se procede a seleccionar aquellos productos que tienen contenido potencial de antocianinas, los cuales serán sometidos para la evaluación, que se presenta en el *Tabla N° 3.2*.

Tabla N° 3.2 Algunos cultivos agrícolas seleccionados por poseer contenidos potenciales de antocianina.

MATERIA PRIMA
Maíz morado
Col roja
Mora(*)
Sauco(*)
Uvas
Ciruelas(*)
Papa nativa (*)
Fresas(*)
Camote morado

(*) Son productos que no aparecen estadísticamente o a nivel ranquin de los cultivos agrícolas principales, sin embargo son aquellos que se producen en la región pero en menor cantidad, generalmente para autoconsumo o para mercado local y también por tema de reforestación.

Fuente: Ministerio de Agricultura y Riego

3.1.2 Determinación de la humedad

Es importante determinar la humedad de la muestra a analizar, a fin de expresar los resultados finales en función a la materia prima o muestra en base seca, para facilitar los fines de comparación y discusión. La humedad es determinada en el equipo de determinador de humedad digital, para lo cual, se coloca una cierta cantidad de muestra condicionada o parte de la muestra del cual será extraído el extracto de antocianina, generalmente igual o menores a unos 5 g, debe asegurarse de que el equipo esté programado en función de 0-100%, la determinación de la humedad es necesario, ya que la cantidad de

antocianina será determinado en función a su base seca de la muestra analizada.

3.1.3 Preparación del extracto.

Es sumamente importante determinar técnica apropiada para la extracción de las antocianinas a partir de la muestra a analizar, teniendo en cuenta los diversos factores que influyen sobre ella y además, garantizar un alto rendimiento en la extracción del colorante, tal que permita la apropiada determinación cuantitativa del contenido de antocianinas a través del método de espectrofotometría de pH diferencial.

Los extractos se preparan a partir de las diversas materias prima con contenido potencial de antocianinas identificadas considerando los siguientes procesos:

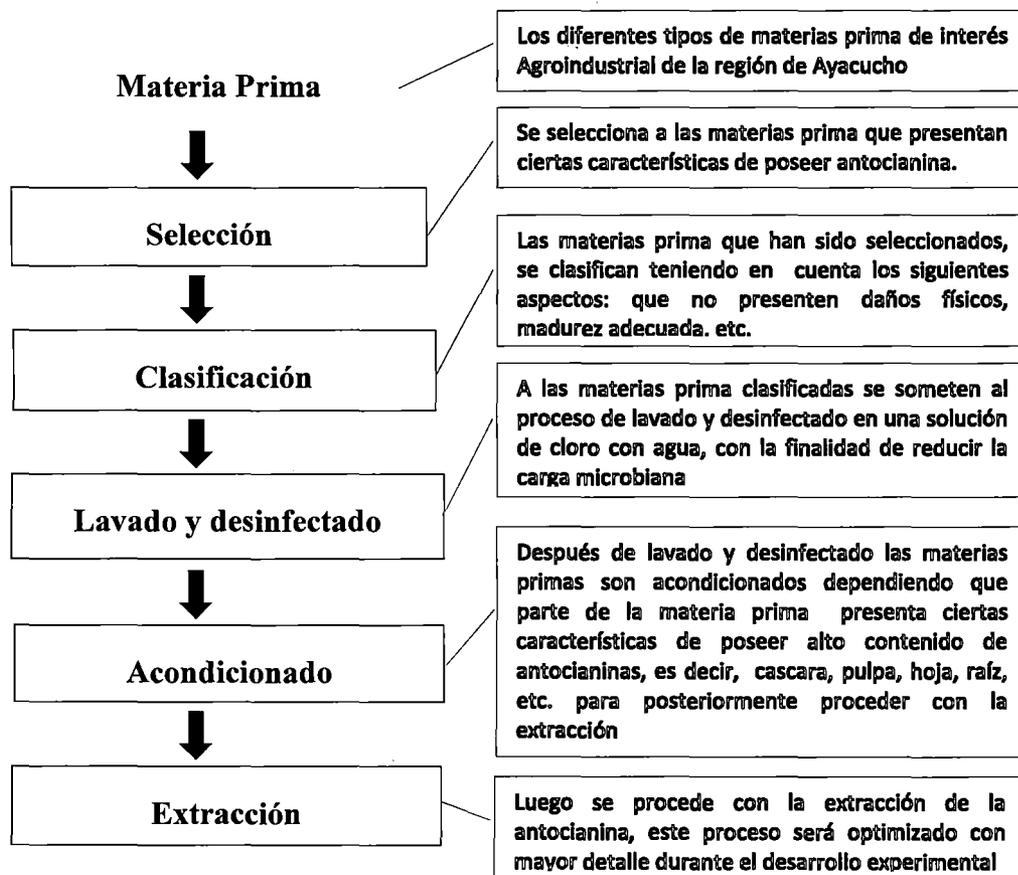


Figura N° 3.1 Diagrama de flujo, para la preparación del extracto.

3.1.4 Los reactivos o soluciones Tampón

Se requiere disponer de un **pH metro**, calibrado con soluciones de regulación a pH 4,0 y 7,0 (soluciones tampón estándar).

Para la evaluación espectrofotométrica del contenido de antocianinas en el extracto se requiere la preparación de los reactivos o soluciones tampón o buffer para las lecturas a pH = 1,0 y a pH = 4,5. Las cuales se preparan de la siguiente manera:

A. Buffer pH 1,0 (cloruro de potasio 0,025 M).

Pesar 1,86 g de KCl en un vaso y añadir agua destilada a 980 mL. Medir el pH y ajustar a 1,0 ($\pm 0,05$) con HCl (6,3 mL), pasar a un matraz de 1 L y se diluye hasta el volumen con agua destilada.

B. Buffer pH 4,5 (acetato de sodio 0,4 M).

Pesar 54,43 g de $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en un vaso precipitado y añadir 960 mL de agua destilada. Medir el pH y ajustar a 4,5 ($\pm 0,05$) con HCl (20 mL) pasar a un matraz de 1 L y diluir al volumen final con agua destilada.

3.1.5 Manejo del espectrofotómetro Genesys 6.

La performance del espectrofotómetro a 520 nm debe ser verificada con patrones de referencia para la exactitud de la longitud de onda, fotométricos, exactitud, linealidad fotométrica, y la luz difusa.

Para el manejo del espectrofotómetro GENESYS 6, instalado en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, se debe tener en consideración los siguientes pasos:

Paso 1. Conectar a la red 220 V.

Paso 2. Encender el interruptor termomagnético del estabilizador.

Paso3. Encender el espectrofotómetro Genesys 6.

Paso 4. Encender CPU Halion-windows XP versión 2002, service pack 2.

Después de haber seguido todos los pasos indicados, se procede con el manejo del software **Visionlite**.

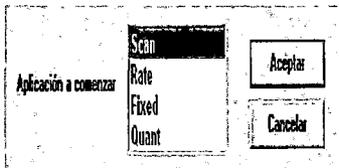
En la pantalla ubicar y entrar al menú **VISIONLITE** como se muestra en las siguientes imágenes:

Imagen N° 1



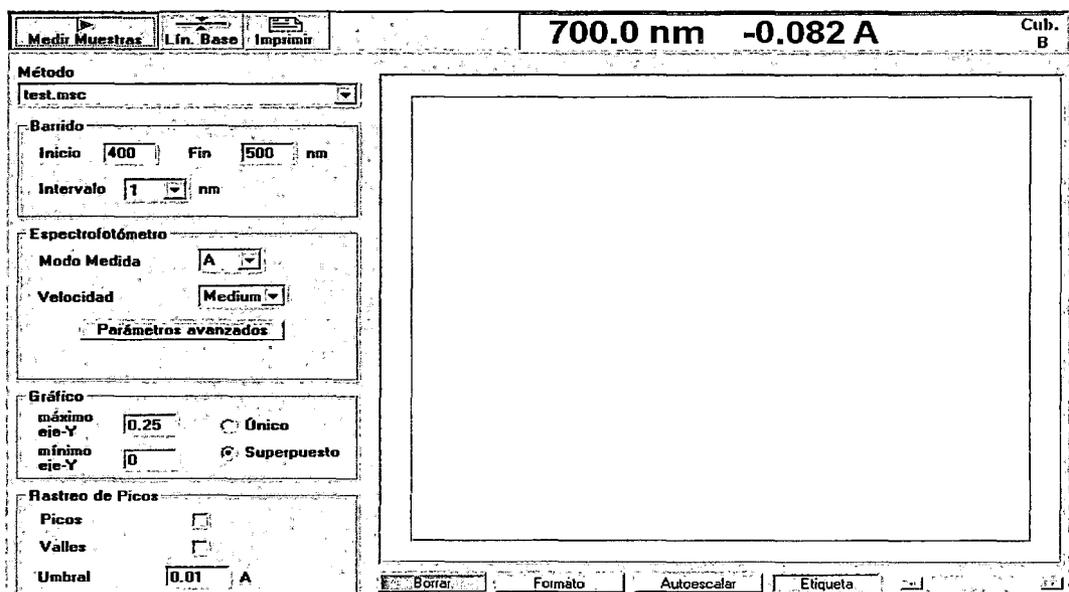
Ingresar al **Visionlite** y luego aparecerá un cuadro como se muestra en la imagen N° 2

Imagen N° 2



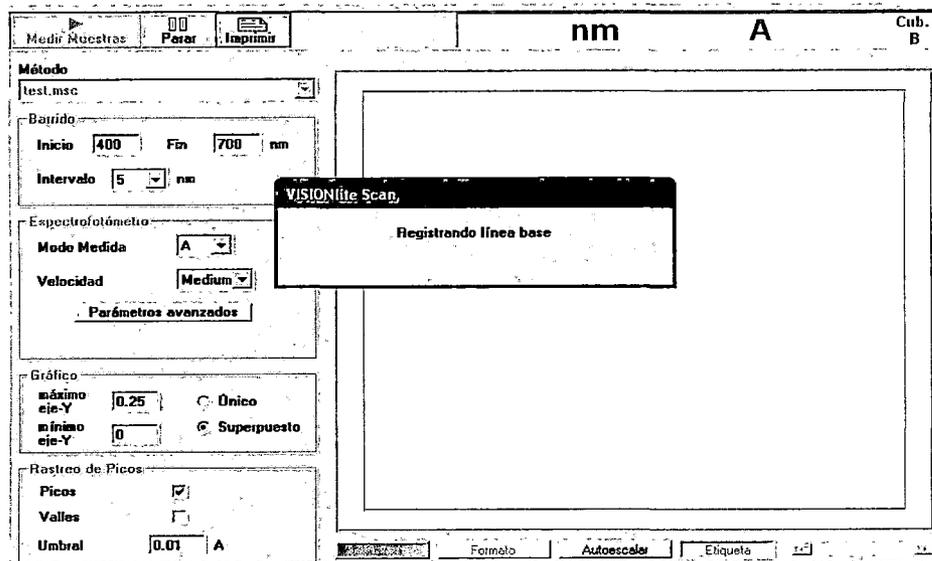
Seleccionar **Scan** y aceptar, luego aparecerá el siguiente cuadro como se muestra en la Imagen N° 3

Imagen N° 3



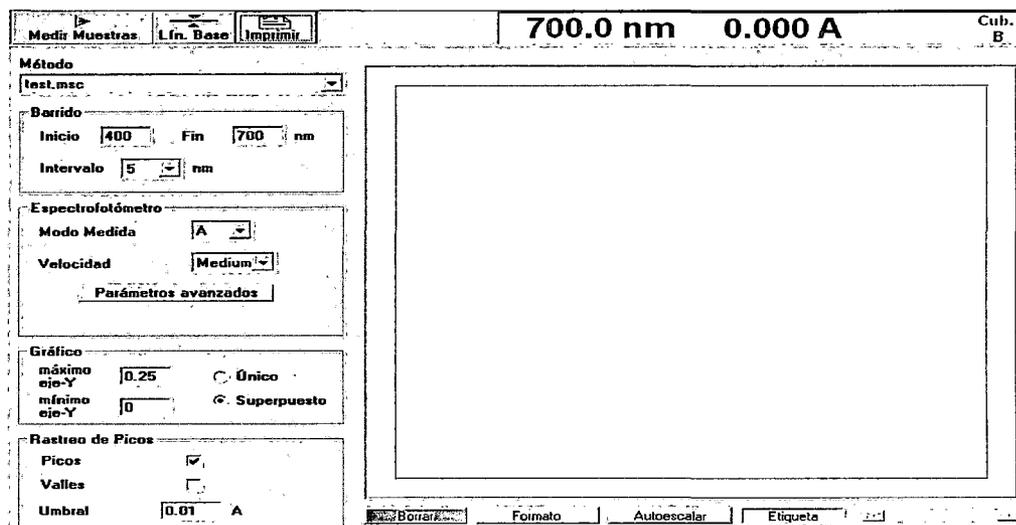
Debe ingresar en la opción de **Barrido** los valores del inicio y fin de longitud de onda, el intervalo del barrido, luego en la opción de **espectrofotómetro** debe programar **modo de medida**, **velocidad** y las demás opciones si es necesario, finalmente oprimir la opción **Lin. Base** y aparecerá el siguiente cuadro como se muestra en la imagen N° 4

Imagen N° 4



Esperar hasta que aparezca el siguiente cuadro, tal como se muestra en la imagen N° 5

Imagen N° 5



Oprimir la opción **Medir Muestras** y aparecerá el siguiente cuadro como se muestra en la imagen N° 6

Imagen N° 6

Medir Muestras Lfn. Base Imprimir 700.0 nm 0.085 A Cub. 1

Método test.msc

Barrido Inicio 400 Intervalo 5

Espectrofotómetro Modo Medida Velocidad Parámetro

Gráfico máximo eje-Y 0.25 mínimo eje-Y 0

Rastreo de Picos Picos Valles Umbral 0.01 A

Info de muestra [test.msc]

Operario trador/USER-127EEF5F7C

Medir referencia Rellenar

Localización	Nombre de muestra	Descripción
1		
2		
3		
4		
5		

Medir Cerrar

En la sección **nombre de la muestra** debe ingresar obligatoriamente los nombres de cada una de las muestra en forma ordenada empezando de la **1** de acuerdo al orden de las celdas que se han colocado en el espectrofotómetro.

El relleno de la sección o columna de **descripción** para cada muestra es opcional y al final el cuadro quedará de la siguiente forma como se muestra en la Imagen N° 7

Imagen N° 7

Archivo Medir Opciones Ayuda

Medir Muestras Lfn. Base Imprimir 700.0 nm 0.086 A Cub. 1

Método test.msc

Barrido Inicio 400 Intervalo 5

Espectrofotómetro Modo Medida Velocidad Parámetro

Gráfico máximo eje-Y 0.25 mínimo eje-Y 0

Rastreo de Picos Picos Valles Umbral 0.01 A

Info de muestra [test.msc]

Operario trador/USER-127EEF5F7C

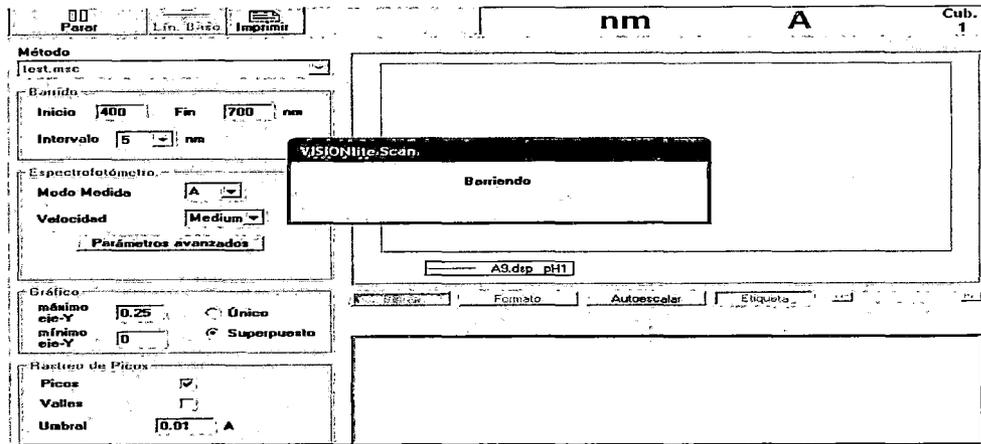
Medir referencia Rellenar

Localización	Nombre de muestra	Descripción
1	AS	pH1
2	BS	pH4.5
3		
4		
5		

Medir Cerrar

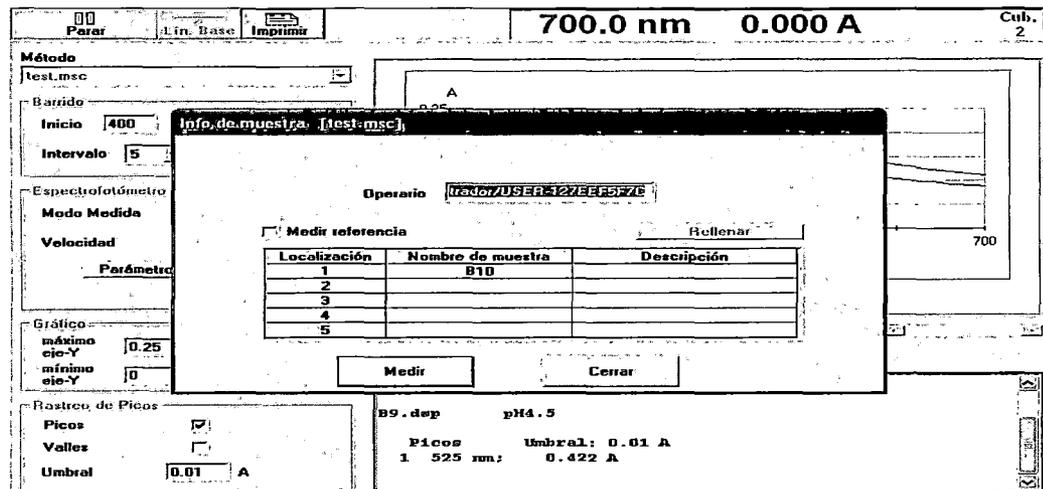
Después oprimir la opción **Medir** y aparecerá el siguiente cuadro como se muestra en la Imagen N° 8

