

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA  
QUÍMICA Y METALURGIA**



**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS  
DEL MAÍZ MORADO (*ZEA mays L.*) POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE  
RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL.**

**Tesis para optar el Grado Académico de:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA QUÍMICA CON MENCIÓN EN  
GESTIÓN Y DESARROLLO DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Presentado por:**

**CRONWELL EDUARDO ALARCÓN MUNDACA**

**AYACUCHO-PERU**

**2015**

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

---

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

TM  
009  
Ala

*A mi adorada familia,  
por su amor y apoyo  
permanente*

*A la memoria de mi  
padre Jesús Ernesto,  
ejemplo de vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro Padre Celestial, a la Santísima Virgen María, por su don de vida y herencia en valores que permitieron formar en mí a un buen cristiano y honrado ciudadano.

Expreso mi más sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, alma mater y centro laboral que formó e inculcó en mí los conocimientos que permiten mi desarrollo personal y profesional.

Mis sinceros reconocimientos al permanente apoyo de mis amigos, colegas de trabajo y demás personas que han sustentado la viabilidad y ejecución del presente trabajo de investigación.

**CRONWELL E. ALARCÓN M.**

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

SIMBOLOGÍA

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICOS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE ANEXOS

### **CAPÍTULO I**

#### **PLANEAMIENTO DEL PROYECTO**

1.1	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	01
1.1.1	Descripción del contexto	01
1.1.2	Delimitación del problema	02
1.1.3	Formulación del problema	02
1.2	JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	03
1.3	OBJETIVOS	04
1.4	BASES CIENTÍFICAS	04
1.5	ANTECEDENTES	05
1.6	HIPÓTESIS	07
1.7	VARIABLES	07
1.8	ASPECTOS METODOLÓGICOS	08
1.9	MATRIZ DE CONSISTENCIA	10

### **CAPÍTULO II**

#### **MARCO TEÓRICO**

2.1.	ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA	11
2.1.1	Maiz morado ( <i>Zea mays L.</i> )	11
2.1.2	Clasificación botánica del maíz morado	12
2.1.3	Morfología general	12
2.1.4	Características genéticas del maíz morado	13
2.1.5	Variedades del maíz morado	14
2.1.6	Características del maíz morado	16

2.1.7	Usos del maíz morado	17
2.1.8	Producción nacional del maíz morado	18
2.1.9	Principio activo de coloración del maíz morado	18
2.2	NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ANTOCIANINAS	19
2.2.1.	Factores que influyen la estabilidad de las antocianinas	22
2.2.2.	Presencia del pigmento antociánico en la naturaleza	24
2.3	EXTRACCION DE ANTOCIANINAS	25
2.3.1.	Métodos de obtención de antocianinas	26
2.3.2.	Variables y rangos de operación para la extracción de antocianinas	28
2.4	SITUACION COMERCIAL DE LAS ANTOCIANINAS	30
2.5	DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA CORRELACIÓN DE FACTORES	33
2.6	EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	34
2.6.1.	Experimentación con varios factores. Diseños factoriales	35
2.6.2.	Metodología de la superficie de respuesta (RSM)	35
2.6.3.	Software STATGRAPHICS.	37

### **CAPÍTULO III**

#### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

3.1	EXTRACCION DE ANTOCIANINAS DEL MAIZ MORASDO	40
3.2	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	42
3.2.1.	Diseño experimental	42
3.2.2.	Diseño de la superficie de respuesta	43
3.2.3.	Validación experimental	44

### **CAPÍTULO IV**

#### **RESULTADOS**

4.1	RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL SOFTWARE	45
4.2	RESULTADOS EXPERIMENTALES PRIMARIOS	49
4.3	RESULTADOS GENERADOS POR EL PROGRAMA	50

### **CAPÍTULO V**

#### **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y VALIDACIÓN EXPERIMENTAL**

5.1	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
5.2	VALIDACIÓN EXPERIMENTAL	64
5.2.1.	Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro	

5.2.2. Cálculos del contenido de antocianina	66
5.3 VALIDACIÓN DE LA HIPÓTESIS	68
CONCLUSIONES	69
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFÍA:	71
ANEXOS	73

## RESUMEN

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria; pero a diferencia de los pigmentos rojos sintéticos que se utilizan actualmente, las antocianinas no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Son también sensibles a las variaciones de pH, a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul. Debido a estos cambios de color fueron llamados "camaleones vegetales" por Tswett. Últimos estudios reportan que el color de las antocianinas se hace resistente a las variaciones de pH cuando se encuentran como productos de condensación con catequinas en presencia de aldehídos, siendo en estos casos de mayor valor como agente de coloración de alimentos. (**Cuadros A.**, 2001).

El uso de diseños de superficie de respuesta es la alternativa más adecuada, en experimentos cuyo objetivo es establecer la relación entre los factores (2 a 6) y la variable dependiente, dentro de la región experimental. El término "**Metodología en Superficies de Respuesta**" (RSM en inglés) se refiere al paquete de diseños estadísticos e instrumentos de análisis que se emplean en las siguientes etapas:

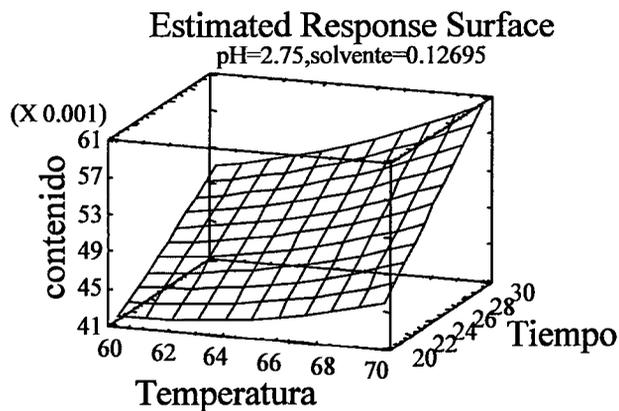
- A) Diseño y recopilación de datos experimentales, los cuales se usan en la determinación de una ecuación general cuadrática que se empleará para predicciones.
- B) Aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple para seleccionar la mejor ecuación que represente el comportamiento de los datos.

C) Análisis de la superficie ajustada mediante gráficas de contorno y otras técnicas matemáticas y numéricas. (Lawson, et al., 1992).

Luego de la aplicación del método de superficie de respuesta se obtuvieron los siguientes resultados en la optimización de parámetros para la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (para máximo contenido de antocianinas):

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO
TEMPERATURA	56,591	73,409	73,3529
TIEMPO	16,591	33,409	33,409
pH	2,32955	3,17045	3,17045
RELAC. SOLUT.	0,100294	0,153606	0,148957

El método de superficie de respuesta aplicado desde el programa de análisis de datos **STATGRAPHICS PLUS** es una herramienta eficaz para la optimización de variables múltiples con un manejo estadístico de alto nivel y con resultados muy cercanos a la perfección. Lógicamente el analista tendrá que contribuir con el criterio acertado de su manejo.



## **ABSTRACT**

As a harmless natural pigments anthocyanin have considerable potential in the food industry; But unlike synthetic red pigments that are used currently, anthocyanin are not stable especially in neutral and alkaline solutions, easily occurring changes during the processing of the raw material and storage, which are manifested in loss of color, darkening of the product and formation of precipitates in the extracts. They are also sensitive to changes in pH, pH 3 pigment is present as salts of flavilio of red at pH 8 is at pH 11 blue and violet color. Because these color changes were called "vegetable chameleons" by Tswett. Recent studies report that color from anthocyanin is resistant to pH changes when they encounter as condensation products of catechism in the presence of aldehydes, being in these cases of greater value as a food coloring agent. (*Cuadros A.*, 2001).

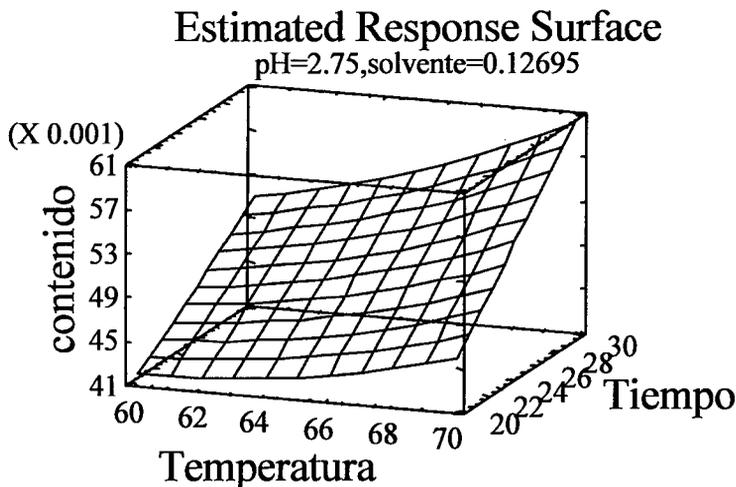
The use of response surface designs is the most suitable alternative, in experiments whose aim is to establish the relationship between the factors (2-6) and the dependent variable, within the experimental region. The term "**response surface methodology**" (**RSM** in English) refers to the package of statistical design and analysis tools that are used in the following stages:

- A) Design and collection of experimental data, which are used in the determination of a general quadratic equation which will be used for predictions.
- B) Application of multiple linear regression techniques to select the best equation that represents the behavior of the data.
- C) Analysis of the surface adjusted by contour graphs and other mathematical and numerical techniques. (*Lawson et al.*, 1992).

After the application of the response surface method were obtained the following results in the optimization of parameters for the extraction of anthocyanins from corn (for maximum anthocyanin content):

FACTOR	UNDER	HIGH	OPTIMUM
TEMPERATURE	56,591	73,409	73, 3529
TIME	16,591	33,409	33,409
pH	2,32955	3,17045	3,17045
RELAC. SOLUT.	0,100294	0,153606	0,148957

The response surface method applied from the statistical analysis software for data **STATGRAPHICS PLUS** program is an effective tool for the optimization of multiple variables with a high level statistical management and results very closet o perfection. Logically the analyst will have to contribute to the successful management criteria.



## INTRODUCCIÓN

El maíz morado es un recurso natural vegetal cuya característica es la de contener en la coronta, mayoritariamente, una sustancia colorante denominada ANTOCIANINA, de gran valor y aplicación diversa como agente colorante en la industria alimentaria y farmacéutica principalmente.

Uno de los principales productores y exportadores mundiales de maíz morado es Perú, seguido por Argentina, Bolivia, China, Brasil, México, Francia, Yugoslavia, Rumania, Italia, Sudáfrica, Argentina y Chile, cuya materia prima es utilizada generalmente para la producción de colorantes sintéticos.

Aunque China tiene una producción importante de maíz morado, este tiene menor concentración de pigmento que el peruano. En cuanto a colorantes de maíz morado; Venezuela también lo produce, los precios son similares, la cantidad es determinante, sobre todo cuando se emplea como insumo de industria alimentaria.

El nivel de exportaciones de la antocianina, muestra un crecimiento continuo en el periodo, desde el año 2008 hasta el 2012; lo que significa que tuvo un ascenso de 1,253% durante este periodo, por lo que se infiere que goza de gran potencial y es muy requerida en los mercados, por gozar de beneficios para la salud y de utilidad industrial.

Las cifras del maíz morado muestran el dinamismo comercial de las exportaciones de este producto, superando los US\$ 500 mil anuales y creciendo ascendentemente durante los últimos años; en el periodo en estudio se muestra solo un descenso en el año 2010, recuperándose al siguiente año.

Los métodos, experimentales, usados para la extracción de antocianinas del maíz morado han sido propuestos por muchas personas que evaluaron uno a uno los parámetros que optimizan el proceso. Sin embargo, por la falta de metodología, tuvieron que hacer muchos experimentos para poder consolidar una formulación adecuada.

El diseño de métodos matemáticos, que mejoran la optimización y selección de variables usando métodos numéricos especiales, permite en la actualidad un mejor manejo sin involucrar muchos experimentos que dilataría el tiempo del proceso.

Es el caso que se ha diseñado un método llamado superficie de respuesta que con poca información puede procesar la solución de ecuaciones cuadráticas en las que estén involucradas variables que influyen en los procesos logrando un diseño experimental adecuado y optimizado, verificando, inclusive, su comportamiento estadístico.

## **LISTA DE CUADROS Y FIGURAS**

### **CUADROS**

- Cuadro N° 1.1:** Dimensiones de mazorcas y granos del maíz morado
- Cuadro N° 1.2:** Composición físico química del grano y la coronta del maíz morado (variedad morado canteño)
- Cuadro N° 1.3:** Producción nacional del maíz morado expresado en toneladas.
- Cuadro N° 1.4:** Contenido aproximado de antocianina en el maíz morado seco (variedad morado canteño)
- Cuadro N° 1.5:** Estructuras y modelos de la sustitución de algunas antocianinas que ocurren naturalmente.
- Cuadro N° 1.6:** Contenido de antocianinas en algunas materias primas.
- Cuadro N° 1.7:** Evolución de las exportaciones de antocianina y de maíz morado en valor FOB.
- Cuadro N° 1.8:** Evolución de las exportaciones de Antocianina y del maíz morado en kg
- Cuadro N° 1.9:** Empresas exportadoras de antocianina en valor FOB
- Cuadro N° 1.10:** Mercados para la exportación de antocianina, durante el periodo 2008 – 2012, expresados en valor FOB
- Cuadro N° 1.11:** Mercados para la exportación de maíz morado, durante el periodo 2008 – 2010, expresados en kg.
- Cuadro N° 1.12:** Exportadores del sistema armonizado: 320300 Materias colorantes de origen vegetal o animal, en miles de US\$.
- Cuadro N° 4.1.:** Factores que afectan el diseño
- Cuadro N° 4.2:** Corridas experimentales
- Cuadro N° 4.3:** Matriz de correlación de datos
- Cuadro N° 4.4:** Resultados primarios
- Cuadro N° 4.5:** Efectos estimados para el contenido
- Cuadro N° 4.6:** Análisis de varianza para contenido (anova)
- Cuadro N° 4.7:** Coeficiente de regresión por contenido.

**Cuadro N° 4.8a:** Matriz de correlación para efectos estimados

**Cuadro N° 4.8b:** Matriz de correlación para efectos estimados (continuación)

**Cuadro N° 4.9:** Resultados estimados para contenido

**Cuadro N° 4.10:** Senda de precipitación de ascenso o descenso para el contenido.

**Cuadro N° 4.11:** Respuesta optimizada

## **FIGURAS Y GRAFICOS.**

**Figura N° 1.1** Estructura química de la antocianina (*Durst & Wrolstad, 2001*)

**Figura 1.2** Transformaciones estructurales de las antocianinas frente a variaciones en el pH (basado en cianidina 3,5 diglicósido).

**Figura N° 3.1.** Diagrama de flujo del proceso propuesto

**Figura N° 3.2.** Diagrama de flujo del procedimiento de optimización usando la metodología de la superficie de respuesta

**Figura N° 4.1:** Carta de parapeto para contenido estandarizado

**Gráfico N° 4.1:** Efectos medios trazados para contenido de antocianinas

**Gráfico N° 4.2:** Interacción de factores para contenido de antocianinas

**Gráfico N° 4.3:** Probabilidad normal trazada para contenido de antocianinas

**Gráfico N° 4.4:** Superficie de respuesta estimada

**Gráfico N° 4.5:** Contornos de la superficie de respuesta estimada

**Gráfico N° 4.6.:** Trazo de los valores residuales para el contenido de antocianinas

**Figura N° 5.1.** Lectura de la Absorbancia proporción 1:19 (520 nm)

**Figura N° 5.2.** Lectura de la Absorbancia proporción 1:19 (700 nm)

**Figura N° 5.3.** Absorbancia en el análisis de muestras de coronta de maíz morada. (Proporción 1:24)

## **LISTA DE ANEXOS**

- A-01** RESULTADOS TAL COMO MUESTRA EL PROGRAMA EN ORDEN DE APARICIÓN.
- A-02** CONSTRUCCIÓN DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL EN STATGRAPHICS.
- A-03** FOTOS DE LA VALIDACIÓN EXPERIMENTAL

## **CAPÍTULO I**

### **PLANEAMIENTO DEL PROYECTO**

#### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

##### **1.1.1 Descripción del contexto**

La región de Ayacucho y otras del país presentan una producción considerable de maíz morado en sus distintas variedades, para atender los requerimientos internos así como su comercialización hacia la capital y exportación, especialmente para los fines de obtención de los colorantes naturales del maíz morado, caracterizados por el contenido de las antocianinas. Esta comercialización primaria conduce a la necesidad de efectuar la investigación aplicada en la ingeniería de gestión y desarrollo de los recursos naturales de nuestro medio, como es el maíz morado (*Zea mays L.*), con el propósito de aportar en la ingeniería de los procesos de extracción de antocianinas, que en la actualidad se procesan sin mayor énfasis en la optimización de los parámetros de extracción, que devienen en el manejo ineficiente de los procesos, que se reflejan en las bajas eficiencias de extracción y sus consiguientes costos.