Imagen N° 8



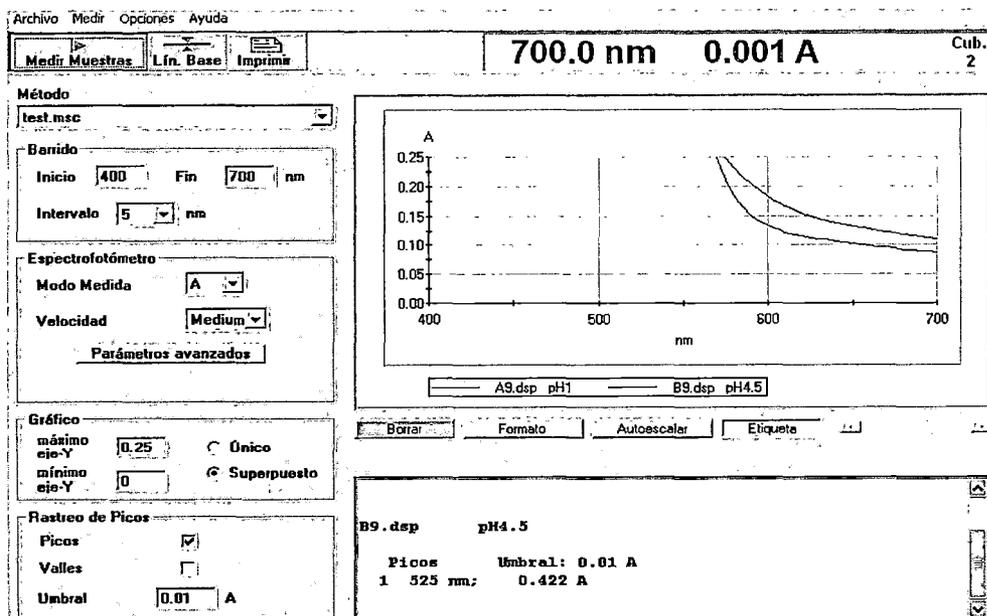
Esperar hasta que aparezca el siguiente cuadro, como se muestra en la Imagen N° 9

Imagen N° 9



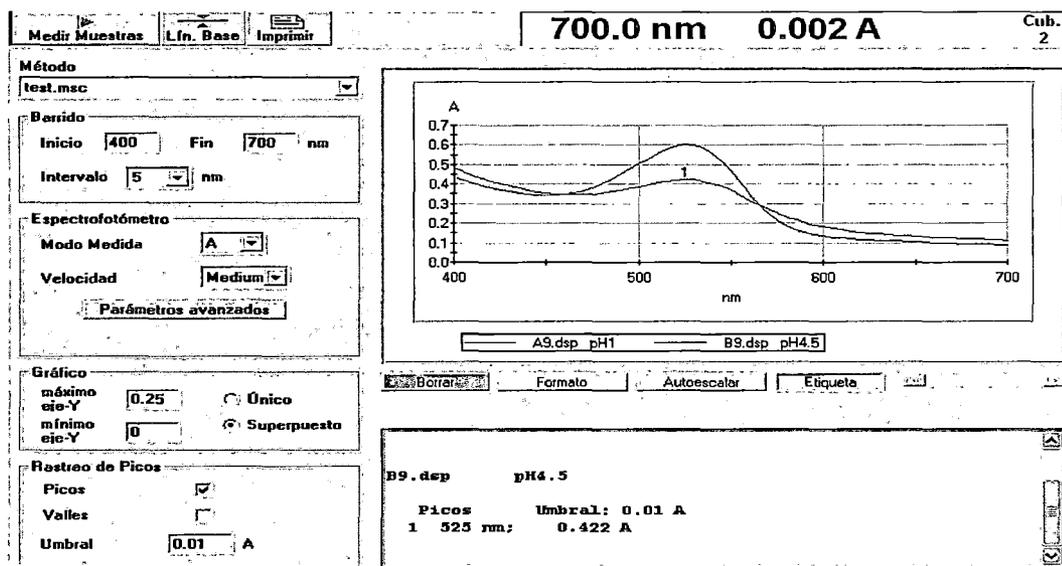
Oprimir la opción **cerrar** y aparecerá el siguiente resultado, como se muestra en la siguiente imagen N° 10

Imagen N° 10



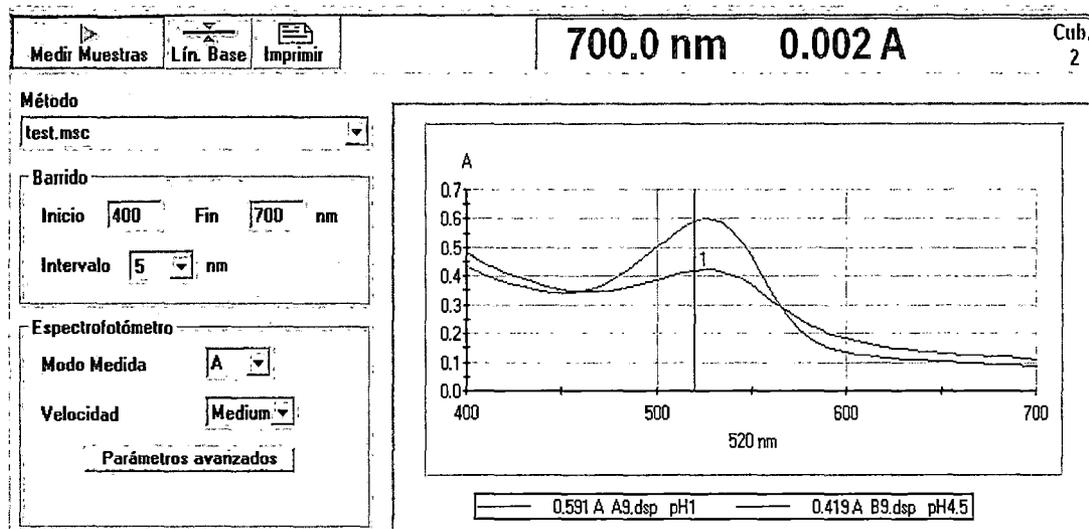
Para ver la gráfica completa oprimir la opción **Autoescalar** y aparecerá la gráfica completa tal como se muestra en la imagen N° 11.

Imagen N° 11



Para ver los valores de la absorbancia y la longitud de onda, se debe señalar con el puntero sobre la gráfica y aparecerán los valores requeridos, como indica la Imagen N° 12

Imagen N° 12



3.1.6 Método de pH diferencial

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio de pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. Conociendo que, la forma de oxonio coloreada predomina a pH 1,0 y la forma hermicetal incolora a pH 4,5, se establece el método de **pH diferencial**, que se basa en esta reacción para medir el total de antocianinas (*Giusti, M.M y Wrolstad, R.E*).

Se utiliza un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6, las mediciones se realizan a las longitudes de onda de 520 nm y 700 nm. El contenido de antocianinas es calculado como cianidina-3-glucósido, usando como coeficiente de extinción molar 26900 L/ (mol.cm) y como peso molecular 449,2 g/mol.

3.1.6.1 Cuantificación de antocianinas por pH diferencial

Se prepara diluciones del extracto etanólico con solución buffer pH 1,0 de cloruro de potasio y con solución buffer pH 4,5 de acetato de sodio; luego se mide la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de 520 nm y a 700 nm. De la ecuación de **Lambert-Beer** se obtiene la concentración molar del analito en la muestra diluida sometido a la lectura en el espectrofotómetro, $C=A/\epsilon L$, **C** es la concentración molar, **A**

es la absorbancia, ϵ corresponde a la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar, L es la longitud de recorrido en cm.

La concentración en **mg/L** contenida en el extracto original (muestra no diluida) puede ser determinada multiplicando el resultado de la concentración molar en la muestra diluida por el peso molecular (PM) del pigmento seguida por el factor de dilución (FD). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antocianina presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina (PM = 449,2 y $\epsilon = 26900$). Por lo anterior la concentración de antocianinas monoméricas se obtiene con la siguiente ecuación:

$$A_m = \text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A) (PM) (FD) (1000)}{\epsilon(l)} \quad 3.1$$

$$A = \text{Absorbancia} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5} \quad 3.2$$

Donde:

A_{520} = Absorbancia promedio de la antocianina

A_{700} = Lectura de corrección debida a sustancias interferentes

PM = Cianidina 3 – glucósido = 449,2 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$

FD = Factor dilución

$\epsilon = 26900 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$

$l = 1 \text{ cm}$

1000 = Factor de conversión de g a mg

3.2 EVALUACIÓN DE LA ABSORBANCIA

Según lo recomendado por la AOAC (**Método Oficial** 2005.02), la medición final de la absorbancia como resultado de la lectura en la muestra apropiadamente diluida de la alícuota tomada del volumen inicial normalizado de **extracto** obtenido a partir de la muestra analizada, utilizando cada uno de las soluciones Buffers, debe estar necesariamente dentro del rango de absorbancia de 0,2 a 1,4 medidos

a la longitud de onda de 520 nm, para garantizar un buen resultado en el cálculo del contenido de antocianinas.

3.3 MATERIALES E INSTRUMENTOS

Como materia prima para el estudio se utilizaron:

- Coronta de maíz morado
- Uva
- Fresa
- Otros

Entre los principales equipos utilizados durante la investigación se tienen:

- Espectrofotómetro digital, *SPECTRONIC GENESYS™ 6*
- Balanza analítica
- Tituladores volumétricos
- pH metro
- Termómetros digitales
- Agitadores - mezcladores
- Centrifuga
- Otros

Igualmente, se dispuso de un conjunto de materiales de vidrio tales como: probetas, pipetas, vasos, matraces aforados, etc., de acuerdo a los requerimientos específicos de cada prueba experimental.

CAPÍTULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Se describen las principales acciones operativas secuenciales desarrolladas durante la experimentación sistematizada, describiendo las condiciones bajo las cuales se ha procedido el estudio, reporte y generación de los resultados experimentales, con ensayos paralelos en función a la reproducibilidad y confiabilidad de los datos, con la finalidad de minimizar las interferencias y errores operativos, cuyos resultados se analizarán y discutirán en el siguiente capítulo.

4.1 PRUEBAS EXPLORATORIAS

Las pruebas exploratorias se realizaron en colaboración con los responsables de los Laboratorios de Transferencia de Masa y de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia.

La muestra pulverulenta de concentrado de antocianina obtenida a partir del extracto acuoso del colorante a partir del maíz morada fue obtenida en el Laboratorio de Transferencia de Masa mediante el secado por atomización del extracto concentrado, con el cual se trabajó todas las pruebas exploratorias.

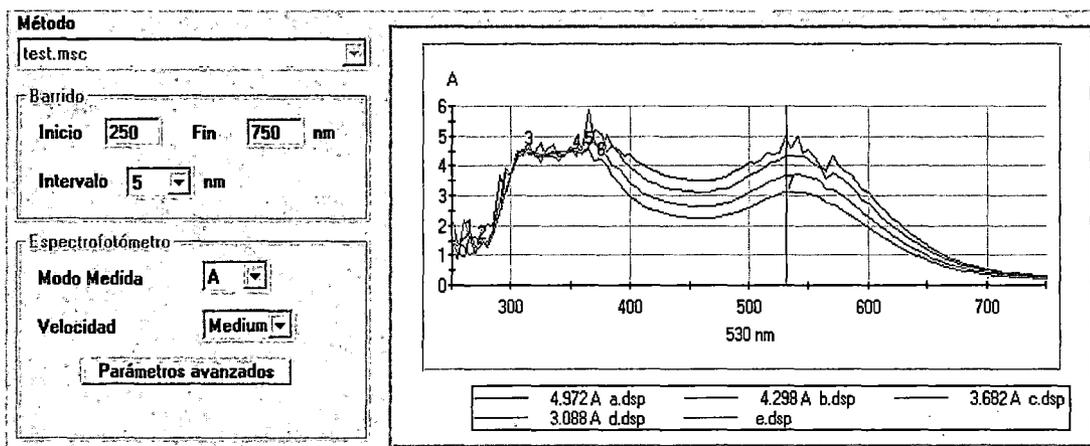
4.1.1 Pruebas básicas de evaluación espectrofotométrica

Se pesó 0,5 gramos de la muestra concentrada de polvo de antocianina y se preparó la disolución en una fiola de 250 mL utilizando agua destilada, luego se procedió con el filtrado y de esta solución se separó 4 alícuotas de igual volumen para luego diluir con agua destilada cada una de ellas en diferentes proporciones (*Tabla N° 4.1*) y finalmente se realizó la lectura de la absorbancia entre 250 a 750 nm en el espectrofotómetro **Genesys 6**, obteniéndose resultados tal como se muestra en la *Figura N° 4.1*

Tabla N° 4.1 Proporción de dilución extracto: agua destilada, para un extracto de 0,50 g/250 mL.

Nombre	Proporción de dilución
a	1:0
b	1:1
c	1:3
d	1:9

Figura N° 4.1 Curvas de absorbancia del extracto de antocianina (0,50 g/250 mL) en agua destilada sin modificación de pH.



Como se muestra en la *Figura N° 4.1*, para la prueba de absorbancia del extracto en sólo agua destilada sin modificación de pH, la curva es un poco distorsionada y difusa en algunas regiones, presenta más de un pico máximo y por el grado de concentración inicial presenta valores de absorbancia fuera del rango establecido (0,2 a 1,4), estos resultados indica que existe la necesidad de administrar la estrategia de diluir el extracto.

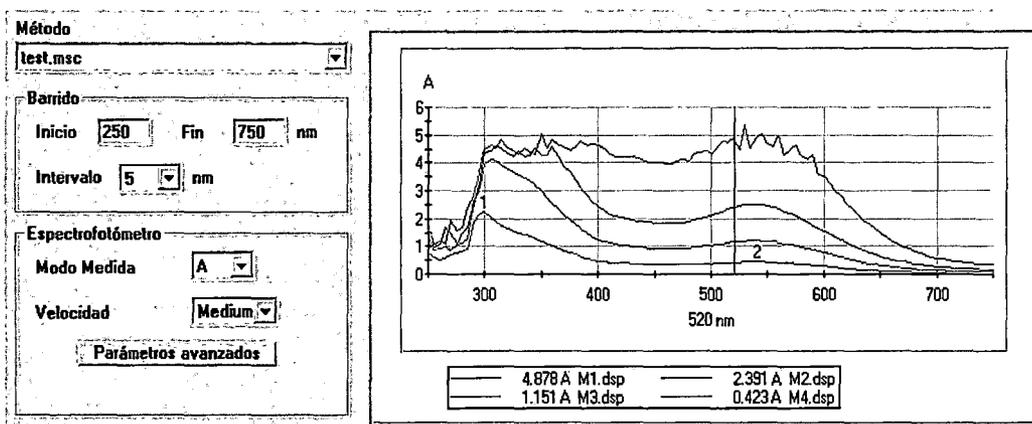
4.1.2 Regulación de concentración de la antocianina

De acuerdo a los resultados preliminares obtenidos en la *Figura N° 4.1*, existe la necesidad de diluir el extracto. Se procedió a pesar 0,25 g de la muestra de concentrado de antocianina y fue disuelto y enrasado en una fiola de 250 mL con agua destilada, luego se procedió con el filtrado y de esta dilución se separó 4 alícuotas iguales para diluir con agua destilada a cada una de ellas, volviéndose a determinar la absorbancia en el rango de absorbancia de 250 nm a 750 nm, el resultado se aprecia en la *Figura N° 4.2*.

Tabla N° 4.2 Proporción de dilución extracto: agua destilada, para un extracto de 0,25 g/250 mL.

Nombre	Proporción
M1	1:0
M2	1:1
M3	1:3
M4	1:9

Figura N° 4.2 Curvas de absorbancia para extracto (0,25 g/ 250 mL) de concentrado de antocianina sin modificación de pH.



En la *Figura N°4.2*, como resultado de la regulación de la concentración de la antocianina, se observa que la curva M1 (con bajo factor de dilución), es la que presenta mayor distorsión en su curva y con más de un pico máximo al igual que su valor de absorbancia aún es muy alto, a diferencia de M3 y M4 que presentan menos distorsiones en sus curvas, presentando una función regular y continua, además sus valores de absorbancia están dentro del rango establecido (0,2 a 1,4). En las tres curvas más diluidas, la región más distorsionada se encuentra a una absorbancia menor a los 350 nm aproximadamente.

4.1.3 Evaluación espectrofotométrica en función del pH

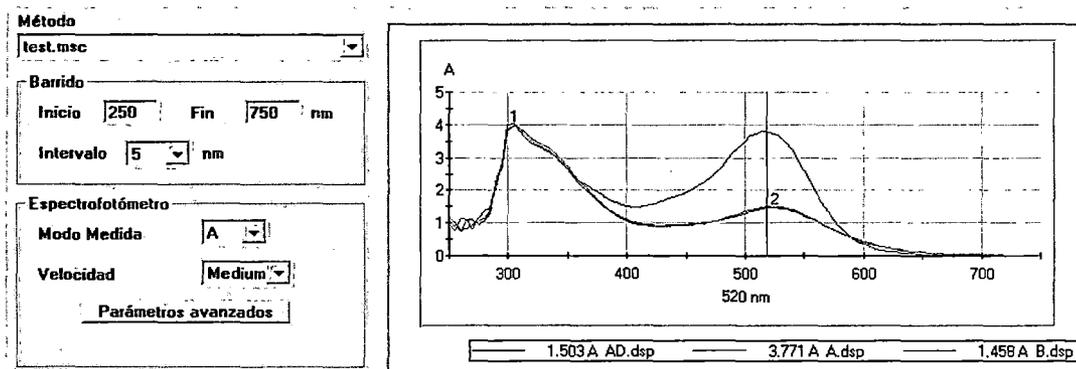
En base a la información de la evaluación espectrofotométrica del contenido de antocianinas en diferentes medios ácidos, se procedió con la evaluación de la absorbancia del extracto en agua destilada, luego en soluciones Buffers o tampón de pH = 1,0 y de pH = 4,5. Para lo cual, se preparó la disolución de 2,5 g de concentrado de antocianina pulverulento y enrasó en una fiola de 250 mL con agua destilada, esta fue filtrada y a partir de esta solución se tomó 3 alícuotas de la misma cantidad, la primera alícuota fue diluida con agua destilada y las 2 siguientes alícuotas de extracto fueron diluidas con el buffer de pH = 1,0 y con el de pH = 4,5 por separados, la disoluciones de todas se realizó

en la proporción 1:19 y finalmente fue llevado a la lectura en el espectrofotómetro *Genesys 6* en un barrido de 250 a 750 nm con un intervalo de 5. El resultado se aprecia en la *Figura N° 4.3*.

Tabla N° 4.3 Alícuotas de extracto en agua destilada y en medios ácidos con solución buffer.

Código de muestra	Medios de ensayo	Proporción de dilución
A.D	Alícuota 1 con Agua destilada	1:19
A	Alícuota 2 con Buffer de pH 1,0	
B	Alícuota 3 con Buffer de pH 4,5	

Figura N° 4.3 Curvas de absorbancia del extracto en agua destilada y en medios ácidos con modificación de pH.



En la *Figura N°4.3* se observa claramente la influencia del pH en la curva de la absorbancia, adquiriendo mayor absorbancia y por lo tanto mayor amplitud para las mediciones en una solución muy ácida como es con el buffer de pH = 1,0; además, sobre los 370 nm se percibe una separación entre la solución buffer de pH = 1,0 y la de pH = 4,5. La solución buffer de pH = 4,5 y la del agua destilada presentan curvas casi superpuestas.

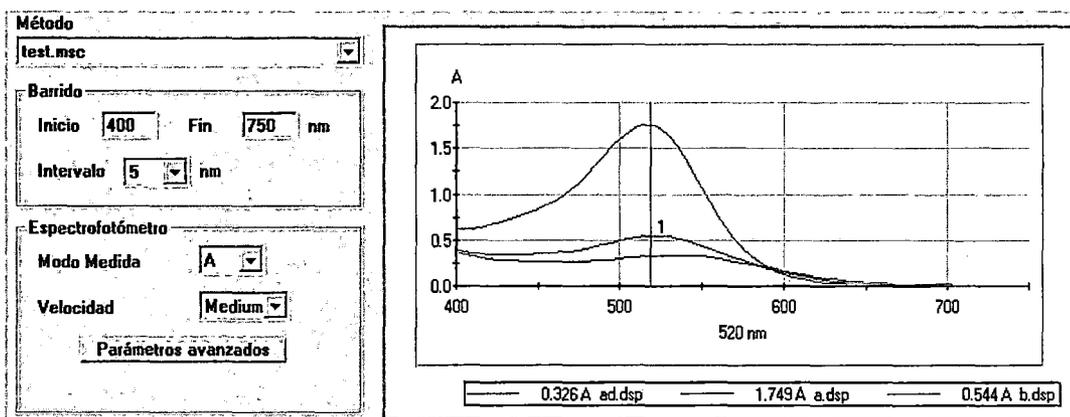
Debido al nivel de concentración inicial relativamente alto o al bajo factor de dilución aplicado al extracto utilizado como alícuota, se percibe que los valores de absorbancia son relativamente altos y están fuera del

rango establecido (0,2 a 1,4); además se observa que la curva de absorbancia no presenta una distorsión o irregularidad severa, con una función continua y regular especialmente sobre los 300 nm.

4.1.4 Evaluación del rango de absorbancia y factor de dilución

En base a los resultados previos existe la necesidad de evaluar apropiadamente la dilución en función a la concentración inicial de la muestra de extracto; además, de acuerdo a la información bibliográfica y la respuesta de la absorbancia en el medio ácido se considera disminuir la zona de medición al rango de 400 a 750 nm. Se procedió repetir el mismo ensayo del punto 4.1.3, pero incrementando el factor de dilución en la proporción de 1:24, es decir con un factor de dilución igual a 25, obteniéndose el siguiente resultado.

Figura N° 4.4 Curvas de absorción en agua destilada y medios ácidos para una dilución 1:24

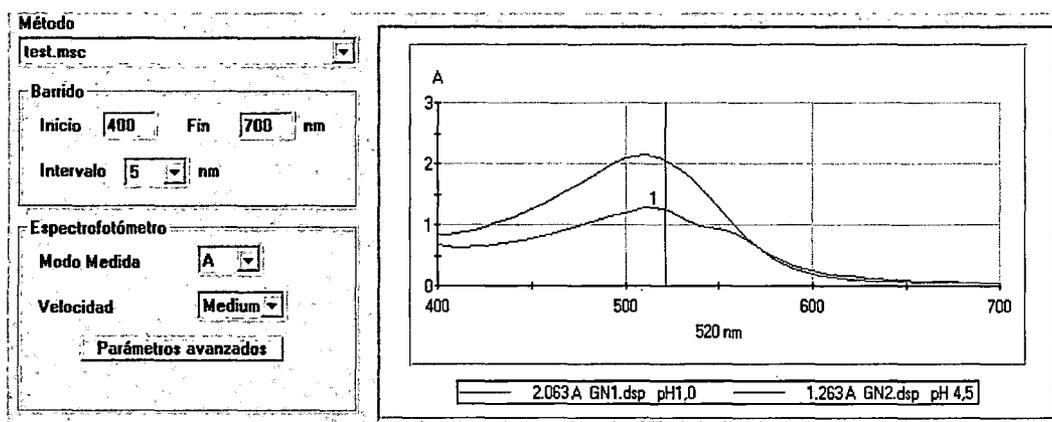


En la *Figura N° 4.4*, se observa una mejor resolución de la absorbancia y con valores enmarcados bastante bien en el rango recomendado, de la misma forma la curva presenta una función regular y con un solo pico máximo bien definido a los 520 nm. Igualmente se reconfirma la influencia y variación del pico con el pH del medio, siendo mayor a un pH menor (1,0), igualmente es ligeramente menor en el agua destilada con respecto al del buffer de pH = 4,5.

4.1.5 Evaluación espectrofotométrica de la muestra patrón

En vista a que los resultados obtenidos en el punto 4.1.4 se encuentran dentro de los parámetros establecidos, se procedió a repetir el mismo ensayo del punto 4.1.4, pero con la muestra patrón que fue proporcionada por la Empresa **Globe Natural**, para confirmar la similitud o diferencias que existen con el concentrado de antocianina obtenido mediante el secador por atomización obtenido en el Laboratorio de Transferencia de Masa (UNSCH).

Figura N° 4.5 Curva de absorción del concentrado proporcionado por **Globe Natural**



Se observa en la *Figura N° 4.5* que la diferencia entre los valores de absorbancia son menores a 1, tanto con el Buffer de pH 1,0 como con el Buffer de pH 4,5, es decir, existe una similitud entre las dos muestras analizadas, con esta comparación se confirma de que el procedimiento que se ha estado siguiendo es aceptable.

4.2 TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN MUESTRAS

En la bibliografía se reportan diversas técnicas de extracción de antocianinas y los principales factores que influyen en dicha extracción, pero cabe mencionar que estas se refieren a la extracción o lixiviación intensiva de materias prima con contenido de antocianinas, como son el maíz morado. Sin embargo, es necesario diferenciar entre la extracción

intensiva y la extracción analítica de una pequeña muestra para fines de cuantificación de contenido de antocianinas.

Se conoce que la lixiviación está influenciada primordialmente por la granulometría de la materia prima (definida por la molienda), el tipo de solvente utilizado (mayormente agua), el pH del medio (tendiente a los medios ácidos), la temperatura (cercanos al punto de ebullición) y la relación sólido/solvente, siendo en muchos casos industriales los lixiviados en múltiples etapas o en sistemas de contacto continuo diferencial sólido-líquido.

Luego, la extracción de las muestras para análisis espectrofotométrico de contenido de antocianinas, requieren desarrollar una tecnología apropiada que garanticen una extracción total del colorante, sin afectar ni degradar los componentes, considerando los aspectos difusionales para la transferencia de masa de los colorantes desde la matriz sólida de la muestra hacia el solvente utilizado para dicho fin. Para cuyo efecto, se han realizado diversas pruebas que maximicen la extracción de las antocianinas en las muestras (de unos 5 a 20 g), teniendo en cuenta la humedad inicial de la muestra y la respuesta de absorbancia final.

4.2.1 Preparación de la muestra

Se debe tener en cuenta que para el tratamiento de las muestras se deben tener en cuenta diversos factores, entre ellos:

- Su estado físico (mayoritariamente sólido y semisólido, y en algunos casos líquidos).
- El tipo de matriz portante de la antocianina (en el caso de muchos sólidos es un componente orgánico).
- El tipo de analito (en nuestro caso la antocianina) y su concentración.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que en todos los pasos se deben evitar **errores sistemáticos** (de laboratorio) que originarían una

variación en el resultado de la composición química de la muestra, tales como:

- La contaminación de la muestra (es decir, que se incorpore a la muestra alguna sustancia que no contenía).
- La pérdida de analito (por ejemplo, si hay que hacer algún trasvase, que no queden restos de analito en el camino, etc.).

Los principales pasos a seguir para la preparación de una **muestra sólida**, son los siguientes:

a. Desinfectado (Higiene)

El desinfectado se procederá dependiendo en qué condiciones se encuentra la materia a analizar, es decir, como materia prima o como una muestra lista para ser analizado ya sea seca, semi-seca o líquido (extracto), si es como materia prima es necesario proceder con el desinfectado para disminuir la carga microbiana, preferentemente utilizando una solución diluida de cloro en agua, y si la materia prima es como una muestra lista para analizar ya no es necesario el proceso de desinfectado.

b. Acondicionamiento de la muestra

Las materias prima serán acondicionadas dependiendo del tipo de especie o de su condición morfológica en la cual presenta mayor potencialidad de antocianinas, por decir, en caso de maíz morada tanto la coronta y el grano serán acondicionados ya que todo su aspecto morfológico presenta características de poseer potencialidades en antocianina. La coronta puede ser pulverizada o simplemente ser triturados utilizando morteros, molino de discos o de bolas, generalmente dependerá de la dureza de la muestra a acondicionar, en caso de los granos se presentan dos casos: separar la cutícula del grano la cantidad necesaria y el otro es determinar la relación existente entre el grano y su cutícula, luego determinar la cantidad necesaria del grano que se requiere para el análisis sin la necesidad de separar su cutícula.

En los casos de camote, uva, ciruela y otros similares a estas materias prima, la potencialidad de antocianina se presenta sólo en su cáscara o epidermis por lo que será necesario separar estas para proceder con el análisis y expresar en función a la fracción analizada. No necesariamente todas las partes morfológicas de las materias primas presentan las características de poseer cantidades potenciales de antocianinas.

c. Homogenización

Una vez acondicionado la muestra es necesario homogenizar, ya sea todas las muestras obtenidas de diferentes partes morfológicas de la materia prima como el tamaño homogéneo de la muestra obtenida y luego determinar la muestra representativa que será sometido para el análisis de antocianinas.

d. Determinación del porcentaje de humedad

El contenido de antocianinas serán determinadas en función a su base seca de la muestra, por este motivo es necesario determinar el porcentaje de humedad.

Se entiende que conforme la muestra es más seca el contenido de antocianinas es mayor, pero se si determina la humedad no es necesario realizar el proceso de secado de la materia a analizar, considerando además que, las técnicas de secado podrían afectar negativamente el contenido de antocianina en la muestra a analizar; luego, el contenido de antocianinas serán determinadas finalmente en función a su base seca; simplemente, en el caso de tener una muestra húmeda, será mayor la cantidad de muestra a utilizar para el análisis porque la muestra contiene mayor cantidad de agua y no materia seca.

e. Conservación

Si la muestra no es analizada de forma inmediata, para evitar que se produzca su degradación, se recomienda separar en partes iguales

(5 a 20 g) y sellar cada una de ellas en plástico polietileno luego rotularlo en el cual debe mencionar nombre de la muestra, peso, humedad y otros datos que pueden ser importantes.

La muestra se debe conservar en condiciones más favorables (si no es así, debido a factores físicos como la temperatura, la exposición a la luz o la naturaleza del contenedor se podrían producir cambios en la muestra que alterarían los resultados), el almacenamiento se debe realizar preferentemente en un lugar oscuro. No se recomienda almacenar las muestras por tiempos prolongados.

f. Secado.

En el caso de que la muestra sea húmeda y no es posible analizarlo de inmediato, es recomendable secarlo por liofilización para evitar pérdidas u otras anomalías degradativas del contenido de antocianinas y luego conservar como indica el paso e, hasta el momento de su análisis.

g. Pesado

El pesado se recomienda utilizando una balanza analítica, ya que el análisis requiere de mayor precisión, para obtener buenos resultados.

h. Obtención del extracto.

Con la muestra acondicionada, con el peso y humedad definido, se procede a obtener el extracto en un volumen normalizado y a partir del cual se procederá con la dilución apropiada para el análisis espectrofotométrico del extracto utilizando cada uno los buffers seleccionados y finalmente obtener la lectura en el espectrofotómetro.

Se debe tener en consideración que a menor tamaño de partícula se tiene una buena extracción del colorante por parte del solvente, debido a que se disminuye la trayectoria y la resistencia difusiva del analito en la matriz sólida; sin embargo, se presenta otro problema, que es la eficiencia de filtración, debido a que la presencia de pequeñas partículas

sólidas muy finas (debido a una filtración deficiente) estarían presentes en el extracto, luego éstos afectarán significativamente el registro de la absorbancia.

En el caso de **muestras líquidas** proporcionadas para su análisis, no es necesario realizar todos los pasos indicados y descritos para la preparación de muestras sólidas, simplemente se procede a realizar un buen filtrado y analizar de forma inmediata el analito a través de la técnica espectrofotométrica, y los resultados obtenidos se deberán expresar necesariamente en mg/L de muestra líquida recepcionada para el análisis, o considerando que el extracto (si fuera acuoso) sea de una similitud cercana al agua con densidad 1,0 g/L, entonces será expresada en mg/kg de "líquido"; es decir, mg de antocianina por kg o L de extracto o muestra líquida analizada.

4.2.2 Temperatura de extracción del analito

Los resultados promedios obtenidos con solución etanólica 80 y 90% de pH 2,0, tienen desviación mínima, es por esta razón que se propone considerar para la evaluación de la temperatura de extracción y el número de etapas de extracción reiterativas más apropiadas para el análisis del analito; para lo cual se utiliza la solución etanólica de 80% y a un pH de 2,0. Se evalúa la extracción reiterativa o de corriente cruzada, para optimizar la re-extracción, obteniendo como resultado que a partir de la segunda hacia la quinta etapa de extracción, los filtrados presentan mínimos aportes al incremento de la concentración final; en base a éstos resultados se propone sólo realizar dos etapas de extracción de la muestra sólida, acumulándose los filtrados y normalizando el volumen final para los propósitos de la evaluación espectrofotométrica.

Para la optimización de la temperatura apropiada para la extracción máxima del analito, en este caso la antocianina, para fines de cuantificación, se planteó tres alternativas de temperatura de extracción

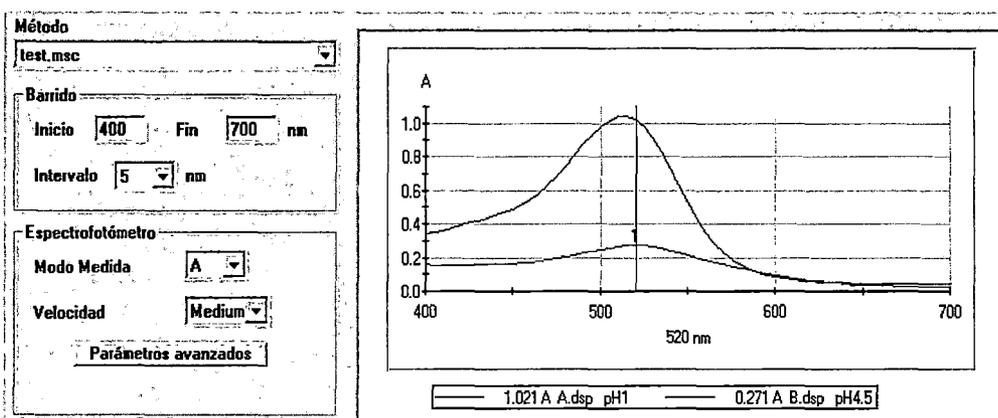
en las muestras sólidas y semisólidas, las cuales fueron realizadas por triplicado, a continuación se presenta los resultados.

A. Extracción a temperatura ambiente

Para la extracción de la antocianina se ha utilizado 5 g de la muestra húmeda inicial de la coronta de maíz morada molida, con una humedad del 8,40%, la cual nos garantiza que tenemos 4,58 g de la muestra en base seca, al cual se le añadió 100 mL de etanol al 80% acidificado con HCl (pH 2,0), bajo agitación magnética a sombra durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica hasta obtener una solución clara, este se logró en tres procesos. Los extractos obtenidos en cada re-extracción fueron combinados y llevado a un volumen de 334 mL aumentando solución etanólica.

1 mL del extracto o alícuota fue diluido con cada uno de los Buffers de pH 1,0 y pH 4,2 (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm) para leer la absorbancia frente a un blanco a 520 y 700nm en el espectrofotómetro Genesys 6, obteniendo los siguientes resultados.

Figura N° 4.6 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, extracto obtenido a una T= 20 °C y t= 2 horas

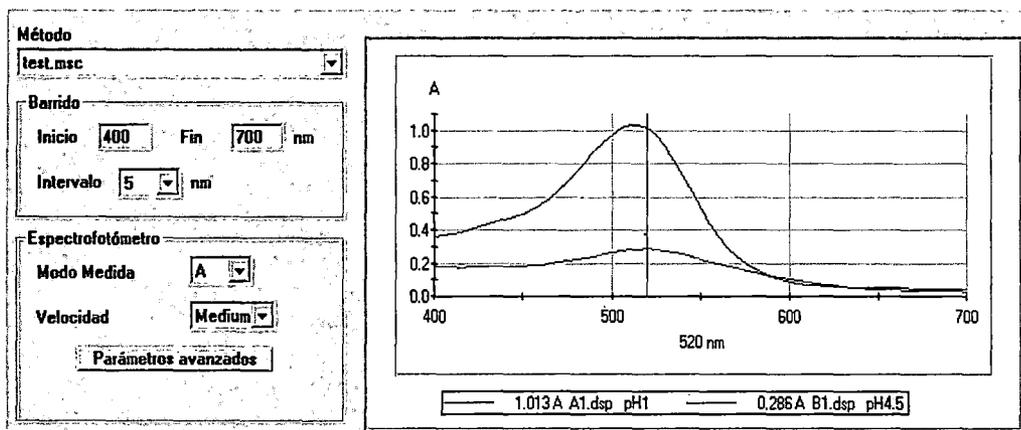


$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 1.021$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,271$
 $A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,039$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,022$

B. Extracción a 60 °C

Para esta etapa se realizó el mismo procedimiento de la primera evaluación descrita a temperatura ambiente, a diferencia que la temperatura de extracción fue a 60 °C. Obteniendo los siguientes resultados.