### 1.1.2 Delimitación del problema

La investigación formulada en el presente proyecto de investigación no presenta una delimitación espacial ni temporal específica que restrinja o influya en los resultados; debido a que la naturaleza de la investigación y los resultados de optimización no se circunscriben a una topología geográfica exclusiva ni a un periodo temporal, porque su evaluación y resultados están sujetos a la variedad de maíz morado utilizado en el estudio y que se comercializa en el ámbito regional y nacional.

### 1.1.3 Formulación del problema

Como las antocianinas están presentes en numerosas plantas y frutas, así como el contenido de la misma varía mucho dependiendo de factores tales como: especie, variedad, condiciones de crecimiento, estado fisiológico de la planta y el fruto, tamaño y posición del fruto en la planta, aplicación de agroquímicos, etc (*Blank*, 1958; *Ribéreau-Gayon*, 1959, citado por *F. J. Francis*), también existen numerosos procesos de extracción y obtención de antocianina para cada planta y fruto fuente del mencionado colorante.

En forma general las antocianinas son obtenidas por extracción de alguna fuente de materia prima, el extracto luego es purificado, el cual seguidamente es concentrado y puede, posteriormente, ser secado para obtener un producto seco con presentación pulverulenta. Varios métodos de extracción se han propuesto para la obtención de antocianina como colorante potencial para los alimentos. Luego, los resultados experimentales de las variables que influyen en la ingeniería de la extracción del colorante o la operación unitaria de lixiviación, publicados y sugeridos en algunos rangos operativos, no definen con claridad el estado óptimo de los parámetros de extracción de antocianinas del maíz morado.

#### **PROBLEMA GENERAL:**

¿Se puede optimizar los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*) a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental?

### **PROBLEMAS ESPECÍFICOS:**

- ¿Se encuentran totalmente establecidas y explícitas los métodos de extracción y los rangos de operación de las variables que influyen en las tecnologías de extracción de antocianinas a partir del maíz morado?
- ¿Se podrán optimizar los parámetros de la extracción de antocianinas del maíz morado utilizando el método de superficie de respuesta?
- ¿Será confiable la optimización de parámetros frente a la verificación experimental del proceso de extracción de antocianinas?

### **1.2 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA**

En las fuentes bibliográficas no se encuentran descripciones de proceso con los parámetros definidos para la producción industrial del extracto antociánico a partir del maíz morado, sin embargo, como se mencionó, existen diferentes métodos de extracción del pigmento antociánico de las diferentes fuentes de materia prima.

Las antocianinas están basadas químicamente en una única estructura aromática, aquella de la cianidina, y todas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo, por metilación o por glicosidación. Ellas son intensamente coloreadas y solubles en agua, no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de precipitados en los extractos. Son también sensibles a las variaciones de pH, a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color violeta y a pH 11 de color azul.

De ahí la importancia de determinar los valores óptimos de las condiciones de extracción que permitan manejar el producto sin variaciones en sus características químicas como en su valor tintóreo.

### 1.3 **OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

- Evaluar la optimización de los parámetros de la extracción de las antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*) a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Definir el método de extracción de antocianinas a partir del maíz morado y establecer el rango de operación de las variables que influyen en su extracción.
- Evaluar la optimización de los parámetros de extracción de antocianinas del maíz morado utilizando el método de superficie de respuesta.
- Contrastar la optimización de parámetros con la verificación experimental del proceso de extracción de antocianinas.

### 1.4 **BASES CIENTÍFICAS**

El maíz morado es una variedad pigmentada del *Zea mays L.*, cuyos granos y coronta presentan color morado. Investigaciones recientes han revelado la presencia de compuestos tales como: un dímero de cianidina, derivados mono y di-glicosidados de cianidina, pelargonidina, peonidina y otros fenólicos.

Las características estructurales de las antocianinas, su relativa estabilidad en medio acuoso según el pH, con la presencia de estructuras tales como el catión favilium, una base quinoidal, una pseudo base carbinol y una chalcona, determinan una mayor estabilidad frente a cambios de pH, temperatura y exposición a la luz, debido a procesos de copigmentación y asociación intermolecular e intramolecular que se desarrollan en el medio, convirtiendo a estos compuestos en fuentes potenciales de colorantes naturales, sustancias activas de alimentos funcionales, nutraceuticos y medicamentos.

En este trabajo se investigaron los factores pH, solvente, temperatura y tiempo relacionados a la extracción de antocianinas, siendo el objetivo la

identificación de las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas de las corontas de maíz morado.

## 1.5 **ANTECEDENTES**

### **Extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de *Zea mays L.* (Maíz morado); (Rosa Sotomayor)**

El trabajo de investigación evaluó la extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de *Zea mays L.* (maíz morado), mediante espectrofotometría UV –Visible. Se obtuvo un pigmento natural en polvo del maíz morado *Zea mays L.* a nivel de laboratorio, con un rendimiento del 2, 25% en extracto de NaOH para su aplicación en la industria alimentaria.

Por medio del análisis fitoquímico se encontró la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, glicósidos y taninos, los cuales fueron identificados por los cambios de coloración frente a los diferentes reactivos. La curva de calibración elaborada puede ser utilizada como curva patrón para determinar cuantitativamente la presencia de antocianinas en otras muestras.

De acuerdo a la determinación cuantitativa de la concentración de antocianina se pudo comprobar que el extracto de maíz morado (*Zea maíz. L.*) contiene altas concentraciones de antocianinas.

### **Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays L.* “Maíz morado”; (Arilmí Gorriti G, et al.).**

En este trabajo se investigaron las condiciones óptimas de extracción de antocianinas de las corontas del maíz morado mediante el empleo de un diseño completo al azar con arreglo factorial 2A3B4C4D. Los factores estudiados fueron pH, solvente, tiempo y temperatura. Los resultados mostraron antocianinas entre 8,404 y 47,984 mg/g de coronta, determinados según el método de pH diferencial. Se presenta el análisis de los cuatro factores.

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 y 4, alcanzando valores de 46,534 mg de antocianina/g muestra.

### **Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera L.*) ; (Irina Heras et. al.)**

El objetivo de esta investigación fue optimizar el proceso de extracción de antocianinas obtenidas de berenjena (*Solanum melongena L.*) y evaluar su capacidad antioxidante. A extractos de piel y pulpa se le realizaron análisis fisicoquímicos, contenido en fenoles y antocianos. Para la optimización del proceso de extracción de las antocianinas se empleó la metodología de superficie de respuesta con tres factores: concentración de solvente etanol acidificado 1% ácido ortofosfórico (50 a 90% v/v), temperatura extracción (30 a 60°C) y tiempo extracción (4 a 12 horas). La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó empleando el método ABTS (6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina). El proceso de extracción de antocianinas de la cáscara sigue un modelo cuadrático, mientras que la capacidad antioxidante tuvo un comportamiento lineal. La optimización del modelo mostró que las condiciones de extracción con 50% de solvente acidificado, tiempo de proceso de 4 horas y temperatura de 30 °C presentó los mayores contenidos de antocianinas, alcanzando 62 mg/100g.

Los factores de extracción de antocianinas tiempo (4–12 horas), temperatura (30–60°C) y la concentración de solvente (50–90%) afectan linealmente el contenido de antocianinas extraídas de la cascara de berenjena, siendo la temperatura la que ejerce un efecto cuadrático. La optimización del modelo muestra que las condiciones de extracción con 50% de solvente (Etanol), tiempo de 4 horas y temperatura de 30 °C presentó los mayores contenidos de antocianinas de 62 mg/100g en cascara de berenjena. La interacción tiempo de extracción y temperatura afecta la capacidad antioxidante de extractos de berenjena, de forma tal que su incremento provoca una disminución significativa en la actividad antioxidante. Los resultados de capacidad antioxidante en extractos de cascara de berenjena con las diferentes variables de estudio muestran una capacidad antioxidante en un rango de IC50 de 8,42 a 37,28 mg/L. El contenido de antocianinas en pulpa de berenjena Fucsia-Morada y Lila representa menos del 1% del total de fenoles encontrados en la pulpa del fruto.

## 1.6 HIPÓTESIS

### **HIPÓTESIS GENERAL:**

#### **Hs**

La evaluación de la optimización de los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*) es factible a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental

#### **Ho**

La evaluación de la optimización de los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*) no es factible a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental

## 1.7 VARIABLES

### ***Variable Independiente:***

Extracción de antocianinas a partir del maíz morado (*Zea mays L.*)

Indicadores: Variedad de maíz morado  
Métodos de extracción  
Variables de extracción

### ***Variable Dependiente:***

Optimización de los parámetros de extracción

Indicadores: Rangos de operación de la variables de extracción  
Optimización a través de superficie de respuesta

### ***Variable Interviniente:***

Método estadístico de superficie de respuesta

Indicadores: Software STATGRAPHICS

## **1.8 ASPECTOS METODOLÓGICOS**

### **Tipo y nivel de Investigación**

Investigación científica aplicada y de alto grado de correlación basado en los procesos de extracción de antocianinas.

### **Método empleado**

Se aplicará el método analítico y comparativo de superficie de respuesta. Se hará uso de ensayos de extracción al nivel de laboratorio en el orden y número que señale el software a utilizar.

### **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 maíz morado (mercados de Ayacucho).

### **Técnicas de recolección de datos**

Exploración de literatura en general, información y publicaciones relativas al tema de extracción de antocianinas, superficies de respuesta y optimización.

Experimentación directa en los distintos niveles de evaluación.

Aplicaciones y mediciones piloto.

Los datos serán almacenados y procesados utilizando el software siguiente: Statgraphic o SAS.

### **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.

Secador.

Termostatizador.

pH metro.

Agitadores – mezcladores.

Centrífuga.

Materiales de vidrio y otros menores.

Programas Statgraphics.

1.9 **MATRIZ DE CONSISTENCIA**

<b>TÍTULO DEL PROYECTO:</b>	<b>RESPONSABLE DE EJECUCIÓN:</b>
<b>Optimización de parámetros de extracción de Antocianinas del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) por el método de superficie de respuesta y verificación experimental</b>	<b>Ing° Cronwell Eduardo ALARCÓN MUNDACA</b>

<b>PROBLEMAS</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>VARIABLES E INDICADORES</b>	<b>METODOLOGÍA</b>
<p><b>PROBLEMA GENERAL:</b></p> <p>¿Se puede optimizar los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental?</p> <p><b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</b></p> <p>¿Se encuentran totalmente establecidos y explícitos los métodos de extracción y los rangos de operación de las variables que influyen en las tecnologías de extracción de antocianinas a partir del maíz morado?</p> <p>¿Se podrán optimizar los parámetros de la extracción de antocianinas del maíz morado utilizando el método de superficie de respuesta?</p> <p>¿Será confiable la optimización de parámetros frente a la verificación experimental del proceso de extracción de antocianinas?</p>	<p><b>OBJETIVO GENERAL:</b></p> <p>Evaluar la optimización de los parámetros de la extracción de las antocianinas a partir del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental</p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b></p> <p>Definir el método de extracción de antocianinas a partir del maíz morado y establecer el rango de operación de las variables que influyen en su extracción.</p> <p>Evaluar la optimización de los parámetros de extracción de antocianinas del maíz morado utilizando el método de superficie de respuesta.</p> <p>Contrastar la optimización de parámetros con la verificación experimental del proceso de extracción de antocianinas.</p>	<p><b>HIPÓTESIS GENERAL:</b></p> <p><u><i>Hs</i></u></p> <p>La evaluación de la optimización de los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) es factible a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental</p> <p><u><i>Ho</i></u></p> <p>La evaluación de la optimización de los parámetros de la extracción de antocianinas a partir del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) no es factible a través del método estadístico de superficie de respuesta y su validación por medio de la verificación experimental</p>	<p><b>Variable Independiente:</b></p> <p>Extracción de antocianinas a partir del maíz morado (<i>Zea mays L.</i>)</p> <p>Indicadores: Variedad de maíz morado</p> <p>Métodos de extracción</p> <p>VARIABLES DE EXTRACCIÓN</p> <p><b>Variable Dependiente:</b></p> <p>Optimización de los parámetros de extracción</p> <p>Indicadores: Rangos de operación de la variables de extracción</p> <p>Optimización a través de superficie de respuesta</p> <p><b>Variable Interviniente:</b></p> <p>Método estadístico de superficie de respuesta</p> <p>Indicadores: Software STATGRAPHICS</p>	<p><b>TIPO DE INVESTIGACIÓN.</b></p> <p>Científica, aplicada y correlacional</p> <p><b>NIVEL</b></p> <p>Desarrollo tecnológico y predictivo</p> <p><b>MÉTODO</b></p> <p>Experimental y de Simulación matemática</p> <p><b>DISEÑO</b></p> <p>Por objetivos, de progresión sistemática</p> <p><b>TÉCNICAS</b></p> <p>Análisis lógico y estadístico de resultados.</p> <p><b>INSTRUMENTOS</b></p> <p>Espectrofotómetro pHmetro. Termómetros. Software STATGRAPHICS.</p>

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. ESTUDIO DE LA MATERIA PRIMA**

La materia prima para el presente proyecto de investigación es el maíz morado (granos y masorca), de la cual interesa el contenido de antocianinas, que es el colorante natural de interés.

##### **2.1.1. Maíz morado (*Zea mays L.*)**

El maíz morado constituye una de las muchas variedades de la especie *Zea mays L.* Este maíz recibe la denominación de “**morado**” cuando el pericarpio, las glumas y la tusa o coronta presentan un color muy oscuro, casi negro, por la acumulación de pigmentos antociánicos, que son utilizados desde la antigüedad en el Perú para colorear la chicha y la mazamorra morada. En la actualidad el pigmento antociánico del maíz morado es requerida por la industria alimentaria y farmacéutica, que en los últimos años ha generado un gran interés por la línea de los colorantes y productos naturales, sobre todo en los países desarrollados, donde se restringe el uso de colorantes artificiales.

### 2.1.2. Clasificación botánica del maíz morado

El maíz morado es una planta monocotiledónea, de estambres hipogéneos, perteneciente a la familia de las gramíneas. La posición botánica de la planta es (Manrique Ch. A. 1995):

Reino	:	Vegetal
División	:	Fanerógama
Sud división	:	Angiosperma
Sub clase	:	Glomiflora
Orden	:	Gramínea
Tribu	:	Maydeae (tripsaceae)
Género	:	Zea
Nombre Común	:	Maíz Morado

Por lo que el maíz morado es conocido bajo el nombre de *Zea mays L.*, raza Kcully

### 2.1.3. Morfología general

La planta del maíz morado, es una gramínea monoica. Presenta un sistema redicular fibroso de raíces adventicias (se origina en el tallo) denominadas raíces zancos que se forman en los nudos inferiores del tallo y que se van introduciendo en el terreno para fijar mejor la planta.