Figura N° 4.7 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, muestra obtenido a una T= 60 °C y t= 2 horas

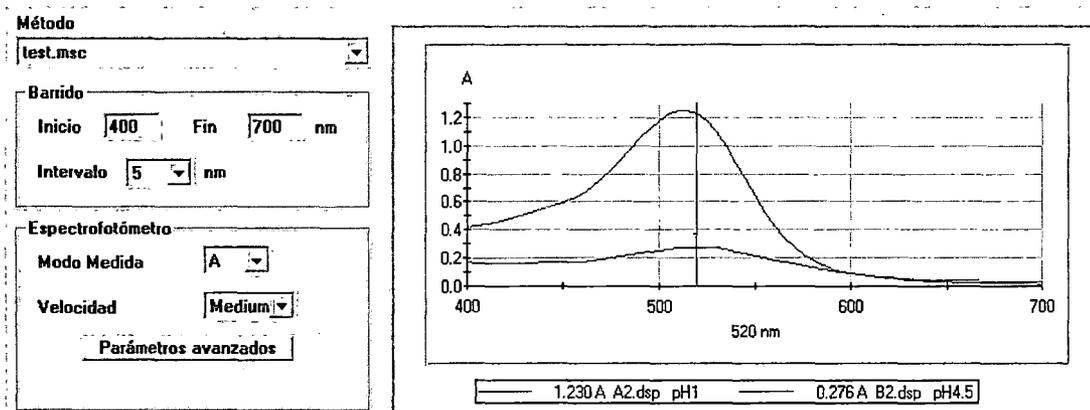


$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 1.013$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,286$
 $A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,042$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,029$

A. Extracción a ebullición

En la tercera técnica se realizó los mismos procedimientos realizados en las pruebas anteriores, a diferencia que la temperatura de extracción fue alrededor de 72 °C (temperatura de ebullición suave de la solución etanólica) y el tiempo de 7 a 8 minutos, en dos etapas, es decir dos filtrados o una re-extracción. Obteniendo los siguientes resultados como promedio.

Figura N° 4.8 Curvas de absorción en medios ácidos para una dilución 1:34, muestra obtenido a ebullición y $t = 7$ a 8 min, en dos etapas.



A (520 nm y $\text{pH}=1,0$) = 1.230; A (520 nm y $\text{pH}=4,5$) = 0,276
 A (700 nm y $\text{pH}=1,0$) = 0,028; A (700 nm y $\text{pH}=4,5$) = 0,018

Como se observa en la *Figura N° 4.8* los valores de absorbancia reportados para la tercera evaluación, realizada para una extracción alrededor del punto de ebullición, presenta valores mayores que a los de la primera y la segunda prueba; por lo tanto, la extracción a ebullición presenta mayor grado de extracción de la antocianina, luego es aceptable. Además en la pasantía realizada a la Empresa **Globe Natural**, se respalda esta tercera evaluación, ya que dicha empresa utiliza una técnica parecida a ésta y nos recomienda seguir y mejorar esta técnica.

Los mejores resultados obtenidos en promedio fueron a la temperatura de ebullición de la solución etanólica al 80 % utilizada en la extracción por unos 7 a 8 minutos que corresponden alrededor de los 72 °C, regulado previamente a un pH de 2,0 y con una filtración fina que evite el paso de las partículas finas.

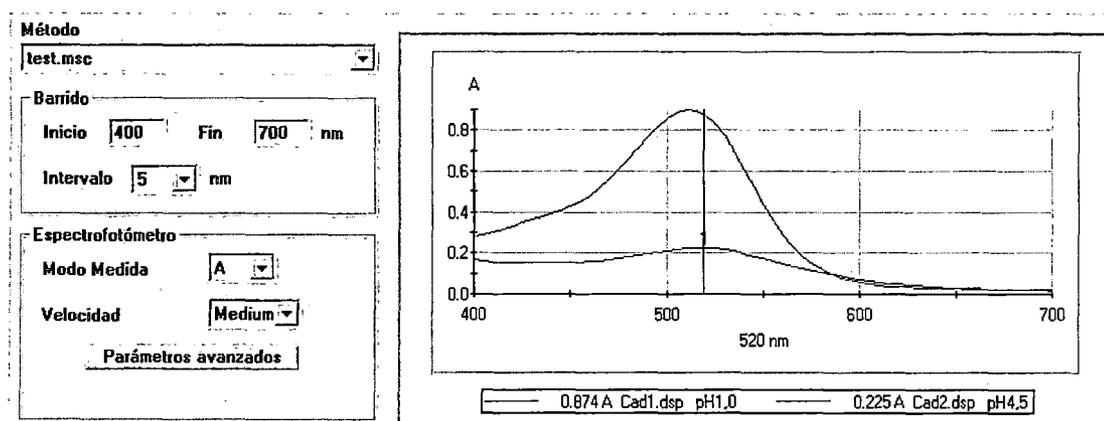
4.2.3 Extracción con agua

Para la extracción de antocianina se ha utilizado 5 gramos de muestra húmeda (m_{Hr}) de la coronta de maíz morada molida, que registra un 8,84 % en peso de humedad inicial (%H), la cual nos garantiza una

disponibilidad de 4,558 g de materia seca o muestra en base seca, a la cual se le añade para la extracción 200 mL de agua destilada, extrayendo a la temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos y luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con agua destilada a la misma temperatura y tiempo, nuevamente se filtró. Los filtrados fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL enrasando con agua destilada.

Para la evaluación espectrofotométrica se utilizó dos sistemas tampón o soluciones buffer: (A) ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y (B) ácido clorhídrico/acetato de sodio de pH 4,5 (0,4 M). 1 mL de la muestra o alícuota del extracto, fue diluido con 24 mL de correspondiente solución tampón (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm) y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm, obteniéndose los siguientes resultados.

Figura N° 4.9 Absorbancia para muestra extraída solamente con agua destilada.



$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,874$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,225$

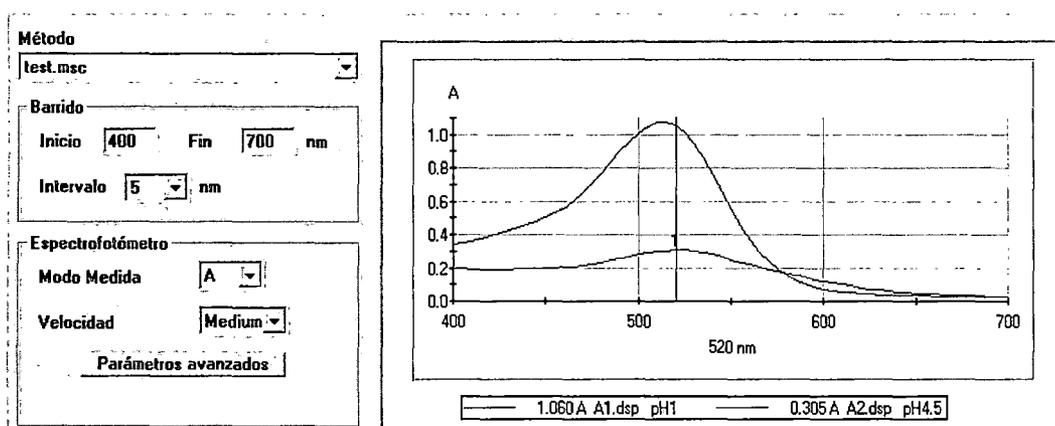
$A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,019$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,017$

4.2.4 Extracción con solución etanólica

En base a los resultados obtenidos en el punto 4.2.2, se propone utilizar como solvente para la extracción la solución etanólica al 80% pH 2,0 y

utilizar la muestra como mínimo 5 g, realizar 2 filtrados, es decir una re-extracción, luego llevar el extracto obtenido a un volumen conocido (500 mL). Para la primera parte de extracción de antocianinas solamente se utilizará 200 mL de solución etanólica y otros 200 mL para la re-extracción, los 100 mL restantes fue utilizado para los enjuagues, facilitar el filtrado, esto con la finalidad de evitar pérdidas durante el filtrado del extracto y enrasar al volumen final de 500 mL para obtener el extracto normalizado para la evaluación espectrofotométrica.

Figura N° 4.10 Absorbancia en el análisis de muestras sólidas extraídas con solución etanólica al 80 %.



$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 1,060$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,305$
 $A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,025$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,027$

Como se observa en las Figuras 4.9 y 4.10, la absorbancia es mucho mayor cuando la muestra es extraída con solución etanólica que con el agua, debido a que la solución etanólica presenta mayor capacidad extractiva de los pigmentos de antocianina a diferencia del agua pura; por lo tanto, es recomendable para una mejor extracción y cuantificación el uso de la solución etanólica al 80 % en volumen.

4.2.5 Reproducibilidad de los resultados

Luego de haber establecido la técnica espectrofotométrica para evaluar el contenido de antocianinas, se determinó la repetitividad o reproducibilidad de los resultados utilizando el espectrofotómetro digital

Genesys 6 para dicha técnica, con la finalidad de conocer el error estándar o cuota de error que presenta la misma. Para lo cual se ha realizado tres ensayos de extracción y normalización utilizando la misma muestra (cutícula del grano del maíz morado) en las mismas condiciones, con los mismos parámetros y obteniéndose lecturas triplicadas de cada alícuota con el espectrofotómetro para determinar contenidos totales de antocianinas, se muestran en el *Tabla N°4.4*.

Tabla N° 4.4 Valores promedios obtenidos del mismo tipo de muestra con las mismas condiciones y parámetros.

Numero de muestra	X _i
	Contenido de antocianinas totales (mg/g)
1	30,06
2	31,29
3	31,29

$$\text{Media} = X = \frac{\sum_1^n X_i}{n} = 30,88$$

$$\text{Moda} = 31,29$$

$$\text{Varianza} = S^2 = \frac{\sum_1^n (X_i - X)^2}{n - 1} = 0,5043$$

$$\text{Desviación estandar} = S = \sqrt{\frac{\sum_1^n (X_i - X)^2}{n - 1}} = 0,710$$

$$\text{Error estandar o cuota de error} = S_x = \frac{S}{\sqrt{n}} = 0,410$$

Del resultado se tiene que el error o cuota de error que presenta la técnica al ser aplicado en la determinación de antocianinas es de 0,4.

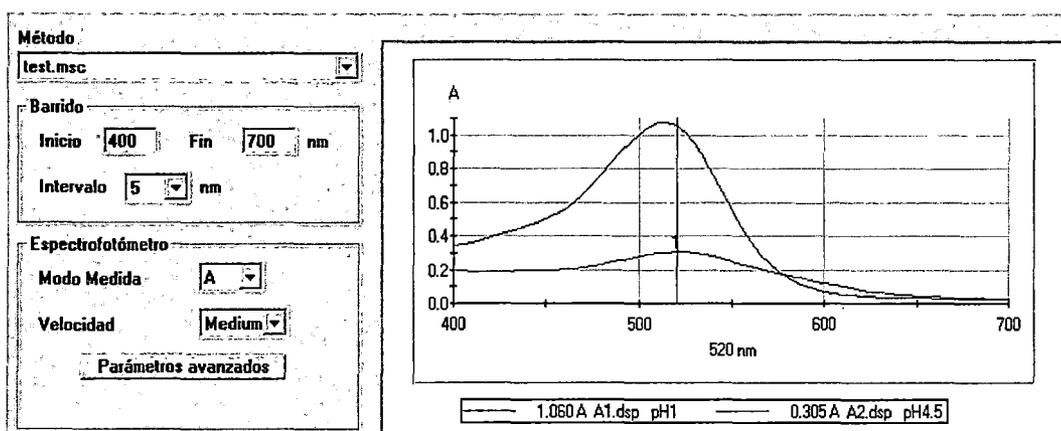
4.3 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO POR pH DIFERENCIAL

La extracción de antocianina se realizó siguiendo la técnica estandarizada de extracción etanólica de la muestra; para lo cual se ha utilizado 5 g de muestra húmeda (m_{Hr}) de la coronta de maíz morado molido, que registra un 8,84 % en peso de humedad inicial (%H), la cual

nos garantiza una disponibilidad de 4,558 g de materia seca o muestra en base seca, a la cual se le añade para la extracción 200 mL de etanol al 80% en volumen, acidificado con HCl (pH = 2), extrayendo a la temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos y luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, nuevamente se filtró. Los filtrados fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL enrasando con la solución etanólica.

Para la evaluación espectrofotométrica se utilizó los dos sistemas tampón o soluciones buffer: (A) ácido clorhídrico/cloruro de potasio de pH 1,0 (0,025 M) y (B) ácido clorhídrico/acetato de sodio de pH 4,5 (0,4 M). Luego, a 1 mL de una muestra o alícuota de extracto, se añadió 24 mL de la correspondiente solución tampón (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm) y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm, obteniéndose los siguientes resultados:

Figura N° 4.11 Absorbancia en el análisis de muestras de coronta de maíz morada.



$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 1,060$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,305$
 $A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,025$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,027$

Con los resultados anteriores se procede a determinar la absorbancia final en pH diferencial de la muestra para luego determinar el contenido

de antocianinas monoméricas totales expresado en mg/L de extracto, utilizando las ecuaciones 2.12 y 2.13 ó 3.1 y 3.2:

$$A = \text{Absorbancia} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

$$A = (1,060 - 0,025) - (0,305 - 0,027) = 0,757$$

$$A_m = \text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{(A) (PM) (FD) (1000)}{\varepsilon(l)}$$

Donde:

$$FD = 25$$

$$PM = 449,2 \text{ g/mol}$$

$$\varepsilon = 26900 \text{ L/(mol.cm)}$$

$$l = 1 \text{ cm}$$

$$A_m = \frac{(0,757)(449,2)(25)(1000)}{(26900)(1)} = 316,03 \text{ mg/L}$$

$$\%AT_{\text{mx}} = 3.47\%$$

Lo cual se interpreta como un contenido de 316,03 mg de antocianina por cada litro de extracto inicial normalizado; vale decir, del extracto etanólico resultante en la extracción de la muestra de coronta de maíz morado.

Por otra parte, con la finalidad de contrastar el resultado de la presente investigación, la misma muestra utilizada en los experimentos descritos y en la misma cantidad (5 g), también fue analizada en el laboratorio de la *Empresa Globe Natural*, siguiendo su propia tecnología de preparación de muestra y análisis espectrofotométrico, con sus propios parámetros de cálculo que utiliza dicha empresa, en la cual se obtuvo el siguiente resultado:

$$\%Ant. = \frac{1,340 \times 35 \times 334}{5 \times 1 \times 982} = 3,19\%$$

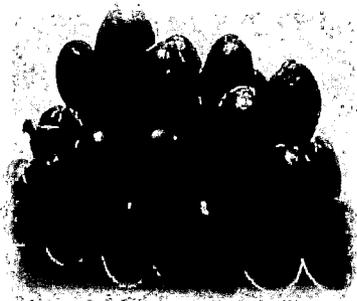
4.4 EVALUACIÓN DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES DE LA REGIÓN

Se seleccionó aquellos productos de interés Agroindustrial de la región de Ayacucho que poseen ciertas características potenciales de contenido de antocianinas. Algunos son productos trascendentales ranquiados a nivel mundial y otros son aquellos que están en el proceso de desarrollo o a los que se le ha dado menor importancia a pesar de las propiedades benéficas que poseen, tanto nutricionales como de salud.

Todos los productos se han muestreado apropiadamente, determinando la cantidad de muestra húmeda a utilizarse para el ensayo de análisis espectrofotométrico, teniendo como referencia la humedad inicial de la misma, con el propósito de disponer una muestra equivalente a 5 g en base seca y aplicar la técnica de extracción etanólica y determinación espectrofotométrica de antocianinas por el método de pH diferencial.

4.4.1 Cascara de Uva negra

Este producto fue recolectado en la localidad de Wayacondo



La uva presenta mayor potencialidad de antocianinas en su cáscara (epidermis), la pulpa es de color verde claro que tiene una tendencia a ser transparente, razón por el cual fue analizado solo la parte epidérmica para determinar el contenido total de antocianina que contiene este producto.

Acondicionamiento de la muestra

Después de haber recepcionado el producto fue lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, esto con la finalidad de disminuir la carga microbiana y luego fue escurrido, en seguida se separó la parte de cáscara, luego una parte de esta fue llevada para determinar el porcentaje de humedad (%H), ya que el contenido de antocianina final deberá ser determinado en función a la base seca del material analizado.

Determinación de la humedad y cantidad de la muestra requerida

Se cargan 2,282 g de la muestra en el contenedor metálico del determinador digital de humedad para determinar el %H, obteniéndose un contenido del 77,39 % de humedad. Con este resultado se determina la cantidad de muestra húmeda (m_{Hr}) de cáscaras de uva que se necesitaría en el análisis para disponer en ella por lo menos de 5 g de materia seca o muestra en base seca (m_x).

$$m_{Hr} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)}$$

$$m_{Hr} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{77,39}{100}\right)} = 22,11 \text{ g}$$

Esto implica que, se requiere disponer de unos 22,11 g de cáscaras de uva, como muestra húmeda, tal como se dispone originalmente, en la cual se dispondría de 5 g de muestra en base seca; por lo tanto, para iniciar inmediatamente la extracción etanólica de la muestra para la determinación espectrofotométrica, no se requiere someter la muestra nativa a la operación de secado, salvaguardando en lo posible el contenido original de antocianinas en la muestra recibida en el laboratorio; porque, la forma de secado y almacenamientos de la materia prima previa al análisis afectarían el contenido de antocianinas.

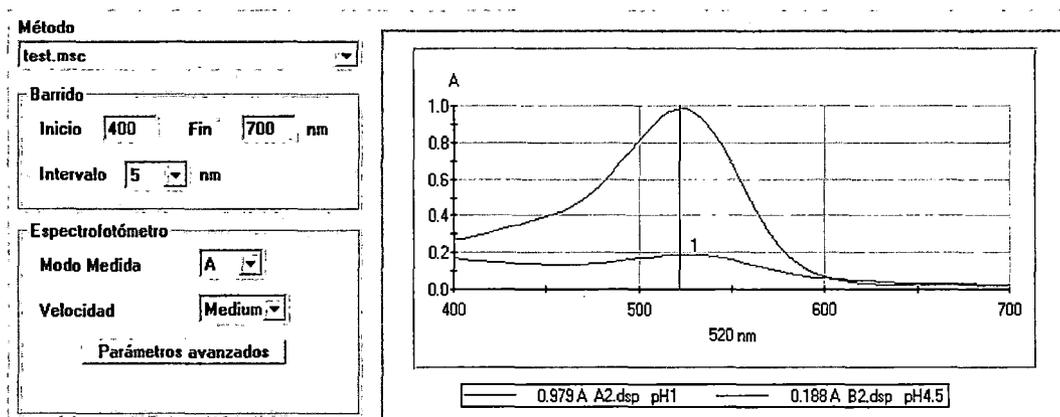
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó en 22,11 g de la muestra húmeda con 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH=2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, nuevamente se filtró. Los filtrados fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL y enrasado usando la solución etanólica, quedando lista el extracto normalizado.

Determinación de la Absorbancia

Haciendo uso de las soluciones buffers de pH = 1,0 y de pH = 4,5, a 1 mL de la muestra de extracto normalizado se añadió 9 mL de la solución tampón y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro *Genesis 6* frente a un blanco a 520 y 700 nm, obteniéndose el siguiente resultado:

Figura N° 4.12 Curva de absorbancia en la evaluación de la concentración de antocianina en la cáscara de la uva.



$$\begin{aligned} A(520 \text{ nm y pH}=1,0) &= 0,979; & A(520 \text{ nm y pH}=4,5) &= 0,188 \\ A(700 \text{ nm y pH}=1,0) &= 0,015; & A(700 \text{ nm y pH}=4,5) &= 0,021 \end{aligned}$$

Determinación de contenido de antocianinas totales.

Siguiendo los cálculos aplicados en la determinación del contenido de antocianinas realizado para la coronta de maíz morado, para este caso de la evaluación de las cáscaras de uva se tiene los siguientes resultados:

$$\begin{aligned} A &= (0,979 - 0,015) - (0,188 - 0,021) = 0,797 \\ A_m &= \frac{(0,797)(449,2)(10)(1000)}{(26900)(1)} = 133,09 \text{ mg/L} \end{aligned}$$

4.4.2 Parte externa de la Fresa

Este producto fue obtenido en la localidad de Chiara



Este producto presenta mayor potencialidad de antocianina en su parte externa, la pulpa es de color rosado claro que tiene una tendencia a ser transparente, por ende solo la parte externa se analizó para determinar el

contenido total de Antocianina.

Acondicionamiento de la muestra.

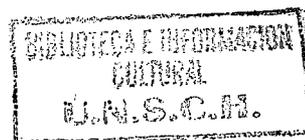
Después que la materia prima ha sido recepcionado fue lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, para disminuir la carga microbiana y luego fue escurrido, en seguida se separó la parte externa y una parte de este fue llevada para determinar el %H, ya que el contenido de antocianina será determinado en función a su base seca del muestra o material en análisis.

Determinación de la Humedad y cantidad de la muestra requerida.

3,391 g de la muestra fue cargada al contenedor metálico del analizador digital de humedad para determinar el %H, en el cual se registró 90,62% de humedad. Con este resultado se determinó la cantidad necesaria de muestra húmeda (m_{Hr}) para asegurarse en ella por lo menos 5 g de muestra en base seca (m_x).

$$m_{Hr} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{90,62}{100}\right)} = 53,3 \text{ g}$$

Este resultado implica, que se requiere 53,3 g de muestra húmeda de la parte externa de la fresa, para asegurarse como mínimo 5 g de la muestra en base seca, al conocer el %H implica, que no es necesario realizar el secado de la muestra, sino puede ser analizado con originalidad y sin riesgo de degradar el contenido de antocianinas al someter a la acción térmica de un secador, y finalmente obtener buenos resultados.



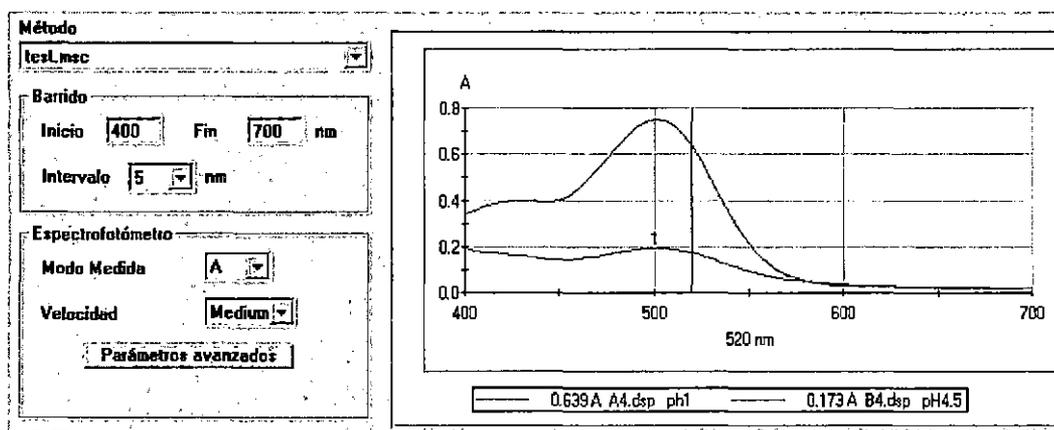
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó con 53,3 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la misma solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, obteniendo el segundo filtrado. Los extractos fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL usando la misma solución etanólica, al final se obtuvo volumen normalizado del extracto, el cual fue analizado.

Determinación de la Absorbancia

Haciendo el uso de los soluciones buffer de pH =1,0 y de pH = 4,5, a 1 mL de la muestra o alícuota se añadió 4 mL de solución buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesis 6, frente a un blanco de 520 y 700 nm, obteniendo los siguientes resultados.

Figura N° 4.13 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la parte externa de la fresa



A (520 nm y pH=1,0) = 0,639; A (520 nm y pH=4,5) = 0,173
 A (700 nm y pH=1,0) = 0,017; A (700 nm y pH=4,5) = 0,018

Determinación de contenido de antocianinas totales.

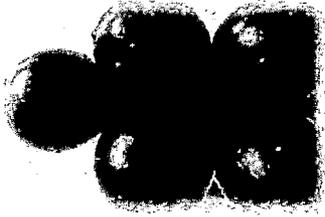
Utilizando los mismos cálculos para las demás muestras se ha determinado, en este caso el contenido de antocianinas en la parte externa de la fresa, obteniendo los siguientes resultados.

$$A = (0,639 - 0,017) - (0,173 - 0,018) = 0,467$$

$$A_m = \frac{(0,467)(449,2)(5)(1000)}{(26900)(1)} = 38,99 \text{ mg/L}$$

4.4.3 Cáscara de la Ciruela

Esta materia prima fue obtenida en la localidad de Ocos.



La ciruela presenta características de poseer mayor potencialidad de antocianina en su parte de cáscara, la pulpa es de color crema que tiene una tendencia a ser transparente, razón por el cual solo la parte epidérmica fue analizada.

Acondicionamiento de la muestra

Después de la recepción de la materia prima fue lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, con el cual se disminuye la carga microbiana y luego se procedió con el escurrido, en seguida se separó la parte epidérmica (cáscara) y una parte de este fue analizado su %H, con el cual se determinó la cantidad necesaria de muestra húmeda, para tener como mínimo 5 g de muestra en base seca.

Determinación de la humedad y cantidad de la muestra requerida.

3,284 g de la muestra fue pesada en el contenedor metálico del analizador digital de humedad para determinar el %H, en el cual se obtuvo como resultado 81,66 % de humedad. Con esta resultado se determinó la cantidad de la muestra húmeda que se necesita para disponer en ella 5 g de muestra en base seca.

$$m_{\text{Hr}} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{81,66}{100}\right)} = 27,28 \text{ g}$$

Se requiere para el análisis necesariamente 27,28 g de muestra húmeda, para asegurarse 5 g muestra en base seca.

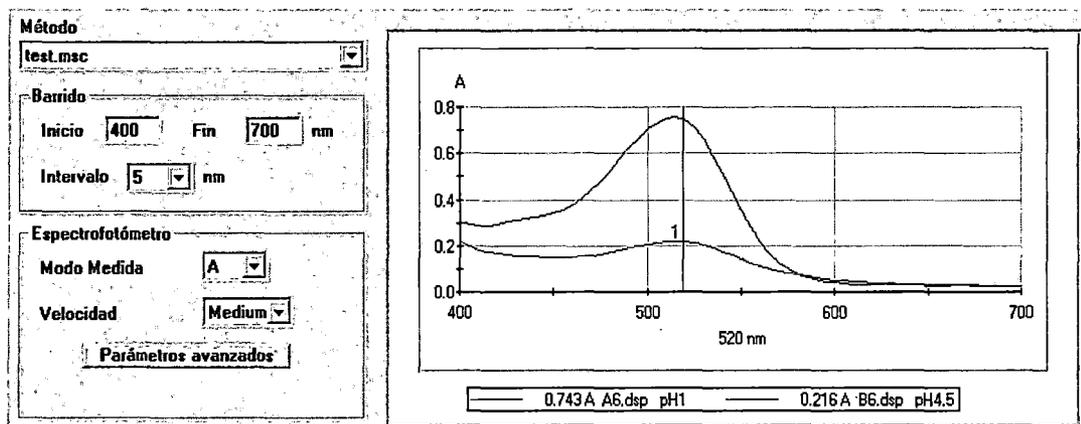
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó con 27,28 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante 7-8 minutos, luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente sometida a la re-extracción utilizando la misma solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, nuevamente se realizó el segundo filtrado. Los extractos obtenidos de las dos filtraciones fueron combinados y llevados a una fiola de 500 mL usando misma solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Haciendo el uso de los dos soluciones buffer tanto de pH=1,0 como de pH = 4,5, se añadió a 1 mL del extracto de volumen normalizado 9 mL del correspondiente buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco de 520 y 700 nm, del cual se obtuvo los siguientes resultados.

Figura N° 4.14 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la cáscara de ciruela.



$A (520 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,743$; $A (520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,216$

$A (700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,022$; $A (700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,025$

Determinación de contenido de antocianinas totales

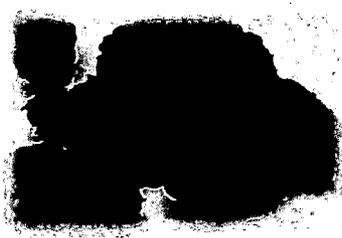
Para la determinación del contenido total de antocianinas, se utilizó las mismas ecuaciones utilizadas para los demás productos, en este caso se determinó el contenido total de antocianinas en la epidermis de la ciruela.

$$A = (0,743 - 0,022) - (0,216 - 0,025) = 0,53$$

$$A_m = \frac{(0,53)(449,2)(10)(1000)}{(26900)(1)} = 88,5 \text{ mg/L}$$

4.4.4 Mora

La mora fue recolectado en la ciudad universitaria (módulos)- UNSCH.



Este producto presenta características de poseer mayor potencialidad de antocianina tanto en la cáscara como en la pulpa. Por lo que para el análisis se consideró el extracto de todo el producto.

Acondicionamiento de la muestra

Después que la mora ha sido recolectado, seleccionado de acuerdo a su madurez, fue lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, para disminuir la carga microbiana y escurrido, en seguida se trituró toda la mora y una parte de este fue llevada para determinar el %H, para asegurarse la cantidad necesaria de muestra húmeda que se requiere y tener como mínimo 5 g de muestra como base seca.

Determinación de la humedad y cantidad de la muestra requerida.

2,884 g de la muestra húmeda fue cargada al contenedor metálico de analizador digital de humedad para determinar el %H, en el cual se registró 84,07 % de humedad. Con este resultado se determinó la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida, asegurándose como mínimo 5 g de muestra en base seca.

$$m_{\text{Hr}} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{84,07}{100}\right)} = 31,39 \text{ g}$$

Este implica, que la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida es de 31,39 g que garantice 5 g en base seca.

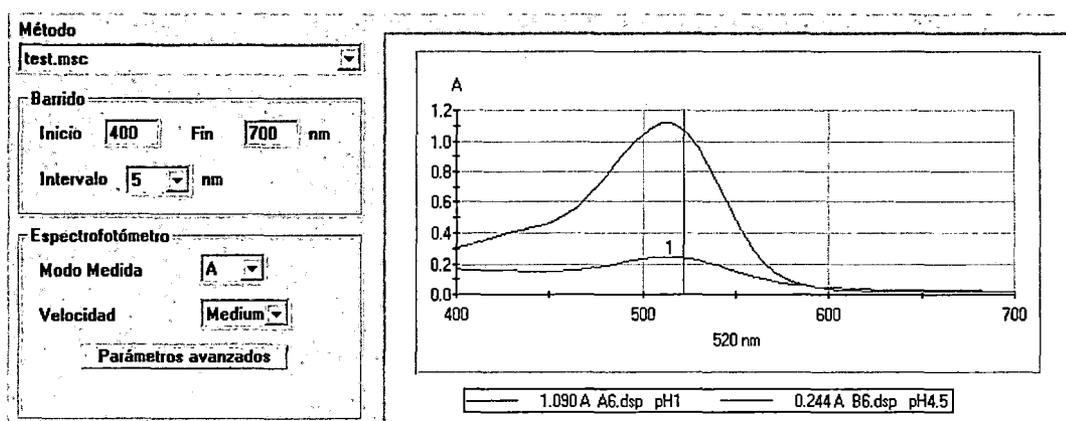
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó con 31,39 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante un tiempo en primera etapa de 7 a 8 minutos, luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la misma solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, nuevamente se filtró. Los extractos obtenidos fueron combinados y llevados a un volumen inicial normalizado de 500 mL usando la misma solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Haciendo el uso de soluciones buffer de pH = 1,0 y de pH= 4,5, a 1 mL del extracto de volumen inicial normalizado se añadió 14 mL de la correspondiente buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm. En el cual se obtuvo los siguientes resultados

Figura N° 4.15 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la mora



$$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 1,090; \quad A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,244$$

$$A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,012; \quad A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,018$$

Determinación de contenido de antocianinas totales.

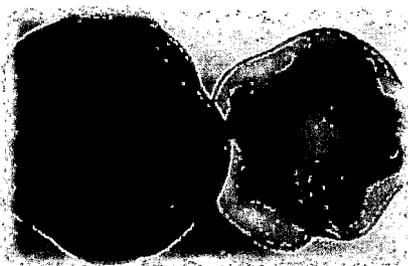
Para determinar el contenido total de antocianinas se utilizó los mismo cálculos que para los demás materia primas.

$$A = (1,090 - 0,012) - (0,244 - 0,018) = 0,852$$

$$A_m = \frac{(0,852)(449,2)(15)(1000)}{(26900)(1)} = 213,41 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

4.4.5 Papa (médula interna)

Este producto fue obtenido en la localidad de Sachabamba



La papa presenta características de poseer antocianinas generalmente en la parte epidérmica y en la médula interna. Por lo que se consideró conveniente analizar por separado las partes

morfológicas que presentan mayor contenido de antocianinas.

Acondicionamiento de la muestra

Después que la materia prima ha sido recepcionado fue sometido a un lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro para disminuir la carga microbiana. se realizó una revisión visual a la morfología de dicha materia prima, con la finalidad de identificar las partes que presentan características de poseer antocianinas, en el cual se estable que las partes morfológicas de interés para el análisis es la parte epidérmica y la médula interna.

La papa fue cortada y separada la parte de la yema que tiene una coloración morada, en una parte de este muestra se determinó el %H, con este resultado se obtuvo la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida para el análisis y asegurarse 5 g de muestra en base seca.

Determinación de la Humedad y cantidad de la muestra requerida.

En el contenedor metálico del analizador digital de humedad fue cargada 2,348 g de la muestra húmeda para determinar el %H, en el cual se registró 65,21 % de humedad. A partir de este resultado se ha determinado la cantidad de muestra húmeda requerida con un contenido de 5 g en base seca.

$$m_{\text{Hr}} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{65,21}{100}\right)} = 14,37 \text{ g}$$

Este resultado indica, que la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida es de 14,37 g en el cual está contenido 5 g de muestra en base seca.

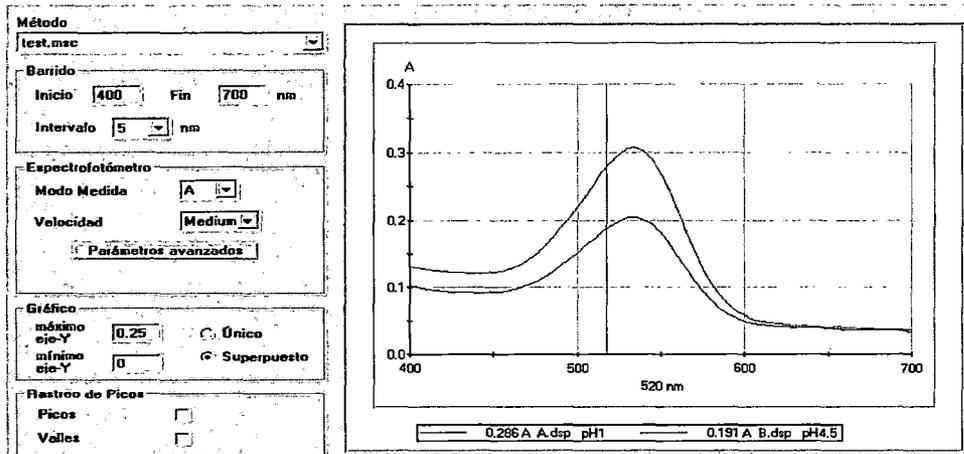
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó utilizando 14,37 g de la muestra húmeda con 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante un tiempo de 7 a 8 minutos, luego se obtuvo el primer filtrado. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, obteniendo el segundo filtrado. Los extractos obtenidos fueron combinados y llevados a un volumen inicial normalizado de 500 mL usando la misma solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Con el uso de soluciones buffer de pH =1,0 y de pH= 4,5, a 1 mL de la muestra se añadió 1 mL de la correspondiente buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm. Obteniéndose los siguientes resultados.