El tallo es de forma cilíndrica y nudoso, en su parte interna presenta una masa esponjosa de color blanco y rica en azúcar. El tallo puede medir de 2,0 a 2,4 metros de altura. Las hojas son alternas y envainadoras, el limbo se parece a una cinta, por esto recibe el nombre de lineal, es de borde entero y venación paralela. Entre la vaina y el limbo existe una laminilla membranosa llamada Lígula.

Las flores masculinas se encuentran agrupadas formando un penacho situado en la parte terminal del tallo; cada flor masculina consta de tres estambres de filamentos muy delgados y protegidos por dos hojitas (brácteas) llamadas glumillas. Las flores femeninas carecen de pedúnculo y se disponen a lo largo de un eje (tal inflorescencia recibe el nombre de espigal); cada flor femenina

consta de un pistilo. Los estilos y estigmas son largos, delgados y conocido con el nombre popular de “barbas” o “pelusa de choclo”.

Las flores femeninas están cubiertas por brácteas numerosas llamadas corrientemente con el nombre de panca, sobresalen únicamente los estigmas para recoger el polen. La polinización se realiza por medio del viento. Los elementos masculinos y femeninos de la flor no coinciden en sus fechas de floración ya que la emisión del polen procede a la inflorescencia femenina, la planta es muy propensa a hibridizarse.

Al eje se le da el nombre de la coronta, tusa o marlo y el fruto recibe el nombre de cariósipide, es seco indehiscante y contiene una sola semilla pegada al pericarpio, la cual es rica en almidón; de donde el maíz morado es un maíz amiláceo. El color de la planta es muy variable, va del verde al morado oscuro. Lo que se mantiene invariable, es el color de la lígula de las hojas; que siempre es muy oscura y el color morado oscuro de las anteras.

Este tipo de maíz tiene en común el color oscuro, casi negro del pericarpio del grano y el de su coronta. (Manrique Ch. A. 1995)

#### **2.1.4. Características genéticas del maíz morado**

Se conoce un gran número de variedades de maíz morado que se diferencian por la forma y tamaño de mazorcas, por el número de hileras que varían de 8 a 12, por el tamaño, forma y color del pericarpio de los granos y por otras características morfológicas. El color de la planta varía de verde a morado oscuro, pero la lígula de las hojas y de las anteras son invariables, teniendo siempre un color morado oscuro.

La diferencia entre un maíz fuertemente pigmentado y un maíz normal es originada por muchos genes, los genes que se dan a continuación son necesarios para que el pericarpio sea morado:

- **Prr** (alelo del locus P, en cromosoma 1), que produce normalmente pericarpio rojo y tusa roja.

- **p1** (alelo dominante en el cromosoma 6), produce color púrpura morado o marrón en las plantas y es necesaria su presencia para que la tusa sea morada.
- **Alelo r.** (del locus R en el cromosoma 10) produce pericarpio negro y enteras moradas oscuras.

Además de los genes mayores que están presentes al menos en 5 de los 10 cromosomas del maíz existen genes menores que deben estar distribuidos en los 10 cromosomas. Esto hace que sea materialmente imposible transferir los genes de los maíces morados peruanos, a las variedades foráneas, usando los métodos convencionales de mejoramiento genético para transferir genes de una población a otra (**Manrique Ch. A.** 1995).

#### 2.1.5. Variedades de maíz morado

Hay diferentes variedades de maíz morado, todas ellas provienen de una raza ancestral denominada "**Kculli**" que todavía se cultiva en el Perú. Las formas más típicas están casi extinguidas. La raza Kculli es muy antigua, restos arqueológicos con mazorcas típicas de esta raza se han encontrado en Ica, Paracas, Nazca y otros lugares de la costa central cuya antigüedad se estima por lo menos en 2500 años. También se encuentran mazorcas moldeadas, con las características de la raza, en la cerámica Mochica (**Sevilla y Valdez**, 1985).

**Mangeldorf** (1943) refiere que el Kculli es una de las cinco razas ancestrales de las que se han originado todas las demás, actualmente en existencia en el mundo. Existen muy pocas razas que presentan pigmentos antociánicos en el grano y la coronta. En Sudamérica, donde se encuentran con mayor frecuencia, se encuentra el Kculli de Bolivia, que es muy parecida al peruano, tanto en la morfología de la planta y mazorca, como en la intensidad de coloración; el negrito chileno, que tiene la mazorca más pequeña y los granos delgados, aunque presenta más hileras de granos; el Kculli Argentino, que tiene las mazorcas más grandes y se diferencian de las otras razas similares de Sudamérica en que los granos son más duros.

En el Perú existen muchas variedades de maíz morado. A continuación se describen las principales (**Manrique Ch. A.** 1995):

- **Cusco Morado.-** Variedad relacionada a la raza cusco gigante, es tardía y de granos grandes, dispuestos en mazorcas de 8 hileras muy bien definidas, se cultiva en diferentes lugares en zonas intermedias de altitud en los departamentos de Cuzco y Apurímac.
- **Morado Canteño.-** Derivada de la raza Cusco, con características de mazorcas muy similares a la raza Cusco Morado, aunque de menores dimensiones. Es más precoz, se cultiva en muchos lugares de la Sierra del Perú, pero especialmente en las partes altas del valle de Chillón, en el departamento de Lima hasta los 2500 m.s.n.m. Es la variedad que más se consume en el mercado de Lima, la tusa presenta una intensa pigmentación.
- **Morado de Caraz.-** Derivado de las razas Ancashinas y Alazan, en la localidad de Caraz, en el Callejón de Huaylas, en extensiones relativamente grandes. Es de precocidad intermedia y tiene la ventaja que puede adaptarse también a la costa. Entre las variedades tradicionales es la que muestra mayor capacidad de rendimiento y la que presenta la tusa más pigmentada.
- **Morado Arequipeño.-** Similar al Cusco Morado, pero más pequeño, la tusa no tiene mucha coloración, como el de las otras variedades, pero en la colección hecha en Arequipa se encuentra mucha variabilidad para esta característica, por lo que puede ser mejorada. Es más precoz que las variedades previamente citadas. Arequipa se encuentra mucha variabilidad para esta característica, por lo que puede ser mejorada. Es más precoz que las variedades previamente citadas.
- **Negro Junín.-** Variedad precoz, de grano grande, negro, dispuesto irregularmente en una manzana corta y redondeada, se le encuentra en la sierra centro y sur hasta Arequipa, ocupando alturas mayores que las otras variedades.
- **Variedad Mejorada.-** La única que está en producción actualmente es PMV-581(V) mejorada del Programa de Maíz, de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

- **PMV-581.-** Es una variedad mejorada del morado canteño. Presenta plantas moradas que en promedio tienen 2.00 mts de altura y florea entre los 100 a 120 días. Se siembra entre los 800 a 2000 msnm. La planta es de precocidad intermedia, de 7 a 8 meses de período vegetativo con una o dos mazorcas implantadas en la longitud media del tallo. Se caracteriza por presentar el pericarpio y la tusa completamente morada. Su rendimiento está entre 3 y 5 TM/Ha.

### 2.1.6. Características del maíz morado

El fruto del maíz morado es una mazorca (tusa y grano) que contiene el pigmento antociánico, la que se encuentra en mayor cantidad en la coronta o tusa y en menor proporción en el pericarpio (cáscara) del grano. Este fruto esta constituido por 80 % de grano y 20 % de coronta o tusa (Manrique Ch. A. 1995).

En el cuadro N° 1.1 se presenta las dimensiones de la mazorca y el grano y otras características físicas.

**Cuadro N° 1.1** Dimensiones de mazorcas y granos del maíz morado

CARACTERÍSTICAS	PROMEDIO	MÁXIMO	MÍNIMO
Largo de mazorca (cm)	15,0	20,0	12,0
Ancho de mazorca (cm)	5,0	5,8	4,0
Número de hilera	10,0	12,0	8,0
Número de granos por hilera	25,0	36,0	18,0
Largo del grano (mm)	11,6	13,0	10,4
Ancho del grano (mm)	5,6	6,2	5,0
Espesor del grano (mm)	6,0	6,5	5,5

**Fuente:** Boletín de Información técnica del Ministerio de Agricultura-Lima Perú, 1998

En el cuadro N° 1.2 se presenta la composición físico químico proximal del grano y la coronta del maíz morado.

**Cuadro N° 1.2** Composición físico química del grano y la coronta del maíz morado (variedad morado canteño)

COMPONENTE	PORCENTAJE	
	GRANO	CORONTA
Humedad	11,4	11,20
Proteína	6,7	3,74
Grasa	1,5	0,32
Fibra	1,8	24,01
Cenizas	1,7	3,31
Carbohidratos	76,9	57,42
<b>TOTAL</b>	<b>100.00</b>	<b>100.00</b>

Fuente: Delgado Espinoza, J.- Tesis UNALM, 1987.

### 2.1.7. Usos del maíz morado

El origen del maíz morado es muy remoto y el uso de sus extractos es también antiguo. Según datos de los historiadores se sabe que el maíz era empleado en la alimentación, con él se elaboraba la “chicha” que viene a ser una bebida fermentada.

El uso de su extracto sufrió un cambio con el tiempo así es como en la colonia, por influencia de la repostería española y por el ingenio de las amas de casa criollas aparecieron la “mazamorra morada” y “chicha” morada de sabores exquisitos (*Fernández, 1977*).

Actualmente el maíz morado es usado a nivel casero, como colorante natural y saborizante de bebidas y otros preparados alimenticios como la “mazamorra morada”. A nivel industrial, con fines de obtener colorante se utiliza únicamente la coronta por el significativo porcentaje del pigmento de antocianinas presentes; sin embargo también se puede aprovechar el grano para la extracción de almidones y/o derivados o en la elaboración de alimentos balanceados para animales.

### 2.1.8. Producción nacional de maíz morado

El maíz morado se produce en las diferentes regiones del país, tal como se presenta en el siguiente cuadro.

**Cuadro N° 1.3** Producción nacional del maíz morado expresado en toneladas.

Años	2009	2010	2011	Var. %	Part. %
Cuzco	62,486	45,153	56,882	25.98	22.25
Apurímac	28,354	29,013	30,128	3.84	11.78
Cajamarca	35,054	33,787	29,564	-12.50	11.56
Huancavelica	23,372	18,893	19,743	4.50	7.72
La Libertad	20,482	20,305	17,789	-12.39	6.96
Junín	16,834	17,321	17,025	-1.71	6.66
Piura	17,502	13,201	16,373	24.03	5.92
Huánuco	18,137	16,483	15,128	-8.22	5.92
Ancash	11,123	11,977	12,458	4.02	4.87
Ayacucho	16,596	16,260	10,412	-35.97	4.07
Arequipa	9,885	11,243	9,719	-13.56	3.80
Puno	6,622	5,955	6,008	0.89	2.35
Amazonas	5,660	4,946	5,844	18.16	2.29
Lambayeque	6,819	6,125	3,268	-46.64	1.28
Tacna	1,897	2,126	1,803	-15.19	0.71
Lima	2,064	1,929	1,738	-9.90	0.68
Moquegua	844	912	890	-2.41	0.35
Pasco	1,619	1,633	594	-63.63	0.23
Ica	453	313	285	-8.95	0.11
<b>TOTAL</b>	<b>285,803</b>	<b>257,575</b>	<b>255,651</b>	<b>-0.75</b>	<b>100</b>

Fuente: Ministerio de Agricultura.

### 2.1.9. Principio activo de coloración del maíz morado

El principio activo que caracteriza a la coloración del maíz morado se basa en la existencia de la antocianina; la que se encuentra en mayor proporción en la coronta y en menor proporción en el pericarpio (cáscara) del grano tal como se muestra en el cuadro N° 1.4.

**Cuadro N° 1.4** · Contenido aproximado de antocianina en el maíz morado seco (variedad morado canteño)

FRACCIÓN	% ANTOCIANINA
Coronta	1,0 – 1,2
Grano	0,15 – 0,20

Fuente: Delgado Espinoza – Tesis UNALM.

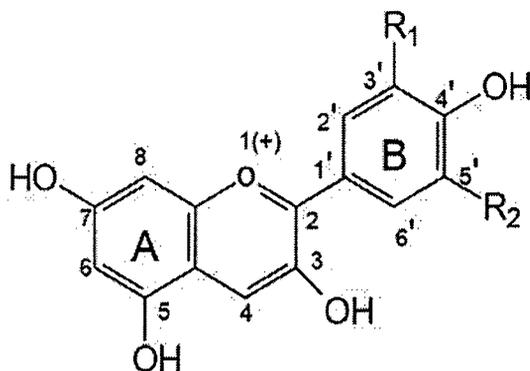
Resultados de pruebas cualitativas permiten afirmar que los grupos predominantes en el colorante del maíz morado son la cianidina, pelargonidina, peonidina (*Shrikhande*, 1976; *Hoagland y Hendry*, 1992).

## 2.2. NATURALEZA QUÍMICA DE LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas, son pigmentos solubles en agua, las cuales son responsables del atractivo color de las flores, frutas, frutos y hojas coloreadas de una planta; variando desde un color rosado, pasando por rojo, y en muchos casos de color violeta y azul.

El término antocianina se deriva del griego “*Anthas*” – azul- y “*Cyanin*”- flor; este nombre fue derivado por *Marquant* (1835) para designar los pigmentos azules de las flores. Luego se descubrió que no solo el color azul, sino el púrpura, violeta y posiblemente todas las tonalidades de rojo, las cuales aparecen en muchas flores y frutas, son debidas a pigmentos químicamente similares a las *Antocianinas de Marquant*.

Las antocianinas son sales (*flavylium*) derivadas principalmente de las antocianidinas (agliconas y agluconas): Pelargonidina, Cianidina, Peonidina, Delfinidina, Petunidina y Malvidina. La Cianidina ocurre al nivel menos evolucionado. Las otras antocianidinas que ocurren en la naturaleza son derivados de una adición genéticamente controlada, remoción o metilación del grupo dióxido (Delgado Espinoza, 1989).



Aglicona	Substitución		$\lambda_{max}$ (nm) espectro visible
	R1	R2	
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)
Malvidina	OCH3	OCH3	510 (azul-rojo)

Figura N° 1.1 Estructura química de la antocianina (*Durst & Wrolstad, 2001*)

Cuadro N° 1.5 Estructuras y modelos de la sustitución de algunas antocianidinas que ocurren naturalmente.

ANTOCIANIDINA	MODELOS DE LA SUSTITUCIÓN ( R )						COLOR
	3	5	6	7	3'	5'	
Pelargonidina (Pg)	OH	OH	H	OH	H	H	Anaranjado
Cianidina (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	H	Anaranjado-rojo
Delfeinidina (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	Azul-rojo
Peonidina (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	H	Anaranjado-rojo
Petunidina (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Azul-rojo
Malvidina (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OMe	Azul-rojo
Apigenidina (Ap)	H	OH	H	OH	H	H	Anaranjado
Luteonidina (Lt)	H	OH	H	OH	OH	H	Anaranjado
Tricetidina (Tr)	OH	OH	H	OH	OH	OH	Rojo
Aurantidina (Au)	OH	OH	OH	OH	H	H	Anaranjado
6-Hydroxy-Cy(60HCy)	OH	OH	OH	OH	OH	H	Rojo
6-Hydroxy-Dp(60HDp)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Azul-rojo
Rosinidina (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	H	Rojo
Hirsutidina (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Azul-rojo
5-Methyl-Cy(5Mcy)	OH	OMe	H	OH	OH	H	Anaranjado-Rojo
Pulchellidina (Pl)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	Azul-rojo
Europinidina (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	Azul-rojo

Fuente: Hendry Houghton, Natural Foods Colorants.

La glicosidación de estos pigmentos en posiciones 3, 5 ó 7 ó una combinación de estos, resulta en la formación de antocianinas. El azúcar en la molécula confiere solubilidad y estabilidad a las antocianinas. Las antocianinas siempre ocurren en la naturaleza en formas glicosídicas. Sin embargo, la ocurrencia de aglucógenos ha sido reportada de tiempo en tiempo. Es inusual que estos compuestos se presentan en la naturaleza considerando su inestabilidad e insolubilidad en agua. La naturaleza anfotérica es una propiedad característica de estos componentes, debido a esto, las antocianinas se comportan ya sea como ácido o base dependiendo de la naturaleza del medio (**Shrikhande**, 1976). Los azúcares unidos al aglucon mediante enlaces glicosídicos son: pentosas, hexosas, biosas y triosas, basado en la posición de aleación y en la naturaleza de los azúcares sustituyentes.