Figura N° 4.16 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la papa (medula interna)



$A(520 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,286$; $A(520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,191$
 $A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,036$; $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,034$

Determinación de contenido de antocianinas totales.

$$A = (0,286 - 0,036) - (0,191 - 0,034) = 0,093$$

$$A_m = \frac{(0,093)(449,2)(2)(1000)}{(26900)(1)} = 3,11 \text{ mg/L}$$

4.4.6 Papa (epidermis)

Obtenido en la localidad de Sachabamba



Como ya se mencionó anteriormente en el punto 4.4.5 una breve descripción sobre el contenido de antocianina en la papa, en esta parte solo se realizó un análisis netamente en la parte epidérmica.

Acondicionamiento de la muestra

La parte epidérmica, comúnmente conocido como la cascara fue separado y en una parte de esta muestra se determinó el %H, dato necesario para determinar la cantidad de muestra húmeda requerida y para asegurarse como mínimo 5 g de muestra en base seca.

Determinación de la Humedad y cantidad de la muestra requerida.

2,348 g de la muestra húmeda fue cargada al contenedor metálico del analizador digital de humedad para determinar el %H, en el cual se determinó 65,01 % de humedad. A partir de este resultado se obtuvo la cantidad de muestra húmeda requerida y con un contenido de 5 g de muestra como base seca.

$$m_{\text{Hr}} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{65,01}{100}\right)} = 14,28 \text{ g}$$

Para el análisis se requiere 14,28 g de muestra húmeda el cual contiene 5 g como muestra en base seca.

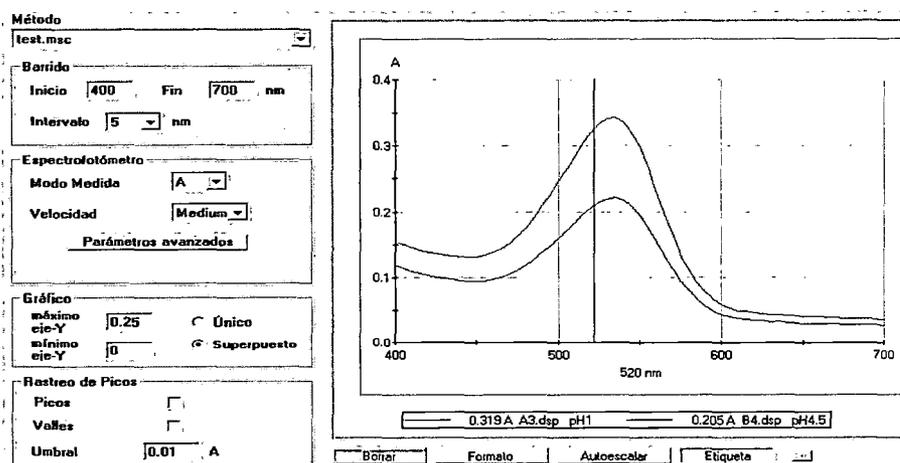
Extracción de antocianinas en la muestra

Para la extracción se utilizó 14,28 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se filtró. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la misma solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, obteniendo el segundo filtrado. Los extractos obtenidos de los dos filtrados fueron combinados y llevados a un volumen inicial normalizado de 500 mL usando solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Se utilizó dos sistemas buffer de pH =1,0 y de pH= 4,5. A 1 mL de la muestra se añadió 1 mL del correspondiente tampón o buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm. Obteniendo como resultados los siguientes

Figura N° 4.17 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la papa (epidermis)



A (520 nm y pH=1,0) = 0,319; A (520 nm y pH=4,5) = 0,205
 A (700 nm y pH=1,0) = 0,035; A (700 nm y pH=4,5) = 0,025

Determinación de contenido de antocianinas totales.

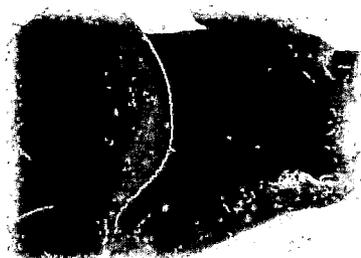
Para determinar el contenido total de antocianinas en la epidermis de la papa se utilizó los mismos cálculos utilizados para los demás materias primas.

$$A = (0,319 - 0,035) - (0,205 - 0,025) = 0,104$$

$$A_m = \frac{(0,104)(449,2)(2)(1000)}{(26900)(1)} = 3,47 \text{ mg/L}$$

4.4.7 CAMOTE (morado)

Este producto fue obtenido en la localidad de Tambo



El camote presenta características de poseer mayor potencialidad de antocianinas en la parte epidérmica de su morfología. Por lo que se consideró conveniente analizar esta parte de la materia prima.

Acondicionamiento de la muestra

Después de haber recepcionado la materia prima fue lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, esto con la finalidad de disminuir la carga microbiana y luego fue escurrido, en seguida fue separado su cascara (epidermis) y una parte de este fue llevada para determinar el %H, a partir del cual se determinara la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida y con un contenido de 5 g muestra como base seca.

Determinación de la Humedad y cantidad de la muestra requerida.

Se cargó al contenedor metálico del analizador digital de humedad, 2,113 g de la muestra húmeda para determinar el %H, en el cual se registró 75,56 % de humedad. Con este dato se determinó la cantidad necesaria de muestra húmeda requerida, asegurándose de que contiene como mínimo 5 g de muestra como base seca.

$$m_{\text{Hr}} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{75,56}{100}\right)} = 20,46$$

La muestra húmeda requerida para el análisis es 20,46 g, que contiene como 5 como la muestra en base seca.

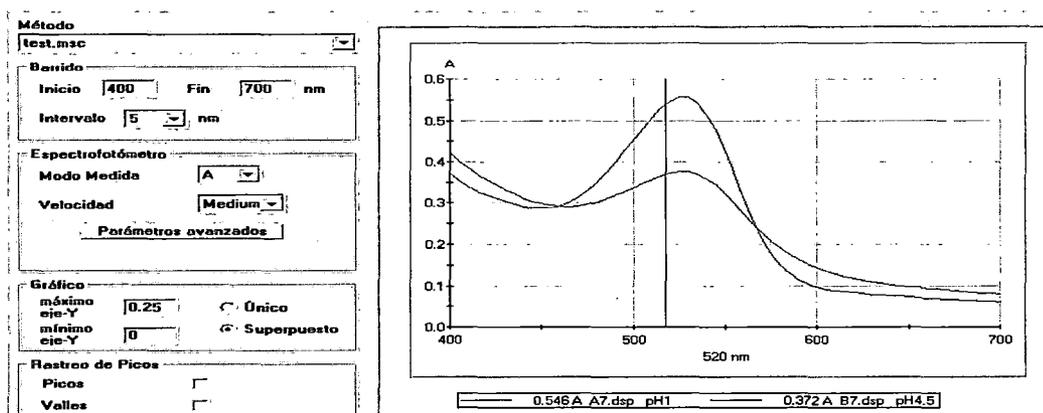
Extracción de antocianinas en la muestra

La extracción se realizó utilizando 20,47 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se obtuvo el primer filtrado. La torta residual del primer filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, finalmente se obtuvo el segundo y último filtrado. Los extractos obtenidos fueron combinados y llevados a un volumen inicial normalizado a 500 mL usando solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Haciendo uso de las soluciones buffer de pH=1, 0 y de pH= 4,5. A 1 mL de la muestra se añadió 2 mL del correspondiente tampón o buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesis 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm.en el cual se obtuvo los siguientes resultados.

Figura N° 4.18 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en la epidermis del camote



$$A (520 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,546; \quad A (520 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,372$$
$$A (700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,060; \quad A (700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,080$$

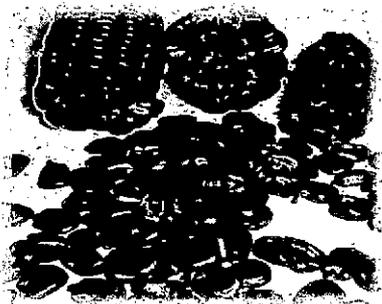
Determinación de contenido de antocianinas totales.

Para determinar la cantidad total de antocianinas en el camote se utilizó los mismos cálculos utilizados para los demás muestras. Obteniendo el siguiente resultado.

$$A = (0,546 - 0,060) - (0,372 - 0,080) = 0,194$$
$$A_m = \frac{(0,194)(449,2)(3)(1000)}{(26900)(1)} = 9,72 \text{ mg/L}$$

4.4.8 MAÍZ MORADO (cutícula del grano)

Este producto fue obtenido en la localidad de Huanta.



El maíz morado es una de las materias primas por excelencia que se consumen a nivel mundial por su alto contenido de antocianinas, ya que este producto presenta características morfológicas ricas en antocianina case en su totalidad, en esta parte se analizó específicamente el grano de maíz morado ya que la coronta ha sido analizado en los primeros puntos del presente capítulo.

Acondicionamiento de la muestra

Después de la recepción de maíz morado se procedió con el desgranado, lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, esto con la finalidad de disminuir la carga microbiana, luego se dejó al aire libre por un cierto tiempo para el escurrido, después se realizó la separación de la cutícula del grano, en la que determina que la cutícula representa 10,24 % del grano. Una parte de la cutícula separado del grano fue llevada para determinar el %H, ya que este dato permitió determinar la cantidad de muestra húmeda requerida y asegurase 5 g de muestra contenida como base seca.

Determinación de la Humedad y cantidad de la muestra requerida.

2,376 g de la muestra húmeda fue cargada al contenedor metálico del analizador digital de humedad para determinar el %H, en el cual se obtuvo como resultado 46,70% de humedad. A partir de este resultados se determinó la cantidad necesaria muestra húmeda con 5 g de muestra como base seca.

$$m_{Hr} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} = \frac{5,0}{\left(1 - \frac{46,70}{100}\right)} = 9,38$$

Este implica que la muestra húmeda requerida para el análisis es de 9,38 g, que contiene 5 g de muestra como base seca.

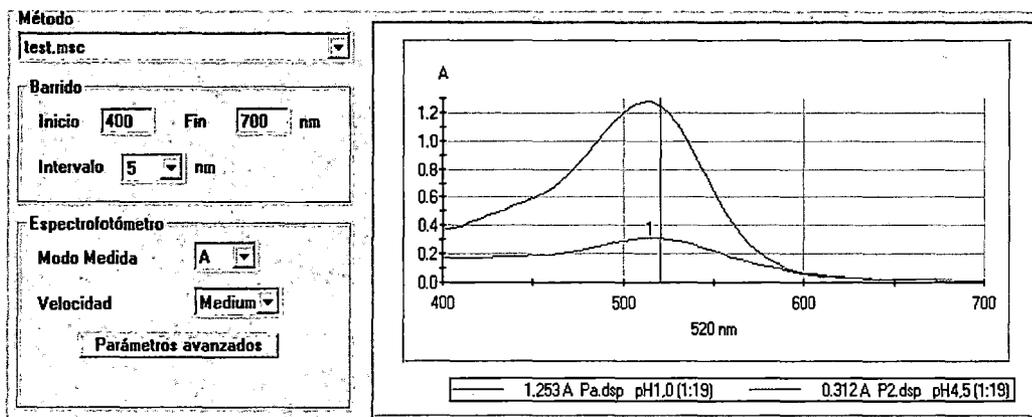
Extracción de antocianinas en la muestra

Para la extracción se utilizó 9,38 g de la muestra húmeda y 200 mL de solución etanólica al 80 % vol, acidificado con HCl (pH 2,0), a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se obtuvo el primer filtrado. La torta residual del filtrado fue nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, finalmente se obtuvo el último filtrado. Los extractos obtenidos fueron combinados y llevados a un volumen inicial normalizado a 500 mL usando solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Con el uso de las soluciones buffer de pH =1, 0 y pH =4,5. A 1 mL de la muestra se añadió 19 mL del correspondiente buffer y se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Genesys 6 frente a un blanco a 520 y 700 nm. En el cual se obtuvo los siguientes resultados.

Figura N° 4.19 Curva de evaluación de la concentración de antocianina en maíz morado (cutícula del grano)



A (520 nm y pH=1,0) = 1,253; A (520 nm y pH=4,5) = 0,312
A (700 nm y pH=1,0) = 0,014; A (700 nm y pH=4,5) = 0,010

Determinación de contenido de antocianinas totales.

Para determinar la cantidad total de antocianinas en el camote se utilizó los mismos cálculos utilizados para los demás muestras. Obteniendo el siguiente resultado.

$$A = (1,253 - 0,014) - (0,312 - 0,010) = 0,937$$
$$A_m = \frac{(0,937)(449,2)(20)(1000)}{(26900)(1)} = 312,94 \text{ mg/L}$$

Tabla N° 4.5 Resumen de la evaluación de productos agroindustriales de la región de Ayacucho.

Producto Agroindustrial	%H	m_{Hr} (g)	Factor de Dilución (FD)	contenido de antocianinas totales (mg/L)
Cáscara de la Uva negra	77,39	22,11	10	133,09
Parte externa de la Fresa	90,62	53,3	5	38,99
Cáscara de la Ciruela	81,66	27,28	10	88,5
Mora	84,07	31,39	15	213,41
Papa (médula interna)	65,21	14,37	2	3,11
Papa (epidermis)	65,01	14,28	2	3,47
Epidermis del Camote morado	75,56	20,46	3	9,72
Maíz Morado (cutícula del grano)	46,70	9,38	20	312,94

Todos los resultados obtenidos para diferentes tipos de materias primas han sido en base del extracto inicial normalizado, en el **Capítulo V** se analizará en comparación con la técnica propuesta, es decir en base a la muestra en base seca.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se presenta en forma organizada el análisis y discusión de los resultados obtenidos en los diversos experimentos descritos en el capítulo anterior, en acorde a la información bibliográfica, diagnóstico regional de materias prima de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas, la estandarización de la técnica para el fenómeno estudiado, la aplicación de la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias prima identificadas en el diagnóstico regional y la propuesta definitiva.

5.1 PRUEBAS EXPLORATORIAS

Las pruebas de absorbancia del extracto (0,5 g de la muestra concentrado con 250 mL de agua destilada) en solo agua destilada, presentan curvas de absorbancia poco distorsionadas y difusas en algunas regiones, como se observa en la *Figura N° 4.1* existe más de un pico máximo y el valor de absorbancia más bajo es de 3,09 y el más alto 4,97; esto nos indica que los valores de absorbancia registrados se encuentran fuera del rango establecido (0,2 a 1,4), el cual indica que existe la necesidad de corregir el factor de dilución o diluir el extracto para el análisis correcto.

En base a los resultados analizados de la *Figura N° 4.1*, se procede a regular la concentración de la antocianina, en la que se disminuye en 50% (0,25 g) la muestra del concentrado de antocianina, pero en la misma cantidad de solvente (250 mL) utilizada inicialmente, el resultado se aprecia en la *Figura N° 4.2*, en la que observa que la curva M1 (1:0) con bajo factor de dilución o mayor concentración de analito presenta una mayor distorsión en su curva a diferencia de las diluciones de M3 (1:3) y M4 (1:9) que presentan menos distorsiones, además sus valores de absorbancia están dentro del rango establecido. También se observa que la región más distorsionada se encuentra para lecturas de absorbancia menores a la longitud de onda de los 350 nm aproximadamente.

Hasta este punto, con dudas ya más aclaradas y con ideas más definidas tanto con la operación estandarizada del espectrofotómetro génesis, las técnicas de manipulación práctica así como con la información de las revisiones bibliográficas ambiguas o no explícitas en muchos casos, se procede a evaluar la absorbancia en función del pH y para una determinada concentración de concentrado de antocianina (2,5 g), pero en la misma calidad de solvente (250 mL), en la que se utilizó el factor de dilución igual a 20; en los resultados obtenidos en la *Figura N° 4.3*, se observa claramente la influencia del pH en la curva de absorbancia adquiriendo mayor absorbancia y por lo tanto mayor amplitud para las mediciones en una solución muy ácida como es con el buffer de pH=1,0, también se observa que la solución buffer de pH=4,5 y la del agua destilada (neutro) presentan curvas de absorción casi superpuestas. También en la figura se observa aún que los valores de absorbancia son relativamente mayores al rango recomendado, y que la curva de absorbancia necesita un reajuste de lectura especialmente sobre los 300 nm en la longitud de onda.

En base a los resultados analizados en la *Figura N° 4.3*, existe la necesidad de evaluar apropiadamente el factor de dilución de la concentración inicial de la muestra del extracto, para cuyo efecto se procedió a repetir el ensayo realizado pero incrementando el factor de dilución a 25 y la disminución de la zona o rango de medición de la longitud

de onda de las muestras al rango de 400 a 750 nm, esto en concordancia a la información bibliográfica. Luego, se obtuvo los resultados tal como se observa en la *Figura N° 4.4*, en la que se percibe una mejor resolución de tipo continua y uniforme de la función de la absorbancia en función al incremento de la longitud de la onda y con valores de absorbancia enmarcados dentro del rango recomendado, reconfirmándose además la influencia y variación del pico máximo de absorción según el pH del medio, perfectamente definido a los 520 nm y aproximándose entre sí hacia los 700 nm. Con este resultado obtenido se deduce que conforme aumenta la dilución entre la muestra y las correspondientes soluciones buffer se tiende a obtener soluciones para análisis más transparentes, con absorbancia apropiada y que tienden a acercarse en el límite a la muestra de referencia; que la curva como el pico máximo es más definido, esto conlleva a que los resultados obtenidos presenten un menor porcentaje de error. Además, esta observación es respaldada con los resultados obtenidos en la evaluación espectrofotométrica de la muestra patrón en el punto 4.1.5.

5.2 TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN MUESTRAS.

En la bibliografía se reportan diversas técnicas de extracción de antocianinas bajo diversas condiciones, siendo los principales factores que influyen en la eficiencia de extracción o lixiviación el tipo de solvente, la granulometría del sólido, la temperatura, el grado de agitación y tiempo de extracción, y obviamente el número de etapas de extracción; cabe mencionar además que éstas técnicas se refieren mayoritariamente a la extracción intensiva o a nivel industrial, y que en mayoría tratan sólo del mismo producto, como es el maíz morado.

No se reportan alcances bibliográficos definidos en las que se traten sobre la extracción analítica de una pequeña muestra con contenido potencial de antocianinas para los fines de cuantificación de contenido de antocianinas; por lo que, en la presente investigación se plantea y evalúa de una forma ordenada y sencilla los procedimientos que se debe seguir desde el momento de la preparación de las muestras para análisis de antocianinas,

ya sean éstas sólidas, semisólidas o líquidas, hasta la obtención y reporte final del contenido total de antocianinas expresadas en función a la muestra, tal como se indica en el punto 4.2.1. Para cuyo efecto, se han realizado diversas pruebas que maximicen la extracción de las antocianinas en las muestras (de unos 5 a 20 g), teniendo en cuenta la humedad inicial de la muestra y la respuesta de absorbancia final.

Como se reportan en los resultados del punto 4.2.2 se ha obtenido mejor respuesta en la extracción con el uso de una solución etanólica apropiada para la extracción de antocianinas en diferentes tipos de muestras sólidas y semisólidas, siendo a una concentración etanólica de 80 a 90%, a un pH de 2,0 y a una temperatura de 72°C (cercana a la ebullición en la presión local). De la misma forma se ha evaluado la cantidad de re-extracción que se debe realizar para obtener un extracto rico en antocianinas y con el menor porcentaje de pérdidas de antocianinas en el proceso de extracción, siendo el más apropiado el manejo en dos etapas de extracción sucesivas o con una re-extracción adicional del sólido, es decir dos filtrados como máximo para recolectar luego dichos extractos. Cabe recalcar que después de haber obtenido un buen extracto, es de suma importancia la operación de filtrado, ya que una mala manipulación o deficiencia en la filtración puede ser determinante para obtener resultados erróneos en el la lectura del espectrofotómetro.

Con los parámetros bien definidos y optimizados en el punto 4.2.2. Se procede con la optimización del proceso de extracción y normalización del extracto para su cuantificación, para obtener un buen extracto rico en antocianinas, se debe realizar en dos etapas de extracción de unos 7 a 8 minutos de extracción a ebullición como máximo, utilizando 200 mL de solución etanólica en cada etapa y finalmente llevar a un volumen final normalizado de 500 mL. Estos parámetros fueron comparados con los parámetros que se utiliza en la Empresa **Globe Natural**, en la que se realizó una pasantía con fines de evaluar y contrastar estos parámetros y realizar una comparación exhaustiva, recibándose diversos comentarios y

aportes por parte de la empresa a la vez que se recibe una conformidad a la técnica propuesta en la presente investigación.

Después de haber evaluado las comparaciones con la técnica de análisis de la empresa mencionada, que es líder en este rubro de colorantes naturales, y haber recibido respaldo a la técnica propuesta, para establecer una técnica definitiva se procede con los ensayos, tal que para definir el tipo de solvente de extracción, se evalúa el uso de agua destilada y por otro lado la solución etanólica al 80% regulado a un pH de 2,0 obteniéndose los resultados que se muestran en *la Figura N° 4.6* y en *la Figura N° 4.7*, en la que se reporta que los mejores resultados de extracción se consiguen utilizando como solvente la solución etanólica de 80% a pH= 2,0.

5.3 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO POR pH DIFERENCIAL

Con los parámetros definidos y con una propuesta definitiva para la técnica estandarizada de preparación de muestras y extracción normalizada del analito, se procede a realizar un análisis espectrofotométrico de cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial en muestras de la coronta de maíz morado, el resultado se observa en *la Figura N° 4.8*, y se obtiene como resultado una concentración de 316,03 mg/L de antocianina, es decir que por cada 1 L de extracto normalizado hay 316,03 mg de antocianina, lo que equivale a un contenido porcentual de 3,47 % en peso expresado con respecto a la muestra sólida en base seca utilizada para el análisis ,haciendo el uso de la ecuación (N° 5.7) propuesto para la técnica de cuantificación. El resultado de la misma muestra analizada en *la Empresa Globe Natural* reportó un contenido del 3,19% en peso, debiéndose precisar que ellos no expresan en rigurosidad el cálculo con respecto a la base seca, cuidando utilizar la muestra para el análisis lo más seco posible, además, no utilizan la técnica del pH diferencial; sin embargo, como se observa la variación de resultados no es grande, siendo ligeramente mayor con la técnica propuesta en la presente investigación, lo

cual le da una gran confiabilidad a los resultados reportados en la técnica indicada.

5.4 EVALUACIÓN DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES DE LA REGIÓN

Los resultados obtenidos de la evaluación del contenido de antocianinas en diversos productos agroindustriales de la región, se consolidan en el *Tabla N° 5.1*, las cuales están originalmente determinados en función al extracto normalizado, sin embargo, para fines de comparación y discusión de resultados es necesario expresar el resultado de cuantificación de antocianinas con respecto a la materia prima muestreada para el análisis, luego los resultados se deberán expresar en función de la muestra en base seca utilizada para el análisis, que es la propuesta final de la técnica investigada.

Tabla N° 5.1 Resumen de los resultados obtenidos en la evaluación de productos agroindustriales de la región.

Materia prima	Contenido de Antocianinas (*) (mg/L)	Contenido de Antocianinas en la muestra (expresado en base seca)	
		(mg/g)	% (p/p)
Coronta de maíz morado	316,03	34,67	3,47
Cascara Uva negra	133,09	13,31	1,33
Parte externa de la Fresa	38,99	3,90	0,39
Cáscara de la Ciruela	88,5	8,85	0,89
Mora	213,41	21,34	2,13
Papa (médula interna)	3,11	0,311	0,031
Papa (epidermis)	3,47	0,347	0,035
Epidermis del Camote morado	9,75	0,975	0,098
Maíz morado (cutícula del grano)	312,94	31,294	3,13

(*) Resultado referida al extracto líquido normalizado

Para el caso del maíz morado, *Arilmí Gorriti et al* (2009), en su trabajo de **EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS CORONTAS DE *Zea mays* L. "MAÍZ MORADO"**, concluyen que, el análisis individual de los factores y sus interacciones corroboran que la extracción de antocianinas de las

corontas del maíz morado depende de la temperatura y el tiempo de extracción, siendo favorecidas por el medio etanólico al 20% y pH entre 2,0 y 4,5, alcanzando valores de 46,534 mg de antocianina/g muestra, algo mayor de lo que se obtiene en el presente trabajo de investigación.

Yang et al. (2007) en un trabajo relacionado con la extracción óptima de antocianinas de corontas del maíz morado de un cultivar de la China en mezclas etanólicas y metanólicas al 80, 90 y 100% (v/v) acondicionadas convenientemente en medio ácido con los ácidos acético y cítrico al 0,25, 0,5 y 1% (v/v) encontraron valores cercanos a 6 mg/g muestra (5,90 mg de antocianina/g muestra) en un diseño factorial 22x33, siendo estos resultados muy inferiores a los encontrados en la presente investigación; ese mismo año **Yang et al.** En una investigación relacionada con la cinética de degradación térmica de antocianinas del maíz morado en medio acuoso reportó el valor de 0,680 mg de antocianina/g muestra, siendo también inferior a las concentraciones encontrados en medio acuoso en la presente investigación.

Escribano-Bailón et al. (2004), en una revisión de antocianinas en cereales reporta contenidos de 1642 mg/100 g en base húmeda para el maíz morado y 1779 mg/100 g en base seca (17,79 mg/g), cercanos a los encontrados en la investigación.

Vasco et al. (2009) Reporta el contenido de antocianinas en fresa 6 mg/kg como cianidina-3-glucósido siendo inferior al resultado obtenido en la presente investigación, el mismo año **Garzón et al.** (2009) reportan en mora un contenido de 508 mg /kg, sin mayor precisión en muchas publicaciones el reporte de valores con respecto a una expresión en base húmeda o seca de las muestras indicadas, siendo en el caso de la mora inferior al resultado obtenido en la investigación.

5.5 PROPUESTA DEFINITIVA DEL MÉTODO DE pH DIFERENCIAL

Se presenta la propuesta definitiva de determinación cuantitativa del contenido de antocianinas para cualquier tipo de muestra con contenido potencial de antocianina, utilizando la técnica espectrofotométrica basado en el método de pH diferencial, recomendando que el resultado debe ser expresado en función a la base seca de la muestra analizada, sin importar si la muestra originalmente se encuentre húmeda, parcialmente seco e inclusive en estado líquido, para lo cual es primordial determinar el contenido de humedad en la muestra.

El contenido de antocianina se expresa como cianidina-3-glucósido por ser el componente más común y mayoritario de las antocianinas extraídas a partir de las muestras.

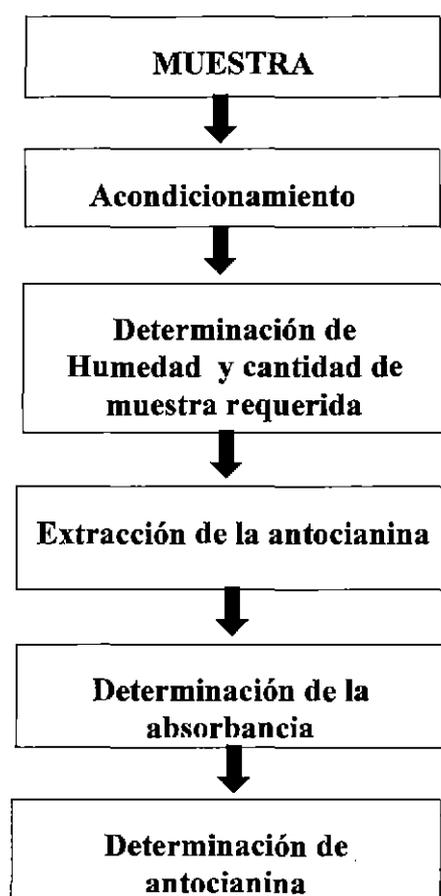


Figura N° 5.1 Diagrama de flujo, para la cuantificación de antocianina en diferentes tipos de materias de la región de Ayacucho.

Acondicionamiento de la muestra

Para el caso de muestra sólidas que son las materias primas más representativas para el análisis, se procede con el lavado y desinfectado en una solución de agua con cloro, para poder disminuir la carga microbiana, en seguida se realiza un breve análisis visual de la morfología de la materia prima, para identificar que partes de su morfología presentan un contenido potencial de antocianinas, finalmente proceder con el acondicionamiento de dicha materia prima.

Determinación de la humedad y cantidad de la muestra requerida

Se debe extraer una parte de la muestra acondicionada y disponer para la determinación de la humedad (generalmente menores a 5 g) en el contenedor metálico del determinador digital de humedad, para determinar el porcentaje de humedad: %H, con éste resultado se determina la cantidad muestra húmeda (m_{Hr}) requerida para el análisis espectrofotométrico del contenido de antocianina, para disponer en dicha muestra húmeda por lo menos de 5 g de materia seca o muestra en base seca (m_x).

$$m_{Hr} = \frac{m_x}{\left(1 - \frac{\%H}{100}\right)} \quad 5.1$$

Dónde:

m_x = Muestra en base seca (5 g)

m_{Hr} = Muestra húmeda requerida para el análisis

%H = Porcentaje de humedad

Extracción de antocianinas en la muestra

Para la extracción se utiliza la cantidad de muestra húmeda determinada previamente (m_{Hr}), la que se determinó con la ecuación 5.1, luego se utiliza 200 mL de la solución etanólica al 80% acidificado con HCl (a pH 2,0), procediendo con la extracción sólido líquido a temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos, luego se obtiene y reserva el primer filtrado. La torta residual luego del filtrado es nuevamente re-extraída con la solución etanólica a la misma temperatura y tiempo, finalmente se obtiene el último

filtrado. Los extractos obtenidos fueron combinados y llevados a un volumen final normalizado de 500 mL usando la misma solución etanólica.

Determinación de la Absorbancia

Previamente se procede con la preparación de las soluciones buffer de pH = 1,0 y de pH = 4,5, que han de constituir los medios de dilución de la alícuota del extracto normalizado, y poder efectuar la lectura espectrofotométrica en los pHs indicados. La preparación de las soluciones buffer es:

A. Buffer pH 1,0 (cloruro de potasio 0,025 M).

Pesar 1,86 g de KCl en un vaso y añadir agua destilada para su total disolución, luego medir el pH y ajustar a 1,0 ($\pm 0,05$) con HCl cuidando no sobrepasar el litro, trasvasar a una fiola aforada y completar el enrase final a 1 L hasta el aforo.

B. Buffer pH 4,5 (acetato de sodio 0,4 M).

Igualmente por otra parte, pesar 54,43 g de $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en un vaso precipitado y añadir agua destilada para su total disolución, luego medir el pH y ajustar a 4,5 ($\pm 0,05$) con HCl cuidando no sobrepasar el litro, trasvasar a una fiola aforada y completar el volumen al enrase de aforo de 1 L.

Luego, se toma una muestra o alícuota del extracto normalizado y se diluye apropiadamente (para conseguir una absorbancia en el rango de 0,2 a 1,4 medidos a 520 nm) utilizando las soluciones buffers indicadas; por decir, para 1 mL de una muestra o extracto normalizado se añade 24 mL de la correspondiente solución tampón, en un caso el de pH 1,0 y otro para el de pH 4,5 (lo cual nos daría un factor de dilución de 25 en cada caso) y luego se mide la absorbancia en un equipo de Espectrofotómetro Genesys 6, frente a un blanco a las longitudes de onda de 520 y 700 nm.

El factor de dilución no necesariamente debe ser 25, generalmente depende de la tonalidad o concentración inicial del extracto normalizado, el criterio de dilución debe ser tal que al leer la absorbancia a 520 nm los valores estén dentro del rango recomendado (entre 0,2 a 1,4); se recomienda utilizar como factor de dilución referente: 2, 5, 9, 15, 20, 25, 30 y 34. Luego, se determina el contenido de antocianinas según el método de pH diferencial, de acuerdo a *Giusti-Wrositad* (2001).

Determinación de contenido de antocianinas totales.

Con los valores de absorbancia registrados para cada dilución (pH 1,0 y 4,5) y en cada longitud de onda (520 y 700 nm), se procede a determinar el contenido total de antocianinas del extracto normalizado, utilizando la siguiente expresión:

$$A_m = \frac{(A) (PM) (FD) (1000)}{(\epsilon)(l)} \quad 5.2$$

La ecuación 5,2 permite cuantificar las antocianinas presentes en la muestra, expresadas como antocianinas monoméricas (A_m) en mg/L; vale decir, mg de antocianina por cada 1 L del extracto normalizado analizado; sin embargo, debe precisarse la forma de cálculo de la absorbancia, en función a las lecturas reportadas por el espectrofotómetro, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5} \quad 5.3$$

Donde:

A_{520} = Absorbancia de la antocianina a 520 nm

A_{700} = Absorbancia a 700 nm, para correccion por sustancias interferentes

PM = Peso molecular de Cianidina 3 - glucósido = 449,2 $\frac{g}{mol}$

FD = Factor de dilución utilizada para la alícuota

ϵ = Coeficiente de extinción molar = 26900 L/(mol . cm)

l = Longitud de la celda de medición = 1 cm

1000 = Factor de conversion de g a mg

Expresión de antocianina en función a la base seca de la muestra.

En vista que la expresión de la ecuación 5.2 expresa la concentración de la antocianina en mg/L de extracto líquido normalizado, para fines de discusión y análisis de concentración de antocianina en la muestra analizada, se hace necesario una conversión de dicho resultado a una expresión en función de la materia seca de la muestra sometida a análisis, o simplemente expresar en base seca de la muestra analizada (mg/g); para cuyo efecto se aplica la siguiente expresión:

$$AT_{mx} \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = A_m \left(\frac{V_{in}}{m_x} \right) \quad 5.4$$

Donde:

AT_{mx} = Concentración de antocianina total en base seca de muestra (mg/g)

A_m = Concentración de antocianina en el extracto normalizado (mg/L)

V_{in} = Volumen del extracto inicial normalizado (L)

m_x = Peso de muestra en base seca utilizada (g) = $m_h \left(1 - \frac{\%H}{100} \right)$

m_h = Peso de la muestra húmeda utilizada para el análisis (g)

$\%H$ = Porcenta de humedad en la muestra analizada (%)

Otra alternativa de expresión del resultado de concentración de antocianina total con respecto a la muestra analizada en base seca es en las unidades de g/g (peso/peso, p/p), para la cual la ecuación 5,4 se formula de la siguiente manera:

$$AT_{mx} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \right) = A_m \left(\frac{V_{in}}{1000 m_x} \right) \quad 5.5$$

Donde el valor de 1000 es el factor de conversión de mg a g de muestra seca analizada, y su interpretación será un contenido de antocianinas en g por cada g de muestra en base seca.

Finalmente, la expresión consolidada, basada en las lecturas de absorbancia, para determinar directamente la concentración de antocianinas totales en la muestra en base seca, expresado en g/g, será:

$$AT_{mx} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(A) (PM) (FD) (1000)}{\epsilon(l)} \times \frac{V_{in}}{1000m_x}$$

$$AT_{mx} \left(\frac{g}{g} \right) = \frac{(A) (PM) (FD) (V_{in})}{\epsilon(l) (m_x)} \quad 5.6$$

$$A = \text{Absorbancia} = (A_{520} - A_{700})_{pH1,0} - (A_{520} - A_{700})_{pH4,5}$$

Y la ecuación para determinar el porcentaje en peso de contenido de antocianina con respecto a la materia seca analizada será:

$$\%AT_{mx} = \frac{(A) (PM) (FD) (V_{in})}{\epsilon(l) (m_x)} \times 100 \quad 5.7$$

Cabe recordar que, para el caso de muestras sólidas y semisólidas se pueden utilizar cualquiera de las ecuaciones propuestas, para lo cual se debe determinar necesariamente el porcentaje de humedad de la muestra analizada, para poder determinar en ella la cantidad de muestra en base seca analizada; mientras que para el caso de muestras líquidas, solamente quedará expresada con la ecuación básica 5.2 en mg/L.

5.6 ANÁLISIS Y CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

En el presente trabajo de tesis, como una respuesta al problema general, se formuló el siguiente **objetivo general**:

Desarrollar la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho

La cual nos condujo tautológicamente a la siguiente hipótesis sustantiva:

La técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas permite su aplicación a las materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho

Y a la siguiente hipótesis nula:

La técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas no permite su aplicación a las materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho.