Los extractos acuosos compuestos principalmente de pelargonidina y cianidina, son rojo naranja; aquellos con peonidina son rojo frambuesa, mientras que las otras antocianinas son rojo azulino. La gran variedad de colores, matices y tintes que ocurren en la naturaleza y el sutil matizado en la mejilla de una fruta o en el florecimiento, son el resultado de cierto número de factores a saber.

El pH afecta la coloración, reportándose lo siguiente:

- **A pH menor a 3** estos pigmentos son de un color rojo, el matiz puede ser diferente, pero ellos son todos rojizos. Así la pelargonidina (ocurre en la planta como pelargonina o algunos derivados) es rojo naranja en solución ácido, mientras que la delphinidina es rojo azulino.
- **A pH mayor a 4,5** las antocianinas pasan a través de color violeta hasta alcanzar un color azul; a altos valores de pH, hay un viraje a verde y luego amarillo (esto no es encontrado en plantas). Se plantea que cuando un alcali como KOH es adicionada a una antocianina, ocurre la reacción que se muestra en la figura 1.2.
- La **concentración de los pigmentos** altera los matices. **Robinson** (1939), mencionado por **Hoagland** (1976), reportó que cuando una solución ácida de delphinidina sintética es vertido sobre papel de filtro, una solución diluida da un color azul, mientras que una solución intermedia da un color púrpura.

- En la savia celular las antocianinas son frecuentemente absorbidas sobre partículas coloidales, probablemente los polisacáridos o el pH es estabilizar y el color es influenciado por esta asociación.

### **2.2.1. Factores que influyen la estabilidad de las antocianinas**

Dado que la estructura química de la antocianina es deficiente en electrones, el núcleo flavilium de las antocianinas es altamente reactivo, por lo tanto, estos compuestos cambian rápidamente hasta estructuras indeseables y cambian de color bajo la diversidad de condiciones empleadas en el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios. El rango de destrucción de pigmentos antociánicos es acelerado por un pH alto, presencia de oxígeno, incremento de temperatura, presencia de ácido ascórbico, azúcares, enzimas, etc.

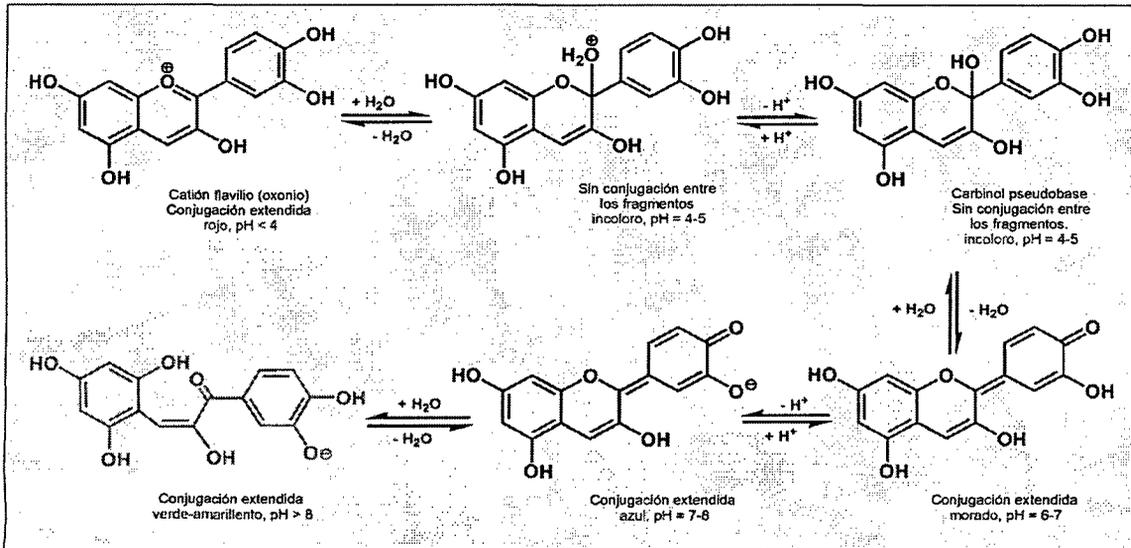
A continuación se expone los principales factores que influyen sobre las antocianinas:

#### **a) pH:**

El color exhibido por las antocianinas es grandemente influenciado por el pH del medio. Un pH bajo sería deseado para estabilizar el color de las antocianinas. En rango de pH ácido los pigmentos antociánicos existen enteramente en la forma roja de sal flavilium. A pH 7,0 – 8,0 el pigmento exhibe un color profundamente púrpura o se desarrolla un color amarillo debido a la formación de chalconas. Estas reacciones de transformación estructural permiten el uso de antocianinas en medios marcadamente ácidos.

#### **b) Temperatura:**

Independientemente de los mecanismos operativos de degradación específica en antocianinas en productos de frutas, es esperado que sus efectos totales pueden ser dependientemente de la temperatura. También se espera que el efecto de la temperatura podría ser gobernado por la variación estructural de antocianinas y la cantidad de pigmentos inicialmente presentes. La temperatura de degradación de las antocianinas esta por encima de 90 – 100 °C.



**Figura 1.2** Transformaciones estructurales de las antocianinas frente a variaciones en el pH (basado en cianidina 3,5 diglicósido).

**c) Oxígeno y peróxido de Hidrógeno:**

Conjuntamente con la temperatura, el oxígeno es el agente acelerativo más específico en la degradación de pigmentos antociánicos en diversas frutas y vegetales. En cuanto a la acción del peróxido de hidrógeno, se ha sugerido la posibilidad de que la destrucción inducida por el ácido ascórbico de antocianinas en fresas procesadas sea debida al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado durante la oxidación de este ácido (*Sondheimer y Kertesz, 1953*).

**d) Luz:**

Las antocianinas son generalmente inestables cuando son expuestas a rayos UV o VIS o radiación ionizante.

**e) Metales:**

Las antocianinas son estables en condiciones fuertemente ácidas. A causa de la inestabilidad de sus bases anhidro, estos compuestos favorecen la decoloración en el rango de pH 4 a 6. Las antocianinas se estabilizan a través de la formación de complejo metálico, por ejemplo: La adición de cloruro de aluminio ha sido bastante reconocida como estabilizador de las antocianinas.

f) **Azúcares:**

La función de los azúcares sobre la estabilidad de las antocianinas es muy compleja se ha observado que la fructuosa, arabinosa, lactosa es mas perjudicial que la glucosa, sacarosa o maltosa (*Buckmir et al.*, 1976 mencionado por *Furia*, 1977).

g) **Enzimas:**

En frutas recién cosechadas, la pérdida de antocianina ha sido atribuida a la actividad del sistema enzimático glicosidasa y polifenol oxidasa, las cuales hidrolizan el protector 3-glicósido de las antocianinas para producir azúcares libres y agliconas inestables.

**2.2.2. Presencia del pigmento antociánico en la naturaleza**

La presencia del pigmento de antocianinas se puede reportar en diversas frutas y vegetales en diversas concentraciones; a continuación se presentan algunos materiales que contienen antocianinas.

**Cuadro N° 1.6** Contenido de antocianinas en algunas materias primas.

PRODUCTO	ANTOCIANINA (%)	FUENTE
Anil trepador ( <i>cissus sicyoides linn</i> )	0,120	Toledo et. Al (1983)
Uvas trosseau	0,085	Carreño y Luh (1969)
Cereza roja	0,040	Dekasos (1970)
Arandano fresco	0,100	Fuleki y Francis (1968)
Orujo de vino francés	0,157	Yokohama et-al (1981)

**Fuente:** Delgado Espinoza. Tesis – UNALM (1989).

### 2.3. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

Existen diversas técnicas de extracción de antocianinas a partir de diversas materias primas, que usualmente utilizan soluciones acuosas sinergetizadas con algún tipo de alcoholes y modificadores de pH, bajo diversas condiciones térmicas de extracción, tratamiento o granulometría de la materia seca y estado hidrodinámico del sistema de extracción o lixiviación.

El método usual de extracción, de antocianinas, es por maceración de la muestra con una solución de HCl 1% en metanol (en etanol en caso de utilizarlos para alimentos), dejándolo toda la noche en la refrigeradora (tener cuidado de dejar el recipiente cubierto en la refrigeradora, especialmente cuando se trata de la solución metanólica). La solución de antocianina así obtenida se concentra al vacío a una temperatura menor de 30 °C y luego se cromatografía sobre papel Whatman N° 3. Puede utilizarse una serie de sistemas: BAW (n-butanol: ácido acético glacial: agua, 4:1:5, fase superior); Bu: HCl (n-butanol: HCl 2N, 1:1, fase superior); fórmico (ácido fórmico: HCl conc: agua, 5:5:3), forestal (HOAc glacial): HCl conc: agua 30:3:10), entre otros. Si la muestra contiene apreciable cantidad de azúcares puede emplearse 1% HCl en agua, lo que produce mejores resultados. (**Cuadros A.**, 2001).

Además de la metodología usual de extracción descrita, es conveniente considerar lo siguiente:

- La extracción puede realizarse también en frío con solventes no acidificados, como metanol 60%, n-butanol, etilenglicol, propilenglicol, acetona, mezcla de acetona/metanol/agua, o simplemente con agua a ebullición; en todos estos casos se espera que las antocianinas sean extraídas en el estado más natural posible, ya que un medio ácido, como HCl, podría alterar su estado original, además que puede producirse pérdida de grupos ácido lábiles y de azúcares.
- Como medio ácido puede utilizarse además de HCl, ácidos orgánicos débiles como el fórmico y ácido tartárico.

- El uso de etanol conteniendo 200 a 2000 ppm de SO<sub>2</sub> incrementa el rendimiento de extracción, resultando un extracto que posee hasta dos veces el poder tintóreo en comparación al uso de etanol solamente. (*Cuadros A.*, 2001).

### 2.3.1. Métodos de obtención de Antocianinas

Como las antocianinas están presentes en numerosas plantas y frutas, así como el contenido de la misma varía mucho dependiendo de factores tales como: especie, variedad, condiciones de crecimiento, estado fisiológico de la planta y el fruto, tamaño y posición del fruto en la planta, aplicación de agroquímicos, etc (*Blank*, 1958; *Ribéreau-Gayon*, 1959, citado por *F. J. Francis*), también existen numerosos procesos de extracción y obtención de antocianina para cada planta o fruto.

Entre los diversos métodos propuestos para la obtención de antocianina como colorante potencial para los alimentos se pueden describir algunas técnicas:

#### a) **V. V. ARDREEV & E. M. SHPRIZMAN (1969)**

Según el método se emplea como solvente una solución de dióxido de azufre en agua acidificada que extrae el pigmento de las cáscaras de uvas. El dióxido de azufre luego se elimina por calentamiento. Posteriormente el extracto es filtrado y purificado para ser concentrado y secado.

#### b) **CHIRIBOGA & FRANCIS (1970)**

Para los autores la incorporación del ácido clorhídrico tiene un efecto remarcable que mejora la extracción de las antocianinas del arandino. La extracción se realiza con metanol. Afirman que este solvente sin ácido extrae sólo 5% de pigmento en ½ hora, con incrementos de 0,03% de HCl la extracción aumenta al 19% en ½ hora y 49% en 3 horas. Luego el extracto es purificado y concentrado a vacío, por el cual todo el metanol es retirado, luego este es secado.

#### c) **ESSELEN (1975)**

Describió un sistema de extracción simple con agua caliente para extraer el pigmento antocianínico de los cálices del Rosselle (*Hibiscus Sabdariffa*). El

extracto acuoso está acidificado con ácido cítrico. El pigmento es relativamente fácil de extraer y es "limpia" la preparación y contiene pequeñas cantidades de otros compuestos polifenólicos.

**d) MARKAKIS (1976)**

Describe que el solvente clásico para la extracción de antocininas es algún alcohol de bajo punto de ebullición (metanol o etanol) conteniendo pequeñas cantidades de ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico mantiene el pH y convierte en sales cloradas a las antocianinas muy solubles.

**e) PERASKA (1979)**

Utiliza para la extracción, de las antocianinas de las uvas, una solución acuosa acidificada con ácido clorhídrico, añadiéndole además enzimas (amilasa y proteasa), para incrementar la pureza del colorante. La mezcla fue filtrada y concentrada para luego ser secada por atomización.

**f) KIKUCHI et. al. (1976)**

**Método 1.-** Se tritura 1,0 kg de maíz morado pasándolo por una malla 30 ASTM, se remoja en 10 L de agua mezclándose bien, se calienta la mezcla hasta una temperatura de 100 °C, luego se le enfría a 80 °C; se le agrega 10 g de amilasa en forma líquida (Potencia 10 000 unidades/gramo) y se le deja por 30 minutos a una temperatura de 80 °C y luego se le enfría a 50 °C, se le agrega 20 g de endopeptitasa y se deja a 50 °C por 3 horas y luego se filtra, para concentrar y secar por atomización (spray dryer), obteniéndose de ésta manera antocianina en polvo.

**Método 2.-** Se tritura 1,0 kg de maíz morado pasándolo por una malla 30 ASTM, se remoja en 20 L de agua, mezclándose bien, se calienta, la mezcla, hasta una temperatura de 100 °C, luego se enfría a 80 °C, se agrega 100 g de amilasa en forma líquida (potencia 10 000 unidades/gramo) se deja enfriar por 30 minutos a una temperatura de 80 °C, luego se enfría a 40 °C, se agrega 50 g de  $\beta$ -amilasa (potencia 4000 unidades/gramo), se agrega 200 g de endopeptitasa de origen microbiológico, procesándose después que se mezcle durante 2 horas y luego se filtra para después tratarse por inmersión, usando una presión de 3 kg/cm<sup>2</sup> utilizando un equipo de ultra filtración por membrana luego el líquido transparente así obtenido se somete a un secado

por atomización con las prácticas normales, obteniéndose de esta manera antocianina en polvo.

**g) YASUDA et. al. (1975)**

Se trata 1 kg de maíz morado a 70 – 80 °C con 4 L de agua conteniendo 8 g de ácido sulfúrico. El extracto luego se filtra. El filtrado (2,2L) se neutraliza con carbonato de calcio y luego es concentrado. El extracto concentrado es filtrado y el filtrado se seca obteniéndose 50 g de antocianina en polvo.

**h) ARIAS (1958)**

Se realiza una extracción acuosa para obtener el extracto de maíz (chicha morada). Usó el sistema percolante con cinco contactos o extracciones y tiempos de contacto de 15 minutos. Mencionó que al extraer a 100 °C se nota un cambio en la coloración del extracto, mientras que al hacerlo a 90 °C no ocurre alteración objetiva. Recomienda finalmente la temperatura de 90 °C por no encontrar una diferencia muy amplia en la cantidad de “extraíbles” obtenidos. El extracto luego lo concentró evaporando el agua para finalmente secarlo por atomización.

**2.3.2. Variables y rangos de operación para la extracción de Antocianinas**

En relación a la extracción, el método usual de extracción es la extracción sólido-líquido. El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz (Pereira-Kechinski *et al.*, 2010; Garzón, 2008).

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como también en la concentración de antocianinas extraídas (Bridgers *et al.*, 2010).

Así, se debe maximizar la recuperación de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su

estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos.

En este sentido, Gorriti-Gutierrez *et al.* (2009a) estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Ensayaron extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75 °C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25 °C y 30 minutos. También se ha estudiado la influencia de otras variables de proceso como el tipo de solvente de extracción y el pH.

Así, Gorriti-Gutierrez *et al.* (2009b) concluyeron que la extracción se ve favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20% como agente de extracción y un pH entre 2 y 4.