De acuerdo a la revisión y análisis de la información especializada y los diversos resultados experimentales obtenidos en esta investigación se confirma que la técnica de **análisis espectrofotométrica** de antocianinas a través del método de **pH diferencial** permite la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas expresadas en mg/L de extracto, la cual finalmente se expresa en mg/g, g/g y % en peso de la muestra analizada en base seca, a fin de no dejar ambigua el resultado final de acuerdo al grado de humedad que presentarían las muestras al instante de su análisis espectrofotométrico; posteriormente, se evidencia la aplicación de dicha técnica al análisis de diversas materias primas con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho, debido a que ha sido demostrado y comprobado una y otra vez mediante diferentes resultados experimentales y aplicaciones en diferentes materias prima estudiadas en el presente trabajo de investigación; por lo tanto, los resultados obtenidos son confiables y certeras, luego se considera la hipótesis general sustantiva como una pre-conclusión general, dado que, la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas **permite** su aplicación a la determinación del contenido de antocianinas en materiales con contenido potencial de antocianinas, como son diversas materias prima de la región de Ayacucho.

Luego, el desarrollo sistemático y progresivo de la investigación para el desarrollo de la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho, conducidas y desarrolladas de acuerdo a la metodología de investigación en sus diversas etapas del desarrollo experimental, permite alcanzar los **objetivos específicos** formulados en el presente trabajo de investigación y por lo tanto analizar consecuentemente las mismas vinculadas a sus respectivas hipótesis específicas, obteniéndose la siguiente contrastación:

El **primer objetivo específico** del trabajo es:

Realizar un diagnóstico regional de materias prima de interés Agroindustrial con contenido potencial de antocianinas

Con la siguiente hipótesis sustantiva:

El diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial permite identificar a las materias prima con contenido potencial de antocianinas.

Y la siguiente hipótesis nula:

El diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial no permite identificar a las materias prima con contenido potencial de antocianinas.

La investigación de la información de producción y comercialización de diversos productos mencionadas en las diversas literaturas vinculadas al diagnóstico de los recursos de interés agroindustrial, permiten identificar y analizar diversas materias prima con contenido potencial de antocianinas tanto a nivel regional y nacional, encontrándose un potencial en los siguientes productos: maíz morado, mora, sauco, uvas, ciruela, papa nativa, fresa y camote morado, estas materias prima aparte de ser ricos en antocianinas poseen otras propiedades beneficiosas para la salud, además, cada una de éstas tienen una importancia comercial, siendo el más conocido la producción y comercialización del maíz morado, y en los últimos tiempos se le ha dado una importancia comercial a las papas nativas con coloración morada.

Por lo tanto, en concordancia con el primer objetivo específico, se implementa y se aprovecha *la técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas aplicadas a materias prima con contenido potencial de antocianinas de la región de Ayacucho*, admitiéndose la hipótesis sustantiva específica de que, el diagnóstico regional de recursos de interés agroindustrial **permite** identificar a las materias primas con contenido potencial de antocianinas.

El **segundo objetivo específico** del trabajo es:

Estandarizar la técnica de análisis espectrofotométrica en las diferentes muestras (sólido, semisólido y líquidos) para la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Con la siguiente hipótesis sustantiva:

La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras posibilita la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Y la siguiente hipótesis nula:

La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras no posibilita la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas

La estandarización de la técnica de análisis espectrofotométrica, permite determinar el contenido total de antocianinas en los diferentes tipos de muestras, conforme se establece en el segundo objetivo; para lo cual se ha procedido con la evaluación y preparación de la materia prima, debiéndose determinar primeramente la humedad, para expresar el contenido de antocianinas en base seca del material analizado, luego se ha evaluado la extracción adecuada de antocianinas en la muestra, encontrándose que es favorable la molienda de la muestra (si es que este es sólido), extraer con solución etanólica al 80 % acidificado con HCl (pH=2,0), luego efectuar la extracción a ebullición en dos etapas, para garantizar la total extracción del colorante de la muestra, colectar los extractos y normalizar el volumen a 500 ml utilizando la misma solución etanólica.

Luego, haciendo el uso de las soluciones buffer de pH = 1,0 y de pH = 4,5, del extracto se toma una alícuota y se diluye apropiadamente con solución buffer correspondiente para medir la absorbancia y ubicar en el rango

recomendado (0,2-1,4 a 520 nm) para luego determinar el contenido de antocianinas por el método de pH diferencial, obteniendo el resultados en mg/g, p/p o % en peso. Es el mismo procedimiento que se sigue para muestras semi-sólida, en cuanto para la muestra liquida solo se realiza el proceso de filtrado adecuadamente, sin la necesidad de determinar la humedad y luego se realiza con la lectura, de la misma forma que se indicó anteriormente para muestras sólidas, obteniendo el resultado en mg/L de extracto normalizado o haciendo semejante al agua con densidad igual a la unidad, mg/kg.

Por lo tanto, se admite la correspondiente hipótesis sustantiva de que, La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada para las diferentes muestras **posibilita** la determinación cuantitativa del contenido de antocianinas.

Finalmente, el **tercer objetivo específico** del trabajo es:

Aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias prima identificadas en el diagnóstico regional

Con la siguiente hipótesis sustantiva:

El análisis espectrofotométrico de antocianinas se valora en la evaluación de las materias prima con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.

Y la siguiente hipótesis nula:

El análisis espectrofotométrico de antocianinas no se valora en la evaluación de las materias prima con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.

Asociada a las determinaciones experimentales en las diferentes tipos de materias prima con contenido potencial de antocianinas, se considera

relevante en el presente trabajo de tesis, la presentación explícita de la técnica de análisis espectrofotométrica del contenido de antocianinas por medición de absorbancia en dos soluciones buffer estándares a pH=1,0 y pH=4,5 denominado pH diferencial, la cual se ha aplicado a diversas materias prima; analizándose la cáscara de la uva y reportándose un contenido de 13,31 mg de antocianinas por cada g de cáscara de uva en base seca, igualmente para coronta de maíz morado obteniéndose 34,67 mg de antocianina por cada g de coronta molida en base seca, para la cutícula del grano de maíz morado reportándose un contenido de 31,29 mg de antocianina por cada g de cutícula del grano de maíz morada en base seca, para la fresa (parte externa) registrándose un contenido de 3,90 mg de antocianina por cada g de fresa en base seca, para la cáscara de ciruela reportándose 8,85 mg de antocianina por cada g de cáscara de ciruela en base seca, para mora 21,34 mg de antocianina por cada g de mora en base seca, para la papa tanto en la médula interna como en la epidermis, reportándose un contenido de 0,311 y 0,347 mg de antocianina respectivamente, por cada g de papa en base seca, igualmente para la epidermis de camote morado registrándose un contenido de 0,975 mg de antocianina en cada g de cáscara de camote en base seca.

Este propósito se ha alcanzado por medio del tercer objetivo que es, aplicar la valoración espectrofotométrica de antocianinas a las materias primas identificadas en el diagnóstico regional. Por lo tanto, se admite válida la hipótesis específica sustantiva de que, el análisis espectrofotométrico de antocianinas **se valora** en la evaluación de las materias primas con contenido potencial de antocianinas identificadas en el diagnóstico regional.

Tabla N° 5.2 Cuadro comparativo de los resultados obtenidos en la presente investigación con resultados obtenidos en la revisión bibliográfica.

Materia prima	Contenido de Antocianinas en la muestra (expresado en base seca)	
	Resultados de la revisión Bibliográfica	Resultados de la investigación
	(mg/g)	(mg/g)
Coronta de maíz morado	3,49%	3,47%
Uva negra	11,02	13,31
Fresa	2,39	3,90
Ciruela	6,25	8,85
Mora	19,25	21,34
Camote morado	1,10	0,975
Maíz morado (grano)	18.75	31,294

CONCLUSIONES

1. La antocianina es un pigmento importante para la industria de colorantes naturales por poseer diferentes propiedades benéficas tanto alimenticias como para la salud. En esta investigación se ha identificado aquellas materias primas de la región que tienen contenido potencial de antocianinas como son maíz morado, uva negra, fresa, ciruela, mora, papa nativa y camote que son de interés agroindustrial para el desarrollo industrial de la región.
2. La preparación de muestras sólidas se ha realizado a partir de un previo análisis de su morfología de la materia prima en análisis, para lo cual ha sido necesaria la determinación del porcentaje de humedad inicial: %H, para determinar la muestra húmeda requerida que contenga como base seca 5 g, obteniéndose para la cáscara de la uva negra 22, 11 g de muestra húmeda, para la fresa(parte externa) 53,3 g , para la cáscara de la ciruela 27,28 g , para mora 31,39 g, para papa (médula interna) 14,37 g, para la epidermis de papa 14,28 g, para cáscara de camote morado 20,46 g y para la cutícula del grano de maíz morado 9,38 g de muestra húmeda. Cada una de éstas muestras se han extraído en dos etapas utilizando la solución etanólica al 80% de pH = 2,0, llevando todo los extractos colectados a un volumen final normalizado de 500 mL, para el caso de las muestras semisólidas se ha realizado el mismo procedimiento que para la muestra sólida, para el caso de muestras líquidas solo ha sido necesario realizar un filtrado adecuado y luego proceder con la lectura en el espectrofotómetro haciendo el uso de las soluciones buffer.
3. El contenido de antocianinas en diferentes muestras analizadas para diferentes tipos de materias primas de la región, ha sido determinado utilizando la técnica de análisis espectrofotométrica de pH diferencial, cuyo resultado final se expresa en base al componente representativo de *cianidina -3-glucósido*, haciendo el uso de las soluciones buffer

de pH = 1,0 y de pH = 4,5, diluyendo apropiadamente con solución buffer correspondiente para medir la absorbancia y ubicar en el rango recomendado (0,2 a 1,4 leídos a 520 nm) y el resultado obtenido fue expresado en mg/g de cada muestra determinada en base seca, en la que se ha registrado los siguientes resultados: para la cáscara de la uva negra 13,31 mg de antocianinas por cada g de cáscara de uva negra en base seca, para coronta de maíz morado 34,67 mg de antocianina por cada g de coronta molida en base seca, para la cutícula del grano de maíz morado 31,29 mg de antocianina por cada g de cutícula del grano de maíz morada en base seca, para la fresa(parte externa) 3,90 mg de antocianina por cada g de fresa en base seca, para la cáscara de ciruela 8,85 mg de antocianina por cada g de cáscara de ciruela en base seca, para mora 21,34 mg de antocianina por cada g de mora en base seca, para la papa tanto en la médula interna como en la epidermis de 0,311 y 0,347 mg de antocianina respectivamente, por cada g de papa en base seca, igualmente para la cáscara de camote morado de 0,975 mg de antocianina en cada g de cáscara de camote en base seca.

4. La técnica de análisis espectrofotométrica estandarizada fue aplicada en la valoración de contenido de antocianina en diferentes materias primas diagnosticas en la región de Ayacucho. Obteniendo resultados convincentes y apropiados en comparación con las revisiones bibliográficas, respaldada con las experiencias obtenidas en la empresa **GLOBE NATURAL**.

RECOMENDACIONES

1. Desarrollar los estudios específicos para la identificación química de cada uno de los tipos de componentes del conjunto de antocianinas presentes en una materia prima determinada y los mecanismos de reacción, a fin de establecer con mayor representatividad la variación del contenido de antocianinas en diferentes tipos de materias primas.
2. Aplicar la técnica de análisis espectrofotométrica de pH diferencial para la determinación del contenido de antocianinas en diversas muestras y productos intermedios de los procesos de extracción y producción de concentrados de antocianinas en la actividad industrial, a fin de poder evaluar con mayor sostenibilidad y veracidad todos los factores que influyen en la lixiviación y producción industrial de antocianinas a partir de diversas materias primas y así poder determinar el rendimiento en cada operación del proceso.

BIBLIOGRAFÍA

Textos y revistas especializadas

1. Andersen, Ø. M.; Francis, G. W. ***Techniques of pigment identification***. En: *Plant Pigments and their Manipulation*, Davies, K., Ed., Blackwell Publishing: London, 2004, 293-341
2. Burin B., Falcao L., Valdemoro L. ***Color, contenido fenólico y actividad antioxidante del jugo de uva***. Ciênc. Tecnol. Aliment. 2010; 30 (4):1-6.
3. Ferramola A., Sancovich H. ***Interacciones de las radiaciones Electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel***. Rev. Argent. Dermatol. 2006; 87(2):113-120.
4. Fredes C. ***Antioxidantes en berries nativos chilenos***. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. 2009; 8(6):469-478.
5. Ferrer Y., Martínez G., Leroy D. ***El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas***. Rev. Cub. Farm. 2009; 43 (3):1-5.
6. Francis L. Anthocyanins. En: ***Current Aspect of food colorants***. Furia, T. Editorial CRC Press. Massachussets. 1978.
7. Giusti, M.M y Wrolstad, R.E; Characterization of red radish anthocyanins. J.Food Sci. 61(2):322'326, 1996.
8. Gutiérrez A., Ledesma L., García I., Grajales O. ***Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas***, México. Rev. Cub. Salu. Public. 2007; 33(1):1-4.

9. Gauche C., Da Silva E., Bordignon M. ***Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids.*** Sci. Agric. 2010; 67 (1):1-4.
10. Garzón G. ***Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión.*** Acta Biol. Colomb. 2008; 3:27-36.
11. Harborne, J.B.; Williams, C.A. ***Anthocyanins and other flavonoids.*** Nat. Prod Rep., 1995, 639-657
12. Harborne, J.B. ***The chromatographic identification of anthocyanin pigments.*** J. Chromatogr., 1998, 1, 473-488
13. Jimenez M., Zambrano M., Aguilar M. ***Estabilidad de Pigmentos en Frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas.*** Inf. Technol. 2004; 15(3).
14. Malacrida C., Da Mota S. ***Compuestos fenólicos totales y antocianinas en jugo de uvas.*** Cienc. Technol. Aliment. 2005. 25 (4):659-664.
15. Ministerio de Agricultura y Riego. ***Ayacucho: producción agrícola, según principales cultivos,*** 2008 – 2013.
16. Organización Panamericana de la Salud. ***Enfermedades producidas por radicales libres.*** Rev. Panam. Salu. Public. 1997; 1 (5):399-400.
17. Repo R., Encina C. ***Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de cereales andinos: quinua *Chenopodium quinoa*, kañiwa *Chenopodium pallidicaule* y kiwicha *Amaranthus caudatus*.*** Rev. Soc. Quim. Perú. 2008; 74(2):1-8.
18. Remesy C., Manach C., Demogne C., Texier O., Regerat F. ***Intereret nutritionnal des flavonoides.*** Med. Et Nutr. 2006; 32(1):17-27.

19. Revilla, E.; Ryan, J.M.; Ortega, M.G. **Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes.** *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 4592–4597.
20. Venero J. **Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes.** *Rev. Cub. Med. Milit.* 2002; 31(2):126-136.
21. Wang H., Cao G., Prior R. **Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins.** *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45(2):304-309.
22. Wrolstad, R. E.; Heatherbell, D. A. Identification of anthocyanins and distribution of flavonoids in tamarillo fruit (*Cyphomandra betaceae* Cav. Sendt). *J. Sci. Food. Agric.*, **1974**, 25, 1221-1228.
23. Zorrilla A. **El envejecimiento y el estrés oxidativo.** *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 2002; 21(3):234-237

Páginas de internet

1. Claudia Dziuk O'Donnell. **Tendencias Globales en Colorantes, 2011**, www.industriaalimenticia.com/articulos/83014-tendencias-globales-en-colorantes
2. Gamarra Susan. **Los colorantes naturales del momento**, 2009, <http://www.alimentacion.enfasis.com/articulos/14761-los-colorantes-naturales-del-momento>.

ANEXOS

1. CURVA DE LA REGULACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE LA ANTOCIANINA SIN MODIFICACIÓN DE pH.

ANEXO 01

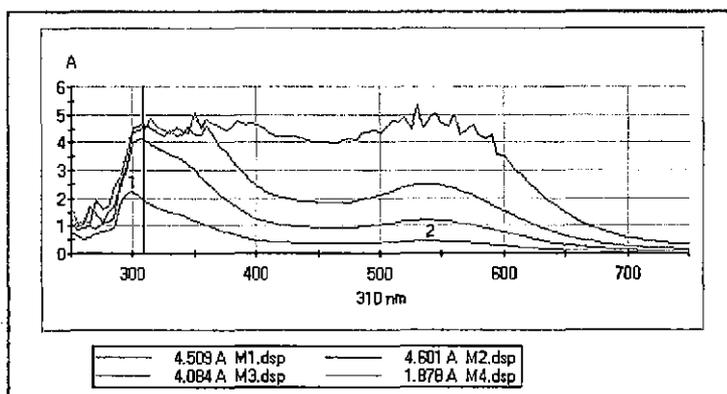
Curva de la regulación de concentración de la antocianina sin modificación de pH

$$\lambda_{max} = 310$$

Método
test.msc

Barrido
Inicio 250 Fin 750 nm
Intervalo 5 nm

Espectrofotómetro
Modo Medida A
Velocidad Medium
Parámetros avanzados

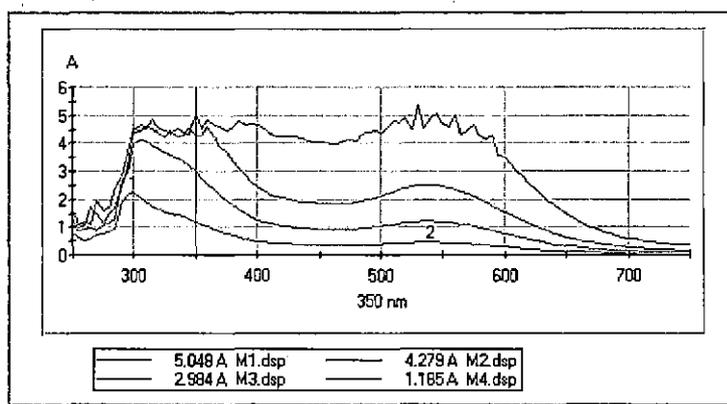


$$\lambda_{max} = 350$$

Método
test.msc

Barrido
Inicio 250 Fin 750 nm
Intervalo 5 nm

Espectrofotómetro
Modo Medida A
Velocidad Medium
Parámetros avanzados



$$\lambda_{max} = 530$$

Método
test.msc

Barrido
Inicio 250 Fin 750 nm
Intervalo 5 nm

Espectrofotómetro
Modo Medida A
Velocidad Medium
Parámetros avanzados