Cacace y Mazza (2003) publicaron un trabajo que consistió en la optimización de la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras usando etanol acuoso como solvente de extracción. Las variables independientes seleccionadas por estos investigadores fueron: concentración de etanol, temperatura y relación solvente-sólido. Dos de las respuestas evaluadas fueron la concentración de polifenoles totales y la concentración de antocianinas. Los resultados obtenidos mostraron que la mejor extracción fue para una concentración de etanol de 60%, relación solvente-sólido 19L:1kg de frutos y temperatura de 30 °C. La elevación de la temperatura de extracción no afectó la extracción de fenoles pero provocó una disminución en el rendimiento de extracción de antocianinas, debido a la degradación de las mismas. Estos autores identificaron la existencia de una temperatura crítica a partir de la cual la degradación fue mayor. Esta temperatura aumentó con la concentración de etanol. Así, para una concentración de etanol de 20%, la temperatura crítica fue 25 °C, mientras que para una concentración de etanol de 95%, la temperatura crítica fue 35 °C. En general, obtuvieron una fuerte disminución en la concentración de las antocianinas extraídas a temperaturas superiores a 45 °C.

También Fan *et al.* (2008) investigaron sobre las condiciones de extracción de antocianinas presentes en batata morada. Trabajaron con las variables: temperatura de extracción (40-80 °C), tiempo (60-120 min) y relación sólido-líquido (1:15-1:30) y como respuesta evaluaron el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura de extracción y la relación sólido-líquido influyeron en el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo no tuvo efecto significativo. Estos autores obtuvieron que la mejor combinación de las variables fue: temperatura de 80 °C, relación sólido-líquido 1:32 y tiempo de extracción 60 minutos.

#### 2.4. SITUACIÓN COMERCIAL DE LAS ANTOCIANINAS

Es importante presentar una revisión panorámica del estado de comercialización del maíz morado y las antocianinas en nuestro país hacia los mercados internacionales, que nos ayudan a comprender la importancia de la gestión y la ingeniería del recurso natural.

**Cuadro N° 1.7** Evolución de las exportaciones de antocianina y de maíz morado en valor FOB.

Año	2008	2009	2010	2011	2012	Var. %
Materias colorantes de origen vegetal o de Maíz Morado (Antocianina)	8,760	22,210	39,335	115,411	118,549	2.72
Maíz morado ( <i>Zea mays</i> amilacea cv morado)	528,799	691,025	590,801	624,096	789,428	26.49

**Fuente:** SUNAT, Asociación Regional de Exportadores – AREX.

El nivel de exportaciones de la antocianina, muestra un crecimiento continuo en el periodo del año 2008 hasta el 2012; lo que significa que tuvo un ascenso de 1,253% durante este periodo, por lo que se infiere que goza de gran potencial y es muy requerida en los mercados, por gozar de beneficios para la salud y de utilidad industrial.

Las cifras del maíz morado muestran el dinamismo comercial de las exportaciones de este producto, superando los US\$ 500 mil anuales y creciendo ascendentemente durante los últimos años; en el periodo en estudio se muestra solo un descenso en el año 2010, recuperándose al siguiente año.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

**Cuadro N° 1.8** Evolución de las exportaciones de Antocianina y del maíz morado en kg

Año	2008	2009	2010	2011	2012	Var. %
Materias colorantes de origen vegetal o de Maíz Morado (Antocianina)	70	175	875	1,268	982	-22.58
Maíz morado ( <i>Zea mays amilacea cv morado</i> )	398,470	402,155	396,496	351,801	411,137	16.87

Fuente: SUNAT, Asociación Regional de Exportadores – AREX.

**Cuadro N° 1.9** Empresas exportadoras de antocianina en valor FOB

EXPORTACIONES DE ANTOCIANINA EXPRESADOS EN VALOR FOB							
EMPRESAS	2008	2009	2010	2011	2012	% Part.	Variac. %
GLOBENATURAL INTERNACIONAL S.A.	8,760.00	22,210.00	37,575.00	98,197.00	110,363.00	93.09	12.39
PERUVIAN HERITAGE S.A.C	-	-	-	-	4,989.00	4.21	100
SOLNATURA E.I.R.L.	-	-	-	-	3,195.00	2.70	100
ECOANDINO S.A.C.	-	-	810.00	14,050.00	-	0	-100
AGROIND.SERV.Y NEG.INTERNAZIONALE S.A.C	-	-	-	2,200.00	-	0	-100
REATEGUI OTERO JAIME JOSE	-	-	415.00	412.00	-	0	-100
LOS CUYES S.A.C.	-	-	535.00	-	-	0	-100
ALEOLL S.A.C.	-	-	-	462.00	-	0	-100
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES	-	-	-	72.00	-	0	-100
CHR HANSEN S.A.	-	-	-	18.00	-	0	-100
<b>TOTAL</b>	<b>8,760.00</b>	<b>22,210.00</b>	<b>39,335.00</b>	<b>115,411.00</b>	<b>118,549.00</b>	<b>100</b>	<b>2.72</b>

Fuente: SUNAT, Asociación Regional de Exportadores – AREX.

**Cuadro N° 1.10** Mercados para la exportación de antocianina, durante el periodo 2008 – 2012, expresados en valor FOB

MERCADOS	2008	2009	2010	2011	2012	% Part.	Variac. %
Estados Unidos	8,760.00	22,206.00	37,575.00	89,012.00	109,202.00	92.12	22.68
Alemania	-	-	-	-	4,989.00	4.21	100
República Checa	-	-	-	-	3,195.00	2.70	100
México	-	4.00	-	-	587.00	0.50	100
Brasil	-	-	-	-	575.00	0.49	100
Argentina	-	-	-	4,197.00	-	0	0
Australia	-	-	-	3,650.00	-	0	0
Chile	-	-	535.00	-	-	0	0
Colombia	-	-	415.00	874.00	-	0	0
Francia	-	-	-	18.00	-	0	0
Holanda	-	-	-	10,400.00	-	0	0
Reino Unido	-	-	-	7,260.00	-	0	0
<b>Total general</b>	<b>8,760.00</b>	<b>22,210.00</b>	<b>38,525.00</b>	<b>115,411.00</b>	<b>118,548.00</b>	<b>100</b>	<b>2.72</b>

Fuente: SUNAT, Asociación Regional de Exportadores – AREX.

Las exportaciones peruanas de maíz morado durante el periodo 2008 – 2012, tuvieron como principal destino a EE.UU., el cual concentró el 92,12% del total de los envíos, cuya variación respecto al año anterior es de 22,68%, seguidamente podemos observar a Alemania que tan solo participa con el 4,21% en las importaciones de antocianina desde Perú, cabe indicar que los siguientes destinos solo muestran participaciones minoritarias.

**Cuadro N° 1.11** Mercados para la exportación de maíz morado, durante el periodo 2008 – 2010, expresados en kg.

MERCADOS	2008	2009	2010	2011	2012	% Part.	Variac. %
Estados Unidos	386,576.75	499,796.98	353,994.74	482,462.03	546,524.52	69.23	13.28
Ecuador	16,874.00	39,580.00	53,671.44	19,883.04	97,312.10	12.33	389.42
España	38,092.96	36,733.23	79,694.38	48,457.47	82,778.31	10.49	70.83
Italia	17,469.23	17,027.02	32,103.21	11,494.69	15,684.24	1.99	36.45
Japon	45,898.49	81,431.32	11,676.48	34,952.81	11,493.50	1.46	-67.12
Países Bajos	1,138.65	3,404.72	7,095.10	1,193.00	7,773.00	0.98	551.55
Venezuela	3,740.88	3,900.00	25,000.00	3.00	6,817.00	0.86	227133.33
Chile	2,166.57	3,437.69	3,420.76	6,596.90	5,318.00	0.67	-19.39
Alemania	644.53	302.40	960.00	375.47	4,950.00	0.63	1218.35
Costa Rica	3,223.57	1,084.21	14,586.29	4,980.09	3,544.95	0.45	-28.82
Colombia					3,297.41	0.42	100.00
Los Demás	12,973.77	4,327.38	8,398.51	13,697.45	3,934.57	0.50	-71.28
<b>Total</b>	<b>528,799.40</b>	<b>691,024.95</b>	<b>590,600.91</b>	<b>624,095.95</b>	<b>789,427.60</b>	<b>100.00</b>	<b>26.49</b>

Fuente: SUNAT, Asociación Regional de Exportadores – AREX.

Podemos observar que las exportaciones de maíz morado han ido incrementando periódicamente, mostrando como el principal país de destino a Estados Unidos, que tiene una participación de 69,23%, cuya variación respecto al año 2011 es 13,28%, seguidamente observamos a Ecuador, que participa en el total de las exportaciones con 12,33%, cuya variación es de 389,42%, porcentaje que refleja la alta demanda del producto gracias a su calidad y beneficios a la salud.

Sin embargo Japón, Chile y Costa Rica, reflejan una contracción en la demanda, al observar variaciones negativas para el año 2012 respecto al año anterior.

**Cuadro N° 1.12** Exportadores del sistema armonizado: 320300 Materias colorantes de origen vegetal o animal, en miles de US\$.

PAÍS	2008	2009	2010	2011	PART. %	VAR. %
Perú	30,368.00	32,654.00	91,025.00	126,020.00	12.12	38.45
Países Bajos	62,198.00	74,996.00	95,024.00	112,563.00	10.82	18.46
Alemania	67,194.00	65,149.00	93,286.00	109,419.00	10.52	17.29
España	67,766.00	73,780.00	77,519.00	104,047.00	10.01	34.22
Dinamarca	47,456.00	49,367.00	77,158.00	99,593.00	9.58	29.08
LOS DEMÁS	318,731.00	325,381.00	373,543.00	488,216.00	46.95	30.70
<b>MUNDO</b>	<b>593,713.00</b>	<b>621,327.00</b>	<b>807,555.00</b>	<b>1,039,858.00</b>	<b>100.00</b>	<b>28.77</b>

**Fuente:** TRADEMAP, Asociación Regional de Exportadores – ARES.

Como se puede observar en el ranking mundial Perú lidera las estadísticas de exportación registrando una participación de 12,12% para el año 2011, seguido por Países Bajos y Alemania. Se podría afirmar que Perú es el único proveedor de antocianina de maíz morado por lo que desde ya se debe tomar en cuenta que hay un gran potencial comercial para este producto.

## 2.5. DISEÑOS EXPERIMENTALES PARA CORRELACIÓN DE FACTORES

Cuando se hace referencia a los diseños experimentales para determinar correlación de factores que influyen en características de organismos o productos hay la necesidad de distinguir dos tipos de diseño:

- a) Diseño de experimentos y
- b) Diseño de tratamientos.

El diseño de tratamientos es la forma de combinar los niveles de dos o más factores, con la finalidad de estudiar sus efectos individuales y combinados sobre ciertas características del organismo en estudio o la variable respuesta. Los tratamientos diseñados pueden ser colocados en algún diseño

experimental, como el completamente al azar (DCA), bloques completos al azar (DBCA), cuadrado latino (DCL), etc. (*Tineo Alex*, 2000).

Dentro de los diseños de tratamientos se consideran a los factoriales, que según *Yates*, son arreglos en los cuales se incluyen las diferentes combinaciones posibles de los niveles de los factores en estudio. La información que se obtiene es el resultado del efecto independiente o combinado de los factores en estudio; el efecto de un factor se define como el cambio de respuesta producido por un cambio de nivel en dicho factor, manteniendo a un determinado nivel el otro factor o factores.

Los factores pueden ser de naturaleza cuantitativa o cualitativa, y sus combinaciones poseen las mismas características de los factores. En los factores de naturales cuantitativa sus niveles se diferencian por su magnitud numérica, mientras que en los factores de naturaleza cualitativa los niveles se diferencian por su aspecto o calidad. (*Tineo Alex*, 2000)

## 2.6. EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

El uso de diseños de superficie de respuesta es la alternativa más adecuada, en experimentos cuyo objetivo es establecer la relación entre los factores (2 a 6) y la variable dependiente, dentro de la región experimental. El término "**Metodología en Superficies de Respuesta**" (*Response Surface Metodology – RSM*) se refiere al paquete de diseños estadísticos e instrumentos de análisis que se emplean en las siguientes etapas:

- Diseño y recopilación de datos experimentales, los cuales se usan en la determinación de una ecuación general cuadrática que se empleará para predicciones.
- Aplicación de técnicas de regresión lineal múltiple para seleccionar la mejor ecuación que represente el comportamiento de los datos.
- Análisis de la superficie ajustada mediante gráficas de contorno y otras técnicas matemáticas y numéricas. (*Lawson, et al.*, 1992).

### 2.6.1. Experimentación con varios factores: Diseños factoriales

Los resultados de un experimento están influenciados por diversos factores; el efecto que uno de ellos tiene varía en función de los valores de los otros. Muchos experimentos se llevan a cabo para estudiar los efectos producidos por dos o más factores. Se ha demostrado que, en general, los diseños factoriales son los más eficientes para este tipo de experimentos, entendiéndose por diseño factorial, aquel en que se investigan todas las posibles combinaciones de los factores de cada ensayo o réplica del experimento.

A medida que el número de factores aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener una réplica completa se incrementa, sobrepasando los recursos de la mayoría de los experimentadores. Si el experimentador supone razonablemente que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos e interacciones principales puede obtenerse realizando sólo una fracción del experimento completo, desarrollándose lo que se conoce como **diseño factorial fraccional**.

Los diseños factoriales fraccionales se usan en los experimentos de diagnóstico y tamizado, que tienen por finalidad identificar aquellos factores que tienen efectos importantes y se desarrollan en las primeras fases de un proyecto, cuando muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes se investigan entonces con mayor detalle en experimentos posteriores como el diseño de superficie de respuesta (*Montgomery*, 1991).

### 2.6.2. Metodología de la Superficie de Respuesta (RSM)

La metodología de la superficie de respuesta (RSM ó MSR) es un conjunto de técnicas estadístico matemáticas cuyo objetivo es determinar las mejores condiciones en que opera un proceso para lograr un resultado óptimo, lo que a su vez contribuye a un mayor conocimiento de la naturaleza del sistema de operación de dicho proceso (*Giovanini*, 1983).

El llamado "proceso" (fenómeno o evento) se supone regido por leyes que gobiernan el mecanismo fundamental del sistema, de acuerdo a una relación causa-efecto. Estas leyes pueden representarse por medio de una relación matemática (modelo teórico) en la que el resultado, denominado **respuesta o**

**variable dependiente**, se expresa como una función de las condiciones de operación. Las condiciones de operación corresponden a las combinaciones de los niveles de los diferentes factores causales, conocidos como **variables**, algunos de los cuales pueden estar sujetos a control por parte del investigador. (Giovanini, 1983)

Un resumen de lo que señalan autores como **Box y Hunter** (1978), **Montgomery** (1976), **Cochran** (1976) acerca de la superficie de respuesta es el que se presenta a continuación.

La función que expresa la relación entre las variables independientes o factores con la respuesta, constituye la **superficie de respuesta** y se puede representar por:

$$y = f(x_1, x_2) + e \quad (01)$$

Donde: **e** representa el error aleatorio observado en la respuesta **y**. Si la respuesta esperada se denota por  $E(y) = n$ , entonces, la superficie representada por  $n = f(x_1, x_2)$ , se denomina **superficie de respuesta**. Se puede graficar la superficie de respuesta bidimensional, estableciendo los ejes  $x_1$  y  $x_2$  en el plano del papel, y el eje  $E(y)$  perpendicular al plano del papel. Luego se plotean los contornos de la constante de respuesta esperada, obteniéndose la superficie de respuesta.

En la mayoría de problemas de **MSR**, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en la MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre "**y**" y el conjunto de variables independientes. Por lo general se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta es descrita adecuadamente por una función lineal, la función de aproximación es el modelo de primer orden:

$$y = B_0 + B_1x_1 + B_2x_2 + \dots + B_kx_k + e \quad (02)$$

Cuando existe curvatura en el sistema debe usarse un polinomio de mayor grado, por ejemplo el modelo de segundo orden:

$$y = B_0 + B_1x_1 + \sum \sum B_{ij}x_i^2 + \sum \sum B_{ij}x_{ij} + e \quad (03)$$

El método de mínimos cuadrados sirve para estimar los parámetros del polinomio de aproximación. El análisis de la superficie de respuesta se hace luego en términos de la superficie ajustada, buscando secuencialmente los puntos en que se encuentre el óptimo o que maximicen la respuesta predicha. Este máximo se alcanza cuando las derivadas parciales de las variables son nulas.

$$dy/d(x_1) = dy/(x_2) = \dots = dy/(x_k) = 0 \quad (04)$$

El punto  $(x_1, 0)$ ;  $(x_2, 0)$ ;  $\dots$ ;  $(x_k, 0)$  se denomina **punto estacionario** y puede representar: (a) un punto de respuesta máxima, (b) un punto de respuesta mínima, o bien, (c) un punto de inflexión.

Una solución general para el punto estacionario puede obtenerse siguiendo la metodología de **Vuataz** (1979), y definir valores de  $x$  que optimicen el proceso en estudio. Para efectos de definir el número de ensayos a desarrollar, **Cochran** (1969) establece la combinación más adecuada de tratamientos (ensayos experimentales), de acuerdo al número de variables a estudiar en un proceso dado. Así por ejemplo, si se estudian 3 variables en un proceso, cada una de ellas en dos niveles (máximo y mínimo), el diseño experimental es un factorial de  $3 \times 2$  (ó  $2^3$ ) y el número de ensayo será de 8. Para el estudio estadístico se establece una matriz y se obtienen los coeficientes de una ecuación de primer orden. Se hace el análisis de variancia de los efectos simples de cada variable y de sus combinaciones. Si hay diferencias significativas, entonces se procede a ajustar el modelo a un diseño de segundo orden y se obtiene la ecuación correspondiente. Para un ensayo de 5 variables y 2 niveles, el diseño es de  $2^5$  y se requiere 32 ensayos experimentales, de cuyos resultados se establece la matriz correspondiente.

### 2.6.3. **Software STATGRAPHICS**

Con respecto al software se presentan algunos comentarios importantes:

- STATGRAPHICS es una potente herramienta de análisis de datos que combina una amplia gama de procedimientos analíticos con extraordinarios gráficos interactivos para proporcionar un entorno integrado de análisis que

puede ser aplicado en cada una de las fases de un proyecto, desde los protocolos de gestión Six Sigma hasta los procesos de Control de Calidad.

- Incluye funciones estadísticas avanzadas, capaces de proporcionar rigurosos análisis propios de los profesionales estadísticos más exigentes y experimentados, y al mismo tiempo ofrece un interface muy intuitivo, con funciones de asistencia exclusivas, de tal forma que proporciona la simplicidad suficiente para permitir a un analista inexperto realizar procedimientos complejos.
- La edición de 32 bits trabaja en cualquier versión de 32 o de 64 bits de Windows XP, Windows Vista, Windows 7 y Windows 8; la edición de 64 bits trabaja sólo en las versiones de 64 bits de Windows XP, Windows Vista, Windows 7 y Windows 8.
- Las dos ediciones contienen los mismos procedimientos y características; la única diferencia es que la de 32 bits sólo accederá a los primeros 2 GB de memoria RAM mientras que la de 64 bits no tiene esa limitación, por lo que puede analizar conjuntos de datos mayores.

**STATGRAPHICS** incluye procedimientos para:

- Estadística básica y Análisis exploratorio de datos
- Análisis de la varianza y Regresión
- Control estadístico de procesos (Análisis de la capacidad, Gráficos de control, Análisis de sistemas de medición)
- Diseño de experimentos
- Seis Sigma
- Análisis de la fiabilidad y Datos de vida
- Métodos multivariantes y no paramétricos
- Análisis de series temporales y predicción

La sección Diseño Experimental de **STATGRAPHICS** contiene un wizard que le ayuda al usuario a construir y analizar experimentos diseñados. Lo guiará a través de doce pasos importantes en la creación del diseño:

Paso 1: Defina las respuestas

Paso 2: Defina factores del experimento

Paso 3: Seleccione un diseño

Paso 4: Seleccione un modelo

Paso 5: Seleccione el número de iteraciones

Paso 6: Evalúe el diseño

Paso 7: Almacene el experimento

Paso 8: Analice los datos

Paso 9: Optimice respuestas

Paso 10: Almacene los resultados

Paso 11: Mejore su diseño

Paso 12: Extrapole

### **CAPÍTULO III**

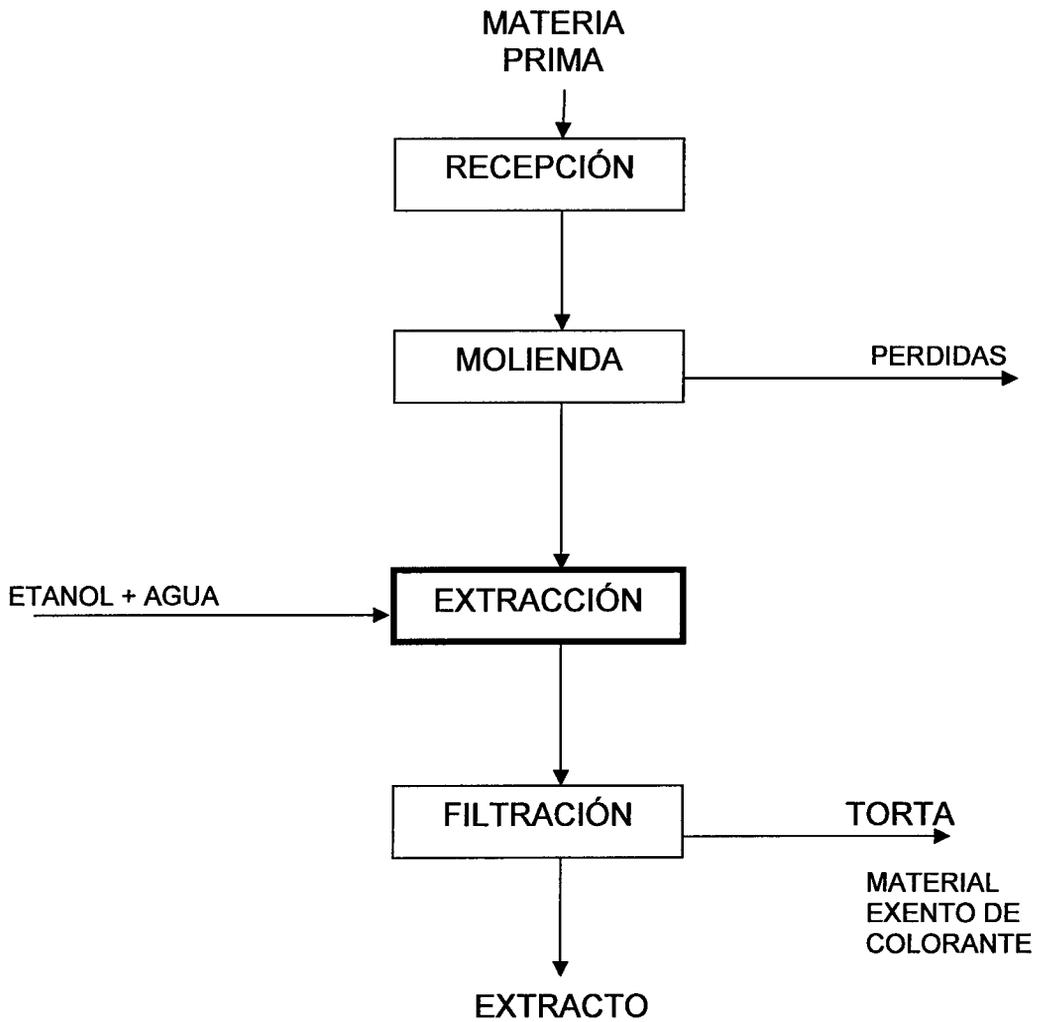
#### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

Se evalúa los parámetros publicados con respecto a la operación de extracción de antocianinas a partir del maíz morado para su análisis y evaluación a través del modelo de superficie de respuesta.

##### **3.1. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO**

En las fuentes bibliográficas no se encuentran descripciones de proceso con los parámetros definidos para la producción industrial del extracto antociánico a partir del maíz morado, sin embargo, como se mencionó en el acápite anterior, existen diferentes métodos de extracción del pigmento antociánico de las diferentes fuentes de materia prima, se tiene conocimiento que cada materia prima requiere procesos especiales aún cuando no varían en el proceso en sí.

Por tomar como referencia el proceso base para el presente trabajo se adecuará a una combinación de los métodos de extracción con solución etanólica, propuestos por CHIRIBOGA Y FRANCIS (1970) Y MARKAKIS (1976) porque consideran parámetros como la temperatura de extracción, concentración y secado cuya optimización permitiría obtener un producto sin degradaciones estructurales.



**Figura 3.1** Propuesta del diagrama de extracción de antocianinas a partir del maíz morado.

### 3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

La metodología estadística para determinar superficies de respuesta implica determinar en primer lugar las condiciones extremas de trabajo, por lo que, de acuerdo al diseño propuesto, se fijaron las condiciones máximas y mínimas de las variables que se consideran las más importantes para el desarrollo del proceso de extracción. Las variables consideradas son las siguientes:

- Temperatura de extracción;
- Tiempo de extracción;
- pH,
- Relación solvente soluto

#### 3.2.1. Diseño experimental

De acuerdo a referencias bibliográficas se consideraron los siguientes valores mínimos y máximos de las variables que influyen en la extracción de antocianinas a partir del maíz morado:

a) Temperatura de extracción	: 60 y 70	°C.
b) Tiempo de extracción	: 20 y 30	min.
c) pH de solución	: 2,50 y 3,00	
d) Relación soluto: solvente	: 1/7 y 1/9	
e) Contenido de antocianina	: 0.04 y 0.06	Xp

Para el desarrollo del Método de Superficie de Respuesta, el número total de ensayos experimentales bajo estas condiciones está dado por las combinaciones posibles de las modificaciones de 2 variables independientes a la vez para cada ensayo. De esta forma se obtiene un total de  $2^k$  ensayos, siendo k el número de variables independientes., lo que constituye una muestra representativa, estadísticamente significativa, del total de ensayos posibles de efectuar.

El programa computacional STATGRAPHICS seleccionó la primera secuencia de ensayos experimentales que se debe desarrollar en la práctica, como Diseño de Diagnóstico, eligiéndose un diseño factorial simple de  $2^k$ , lo que determina 32 ensayos.

Luego del diseño de diagnóstico y de acuerdo a los resultados del mismo, se desarrolla un diseño de segundo orden, que consiste en una serie de ensayos considerando solamente aquellas variables que afectan significativamente al proceso.

El diseño elegido es, en nuestro caso, el diseño de factorial simple de  $2^k$  con 2 puntos centrales, siendo  $k$  = el número de variables significativas.

### 3.2.2. Diseño de la superficie de respuesta

Los datos y los resultados de los ensayos significativos fueron ajustados, utilizando el método de mínimos cuadrados, a ecuaciones de primer y segundo orden. Luego se efectuó un análisis de varianza para determinar cual de las ecuaciones se ajusta mejor a fin de establecer la ecuación canónica. Esta ecuación canónica permitirá predecir los resultados si se trabaja a diferentes condiciones, posibilitando así desarrollar ajustes para optimizar los resultados en función del contenido de antocianina durante la extracción.

En la siguiente Figura N° 3.2 se presenta el diagrama de flujo del procedimiento de optimización aplicado al proceso de extracción de las antocianinas utilizando la metodología de la superficie de respuesta

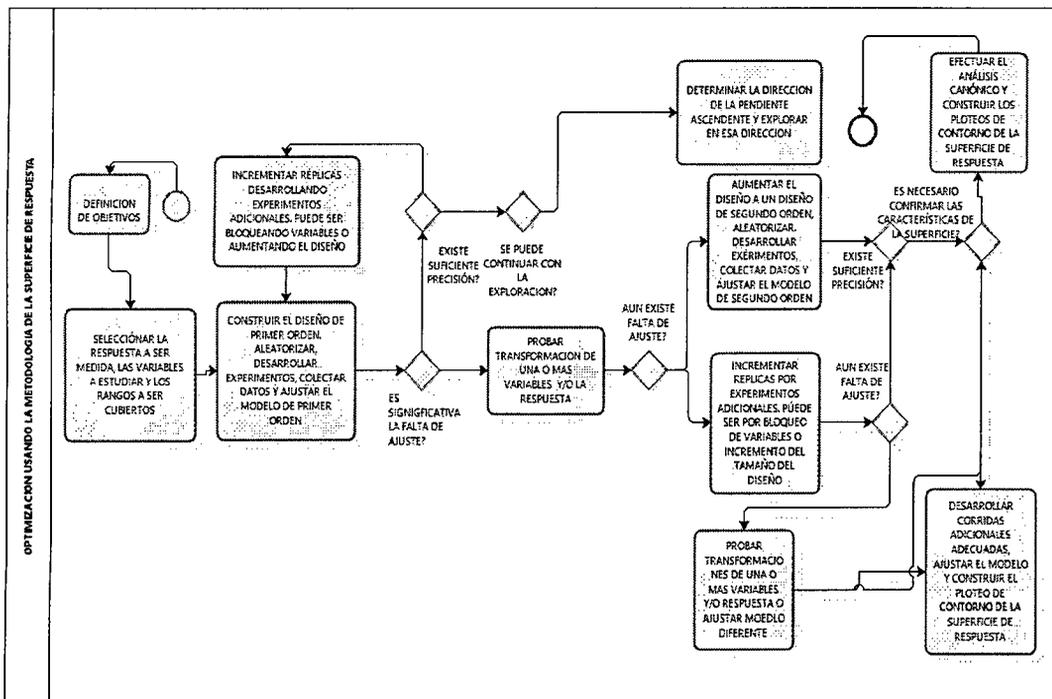


Figura 3.2 Diagrama de flujo del procedimiento de optimización utilizando la metodología de la superficie de respuesta

### **3.2.3. Validación experimental**

Con la finalidad de proceder con la contrastación de los resultados obtenidos con el método de superficie de respuesta se ha procedido con el ensayo experimental para fines de la validación, para lo cual se realizó lo siguiente:

#### **3.2.3.1. Extracción:**

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 la coronta de maíz morado molida con 200 ml de etanol al 80% en volumen, acidificando con HCl (pH = 2), extrayendo a la temperatura de ebullición durante 7 a 8 minutos y luego se filtró.

#### **3.2.3.2. Espectrofotometría:**

Se refiere a la utilización de la luz para determinar la cantidad de analito presente en muestras problemáticas.

Es un método de análisis químico basado en la cantidad de radiación que la muestra absorbe, la que está en función de la concentración del analito, que absorbe una parte de la luz incidente y la otra lo transmite, además se producen otros fenómenos como la dispersión y la reflexión. Cuando una molécula absorbe luz pasa a un estado excitado de mayor energía. (íd. 36)

El procedimiento a realizar es el siguiente:

- Una vez que se tiene la muestra, esta es colocada en la cubeta del equipo de espectrofotometría.
- Se limpia la parte externa de la cubeta de preferencia con un material suave como el papel tissue.
- Se realiza la calibración del equipo usando para ello agua destilada añadida a otra celda de espectrometría, es decir al realizar la lectura de la absorbancia del agua tiene que ser igual a cero.
- Pasar a colocar la celda que contiene la muestra a analizar en el equipo para su lectura de absorbancia correspondiente.
- Retirar la celda del equipo y pasar a limpiarla o lavarla por lo menos tres veces.
- Secar la celda para proceder a la siguiente lectura de la absorbancia de otra muestra a analizar.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

En éste capítulo se presentan fundamentalmente los resultados obtenidos en la aplicación del software STATGRAPHICS.

#### **4.1. RESULTADOS DE LA APLICACIÓN DEL SOFTWARE**

De la aplicación de la metodología de Superficie de Respuesta se tienen la generación de un conjunto de cuadros informativos de resultados y las gráficas correspondientes que se exponen a continuación.

Cabe destacar que la alimentación de los factores (variables o parámetros) debe de tener una secuencia y un antecedente experimental tradicional para poder identificarlos y relacionarlos con diseño de respuesta óptimo que se quiere lograr.

En el presente trabajo no hemos querido desvirtuar la información generada por el Programa STATGRAPHICS PLUS® PARA WINDOWS por lo que hemos incluido los resultados tal y como los generó el mencionado programa.

**Cuadro N° 4.1.** Definición de los factores que afectan el diseño

Factores	Bajo	Alto	Unidades	Continuidad
Temperatura	60,0	70,0	°C	Si
Tiempo	20,0	30,0	minutos	Si
pH	2,5	3,0		Si
Relación de solvente	0,1111	0,1428		Si
Contenido			Xp	

(Elaboración STATGRAPHICS PLUS)

Se ha creado un cuadro pequeño compuesto de los factores de diseño, el cual estudia los efectos de los 4 factores en 18 corridas, el diseño es para que sea corrido en un solo bloque; el orden de los experimentos han sido totalmente puestos al azar, esto proveerá protección contra los efectos de variables existentes.

**Cuadro N° 4.2** Resultados de las corridas experimentales

Ensayo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	pH	solvente	contenido
1	65.0	25.0	2.75	0.153606	
2	65.0	33.409	2.75	0.12695	
3	60.0	30.0	3.0	0.1428	
4	70.0	20.0	3.0	0.1428	
5	65.0	25.0	2.75	0.12695	
6	65.0	25.0	2.75	0.12695	
7	65.0	25.0	3.17045	0.12695	
8	70.0	30.0	3.0	0.1111	
9	65.0	25.0	2.32955	0.12695	
10	60.0	20.0	3.0	0.1111	
11	65.0	25.0	2.75	0.100294	
12	70.0	20.0	2.5	0.1428	
13	56.591	25.0	2.75	0.12695	
14	60.0	30.0	2.5	0.1428	
15	60.0	20.0	2.5	0.1111	
16	65.0	16.591	2.75	0.12695	

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*) POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

17	73.409	25.0	2.75	0.12695	
18	70.0	30.0	2.5	0.1111	

((Elaboración STATGRAPHICS PLUS))

El cuadro N° 3.2 se muestra una hoja conteniendo las corridas experimentales para ser realizadas en el orden e indicando los resultados en la hoja de cálculo seleccionando luego el diseño experimental de análisis.

**Cuadro N° 4.3 Matriz de correlación de datos**

	A	B	C	D	AA	AB	AC	AD	BB
A	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.7654	0.0000
C	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	-0.7654	0.0000	0.0000	0.0000
AA	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732
AB	0.0000	0.0000	0.0000	-0.7654	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
AD	0.0000	-0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
BB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BD	-0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732
CD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
DD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	0.0000	0.0000	-0.1732

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*) POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

	BC	BD	CC	CD	DD
A	0.0000	-0.7654	0.0000	0.0000	0.0000
B	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AA	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	-0.1732
AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
AD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BB	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	-0.1732
BC	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
BD	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
CC	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	-0.1732
CD	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
DD	0.0000	0.0000	-0.1732	0.0000	1.0000

(Fuente STATGRAFICS PLUS)

En el cuadro N° 4.3 se muestra la matriz de correlación entre las columnas de la matriz de diseño, un diseño octágono perfecto mostrará una matriz diagonal con una pulgada en la diagonal y cero pulgadas fuera de la diagonal cualquier término de no cero fuera de la diagonal implica que los estimados de los efectos correspondientes a la fila y columna serán relacionados estrechamente, en este caso hay nueve pares de columnas con correlaciones de no cero, si uno o mas de los pares es mayor o igual que 0,5 podríamos tener algo de dificultad en separar los efectos de cada una, cuando se analizan los datos se debería considerar añadiendo corridas adicionales al diseño para reducir las correlaciones.

#### **4.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES PRIMARIOS**

A continuación se presentan los resultados experimentales luego de la generación aleatoria de ensayos por el programa StatGraphics Plus.

**Cuadro N° 4.4** Resultados primarios

	Temperatura	Tiempo	pH	Relación	Contenido
1	65	25	2.75	0.153606	0.045
1	65	33.409	2.75	0.12695	0.06
1	60	30	3	0.1428	0.055
1	70	20	3	0.1428	0.04
1	65	25	2.75	0.12695	0.05
1	65	25	2.75	0.12695	0.045
1	65	25	3.17045	0.12695	0.057
1	70	30	3	0.1111	0.058
1	65	25	2.32955	0.12695	0.048
1	60	20	3	0.1111	0.04
1	65	25	2.75	0.100294	0.041
1	70	20	2.5	0.1428	0.046
1	56.591	25	2.75	0.12695	0.047
1	60	30	2.5	0.1428	0.05
1	60	20	2.5	0.1111	0.046
1	65	16.591	2.75	0.12695	0.04
1	73.409	25	2.75	0.12695	0.058
1	70	30	2.5	0.1111	0.048

(Fuente STATGRAFICS PLUS)

Estos primeros resultados muestran la correlación de datos que podría tener la respuesta sin la aplicación de la ecuación cuadrática ni los márgenes de error que del tratamiento de cada uno de los parámetros.

**4.3. RESULTADOS GENERADOS POR EL PROGRAMA****Cuadro N° 4.5 Efectos estimados para el contenido**

<b>PROMEDIO</b>	= 0.0486027	+/- 0.00241791
A: Temperatura	= 0.00654061	+/- 0.00318736
B: Tiempo	= 0.011892	+/- 0.00318736
C: pH	= 0.00265598	+/- 0.00205137
D: solvente	= 0.00237845	+/- 0.00318742
AA	= 0.00209027	+/- 0.00221048
AB	= 0.00262845	+/- 0.00416454
AC	= 0.00125	+/- 0.00268025
AD	= 0.00214202	+/- 0.00416449
BB	= 0.000322523	+/- 0.00221048
BC	= 0.00675	+/- 0.00268025
BD	= 0.00629061	+/- 0.00416449
CC	= 0.00209027	+/- 0.00221048
CD	= -0.00125	+/- 0.00268025
DD	= -0.00462739	+/- 0.00221055

(Errores estandar en base al error total con 3 d.f.)

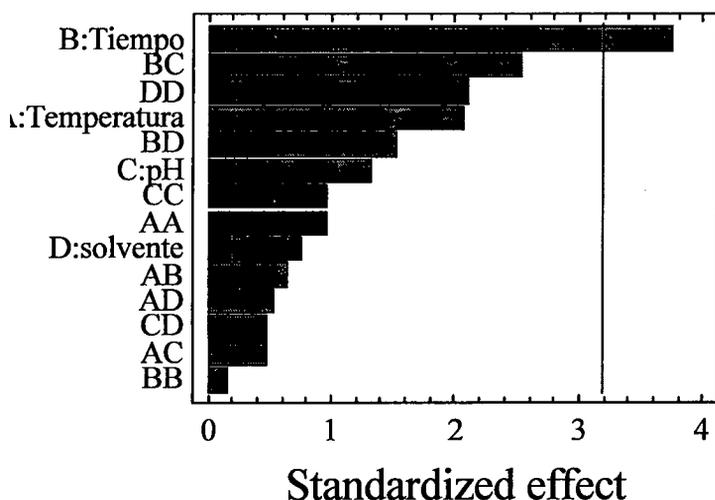
(Fuente STATGRAPHICS PLUS)

Esta tabla muestra cada uno de los efectos estimados y las interacciones, además el error estándar de cada uno de los efectos el cual mide sus errores de muestra para trazar los estimados en las acciones que disminuyen el orden de importancia.

Con estos datos seleccionando, aplicando la opción de gráficos (ANOVA) se obtiene los siguientes resultados.

Figura N° 4.1 Carta de parapeto para contenido estandarizado

### Standardized Pareto Chart for contenido



(FUENTE: SATATGRAPHICS PLUS)

El gráfico de parapeto puede probar el significado estadístico de los efectos insignificantes y los excluyentes.

En la siguiente tabla ANOVA se muestra las particiones de variabilidad en contenido sobre piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces el análisis estadístico de varianza de cada efecto por comparación con el valor del cuadrado promedio muestra nuevamente la estimación de un error experimental. En este caso, 1 efecto tiene P – valores menores que 0,05, indicando que ellos son significativamente diferentes de cero en el 95% de nivel confidencial.

**Cuadro N° 4.6** Análisis de varianza para contenido (anova)

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F-Razón
A: Temperatura	0.0000605	1	0.0000605	4.21
B: Tiempo	0.0002	1	0.0002	13.92
C: pH	0.0000240847	1	0.0000240847	1.68
D: solvente	0.000008	1	0.000008	0.56
AA	0.0000128474	1	0.0000128474	0.89
AB	0.0000057233	1	0.0000057233	0.40
AC	0.000003125	1	0.000003125	0.22
AD	0.00000380105	1	0.00000380105	0.26
BB	3.05865E-7	1	3.05865E-7	0.02
BC	0.000091125	1	0.000091125	6.34
BD	0.0000327825	1	0.0000327825	2.28
CC	0.0000128474	1	0.0000128474	0.89
CD	0.000003125	1	0.000003125	0.22
DD	0.0000629586	1	0.0000629586	4.38
Total error	0.0000431025	3	0.0000143675	
<b>Total (corr.)</b>	<b>0.000744444</b>	<b>17</b>		

(FUENTE: SATATGRAPHICS PLUS)

La estadística R- cuadrado indica que el modelo es conveniente aplicado para 94,2101% de la variabilidad en contenido. Los ajustes de la estadística R – Cuadrado, la cual es mayor conforme se comparen modelos con diferentes números de variables independientes, es 67,1906 %. El error estándar de la estimación, que muestra la desviación estándar de los residuales, es 0,00379045. La media del error absoluto (MAE) de 0,00126691 es el valor promedio de los residuales. El análisis estadístico de Durbin- Watson (DW) de los residuales determina si estos son algo significativo, correlación basada en el orden de ocurrencia de cada uno de ellos en la base de datos. Si el valor Dw es mayor que 1,4, entonces no es probable una serie de auto correlación en el residual.

**Cuadro N° 4.7** Coeficiente de regresión por contenido

CONSTANTE	= 0.653757
A: Temperatura	= -0.00918552
B: Tiempo	= -0.0150137
C: pH	= -0.166636
D: solvente	= 0.976498
AA	= 0.0000418055
AB	= 0.000052569
AC	= 0.0005
AD	= 0.0135143
BB	= 0.00000645046
BC	= 0.0027
BD	= 0.0396884
CC	= 0.0167222
CD	= -0.157729
DD	= -9.20975

(FUENTE: STATGRAPHICS PLUS)

El cuadro N° 3.6 muestra la ecuación de regresión que ajusta los datos. La ecuación del modelo reajustado es:

$$C = 0,653757 - 0,00918552T - 0,0150137t - 0,166636pH + 0,976498S + 0,0000418055T^2 + 0,000052569Tt + 0,0005TpH + 0,0135143TS + 0,00000645046t^2 + 0,0027tpH + 0,0396884tS + 0,0167222pH^2 - 0,157729pHS - 9,20975S^2$$

Donde: C : Contenido de antocianina (Xp)  
 T : Temperatura  
 t : Tiempo  
 S : Relación soluto solvente

Cuando los valores de las variables son especificadas en sus unidades originales, STATGRAPHICS evalúa estas funciones, seleccionando predicciones de la lista

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*) POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

de opciones tabuladas. El ploteo de las funciones responde al ploteo de las opciones gráficas.

**Cuadro N° 4.8a Matriz de correlación para efectos estimados**

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1) avarage	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.6224	0.0000	0.0000
(2)A: Temperatura	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(3)B: Tiempo	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)C: pH	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)D: solvente	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.7654	0.0000
(6)AA	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(7)AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	1.0000	0.0000
(8)AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
(9)AD	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(10)BB	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000
(11)BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(12)BD	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(13)CC	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000
(14)CD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(15)DD	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000

(FUENTE: STATGRAPHICS PLUS)

**Cuadro N° 4.8b** Matriz de correlacion para efectos estimados (continuación)

	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1) average	0.0000	-0.6224	0.0000	0.0000	-0.6224	0.0000	-0.6224
(2)A: Temperatura	0.0000	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000
(3)B: Tiempo	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)C: pH	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)D: solvente	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(6)AA	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.2649
(7)AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(8)AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(9)AD	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(10)BB	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.2649
(11)BC	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(12)BD	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(13)CC	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.2649
(14)CD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
(15)DD	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	1.0000

(FUENTE: STATGRAPHICS PLUS)

Los cuadros 3.7. a y b muestran la matriz de correlación y la extensión de los efectos en un diseño octagonal perfecto mostrará una matriz diagonal con una pulgada en la diagonal y o fuera de la diagonal cualquier termino no cero fuera de la diagonal implica que los estimados de los efectos correspondientes a la fila y las columnas serán entrelazados en este caso hay nuevos pares de efectos con no cero correlaciones desde una o mas de los pares es mas o igual a 0.5 tu puedes tener alguna dificultad separando los efectos de cada uno cuando se analiza la información ustedes deberían considerar añadiendo corridas adicionales al diseño para reducir las correlaciones.

**Cuadro N° 4.9 Resultados estimados para contenido**

<b>Fila</b>	<b>Valores Observados</b>	<b>Valor Ajustado</b>	<b>Inferior a 95.0% CL para medio</b>	<b>Superior a 95.0% CL para medio</b>
1	0.045	0.0440588	0.0324121	0.0557054
2	0.06	0.0590588	0.0474121	0.0707055
3	0.055	0.0566185	0.045084	0.068153
4	0.04	0.0416185	0.030084	0.053153
5	0.05	0.0486027	0.0409078	0.0562976
6	0.045	0.0486027	0.0409078	0.0562976
7	0.057	0.0537922	0.0441472	0.0634372
8	0.058	0.0596185	0.048084	0.071153
9	0.048	0.0493254	0.0396804	0.0589704
10	0.04	0.0416185	0.030084	0.053153
11	0.041	0.0400588	0.0284121	0.0517054
12	0.046	0.0457125	0.034178	0.0572471
13	0.047	0.0460588	0.0344121	0.0577055
14	0.05	0.0497125	0.038178	0.0612471
15	0.046	0.0457125	0.034178	0.0572471
16	0.04	0.0390588	0.0274121	0.0507055
17	0.058	0.0570588	0.0454121	0.0687055
18	0.048	0.0477125	0.036178	0.0592471

FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El cuadro N° 3.8 contiene la información acerca de los valores del contenido generados usando el modelo adecuado, la tabla incluye:

- 1) El valor observado del contenido (si cualquiera)
- 2) El valor predicho de contenido usando el modelo adecuado
- 3) 95% límite de seguridad para la respuesta.

Cada artículo corresponde a los valores de los factores experimentales en una fila específica del archivo de información, para generar predicciones para combinaciones adicionales de los factores añadiendo filas adicionales a la base de cada archivo, en cada nueva fila entre valores para los factores experimentales pero deje la célula para la respuesta vacía, cuando regreses a este panel las predicciones serán adheridas a las tablas para las nuevas filas pero el modelo no será afectado.

**Cuadro N° 4.10** Senda de precipitación de ascenso o descenso para el contenido.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	pH	Solvente	Contenido predicho (%)
65,00	25,00	2,75	0,12695	0,0486027
66,00	26,7045	2,77667	0,128275	0,0519087
67,00	28,2686	2,81267	0,129810	0,0559512
68,00	29,7632	2,85459	0,131412	0,0608458
69,00	31,2195	2,90066	0,133035	0,0666545
70,00	32,6537	2,94984	0,134660	0,0734190

FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El cuadro N° 4.10 muestra la senda del ascenso o descenso más empinado para el contenido. Esta es la senda del centro de la corriente experimental, región, a lo largo de la cual la respuesta estimada cambia más rápidamente para un cambio pequeño de los factores.

**Cuadro N° 4.11** Respuesta optimizada

META : MÁXIMO CONTENIDO

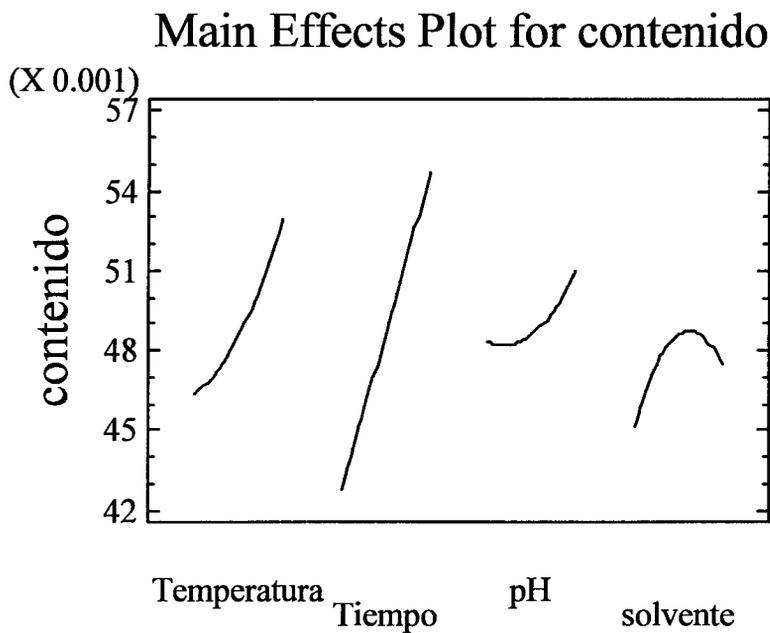
VALOR ÓPTIMO : 0,093183

Factor	Bajo	Alto	Optimo
Temperatura	56,591	73,409	73,3529
Tiempo	16,591	33,409	33,409
pH	2,32955	3,17045	3,17045
Solvente	0,100294	0,153606	0,148957

FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El cuadro 4.11 muestra la combinación de niveles de factores los cuales maximizan el contenido de antocianinas encima de la región indicada.

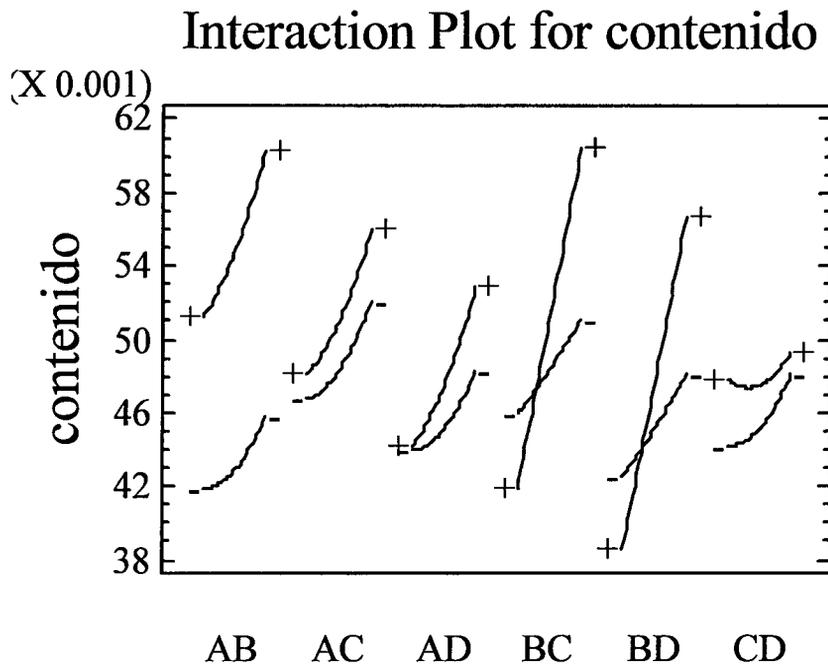
**Grafico N° 4.1** Efectos medios trazados para contenido de antocianinas.



FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.1 muestra el comportamiento de cada una de las variables frente al contenido de antocianinas extraído. Como se visualiza las variables tienen tendencias diferentes hacia la linealidad.

Gráfico N° 4.2 Interaccion de factores para contenido de antocianinas.

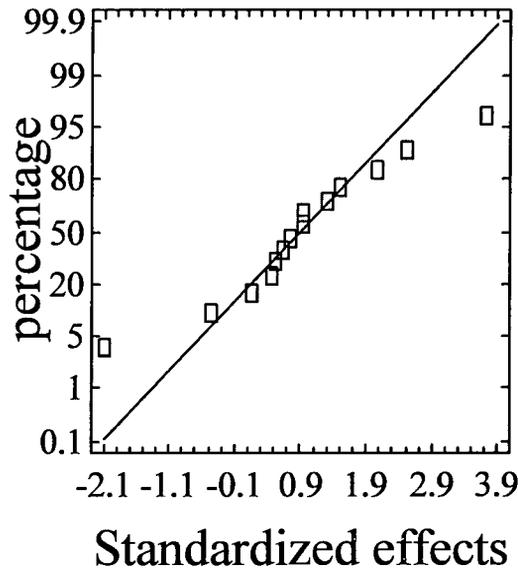


FUENTE; STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.2 muestra el comportamiento de la interacción entre las variables, por ejemplo la línea AB muestra el comportamiento de la interacción Temperatura – Tiempo respecto al contenido de antocianinas. Todas las correlaciones tienden a la linealidad.

Gráfico N° 4.3 Probabilidad normal trazada para contenido de antocianinas.

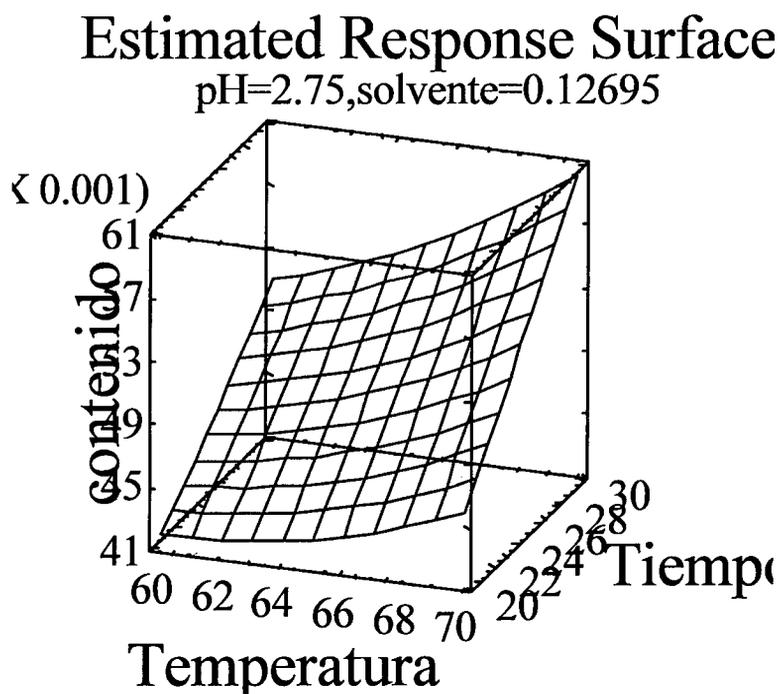
### Normal Probability Plot for content



FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.3 muestra la correlación de los efectos estandarizados respecto al porcentaje, como se observa la desviación es mínima, correspondiendo a un comportamiento lineal lo que indica que se ha seleccionado adecuadamente la correlación de datos y que el proceso de optimización es el correcto.

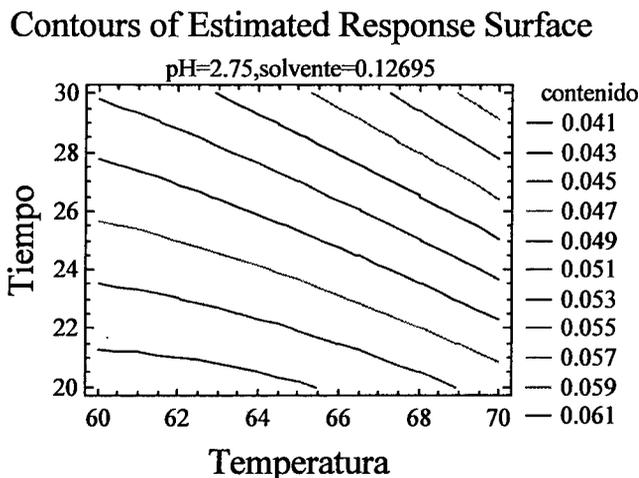
Gráfico N° 4.4 Superficie de respuesta estimada



FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.4 muestra la superficie de respuesta generada a raíz del tratamiento de los datos y a la corrección de linealidad en su comportamiento respecto al contenido, como se observa, luego del análisis y la correlación de los datos, el programa a fijado el pH en 2,75, y la relación soluto - solvente en 0,12695, esto indica que estas son las que tienen menor variabilidad en la extracción. La superficie muestra un domo perfecto en el que no se encuentran desviaciones generadas por un desorden del comportamiento en algunas de las variables.

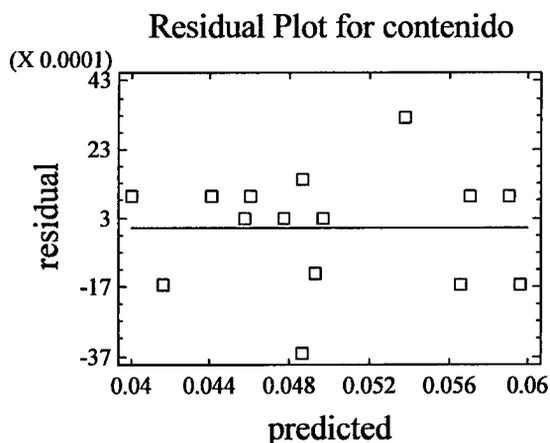
Gráfico N° 4.5 Contornos de la superficie de respuesta estimada



FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.5 muestra el comportamiento de cada variable en función de diferentes categorías para el contenido de antocianinas extraídas. Fueron estos contornos los que permitieron ubicar el resultado. Esta gráfica puede ser usada para medir y controlar el efecto de la variación de cada parámetro respecto al contenido.

Gráfico N° 4.6 Trazo de los valores residuales para el contenido de antocianinas.



FUENTE: STATGRAPHICS PLUS

El gráfico N° 4.6 muestra la dispersión de datos en la predicción de la superficie, quiere decir aquellos que se mantienen fuera de la linealidad.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y VALIDACION EXPERIMENTAL**

En éste capítulo se presenta la discusión de los distintos resultados expuestos y posteriormente se contrastan con los resultados experimentales para fines de validación.

#### **5.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

En primer lugar, la utilización de la metodología de Superficie de Respuesta es una innovación en el campo de optimización de variables en los procesos productivos y de transformación de la materia; logrando resultados muy convincentes y disminuyendo, marcadamente, la ejecución de muchos ensayos experimentales a los que llevaba la metodología tradicional.

La aplicación e interpretación de los resultados llevará, al investigador, a lograr en menor tiempo trabajos más realizados y muy veraces.

En lo que respecta a la optimización de variables en la producción de antocianinas del maíz morado, específicamente, podemos afirmar que se han

obtenido resultados dentro de los márgenes previsibles en los factores seleccionados, tal como se muestra en los cuadros anteriores.

La superficie de respuesta muestra una tendencia a variar la temperatura y el tiempo (dentro de los márgenes predeterminados) y mantener fijos el pH en 2,75 y la relación soluto solvente en 0,12695 (1/8). Como lo predicen algunos de los métodos mencionados en la bibliografía.

## 5.2. VALIDACIÓN EXPERIMENTAL

En función de los datos generados por el proceso de optimización se adecuó la validación experimental para realizar el proceso de extracción de antocianinas a partir del maíz morado, utilizando el método espectrofotométrico para la determinación de antocianinas.

### ***Extracción de antocianinas a partir del maíz morado:***

Se ha sometido a extracción  $\frac{1}{2}$  kg de coronta de maíz morado, cuya humedad inicial es 8,8 %, luego se ha realizado el proceso de selección, molienda a malla 100, y utilizando 1.5 L de solvente de extracción, consistente en agua con alcohol al 80% vol/vol, y acidificado con HCl a un pH de 3.0, se ha sometido a extracción a la temperatura de 70 °C, bajo una agitación permanente, por un tiempo de extracción total de 50 minutos. con por lo menos 30 minutos de extracción a la temperatura indicada, luego se ha sometido a filtración.

Luego se han tomado dos muestras para el análisis del contenido de antocianinas a través del método espectrofotométrico, una muestra es la coronta de maíz morado, y otra muestra es el extracto líquido obtenido.

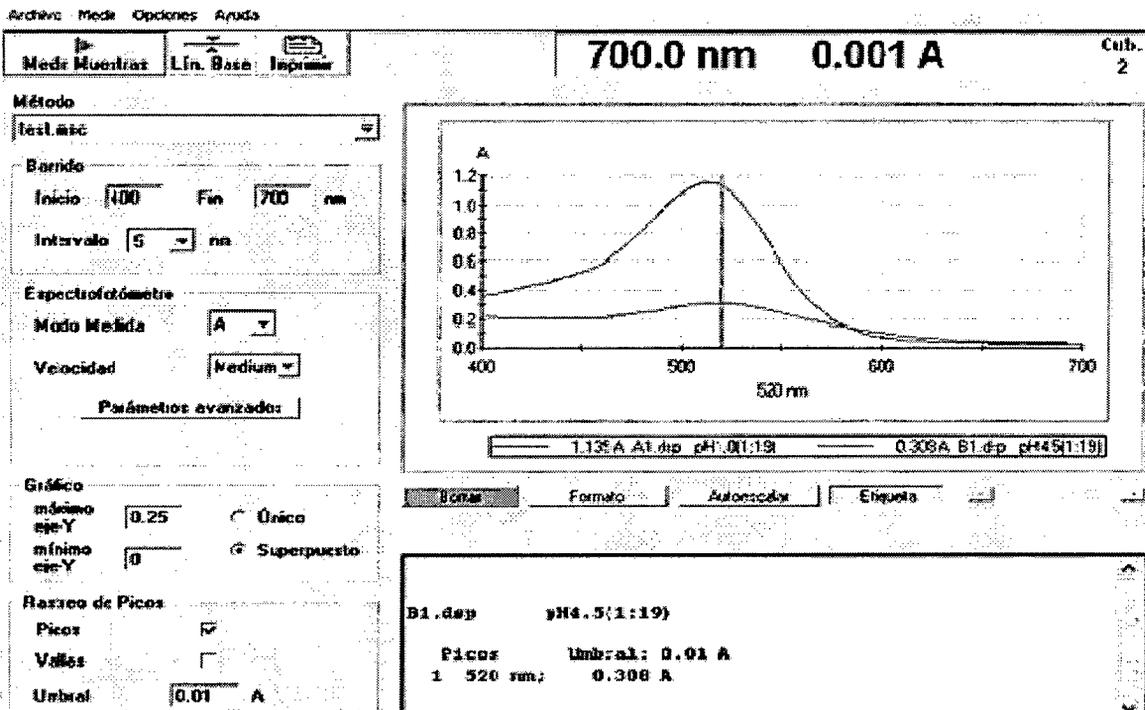
### ***Análisis espectrofotométrico del contenido de antocianinas:***

La extracción de antocianina se realizó siguiendo la técnica estandarizada de extracción etanólica de la muestra; para lo cual se ha utilizado 5 g (humedad inicial de 8,84%) de la coronta de maíz morado molida con 200 ml de etanol al 80% en volumen, acidificando con HCl (pH =3.2), extrayendo a la temperatura de ebullición (73.4°C) durante 33 minutos y luego se filtró. Los filtrados fueron 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:

### 5.2.1. Resultados de las lecturas en el espectrofotómetro:

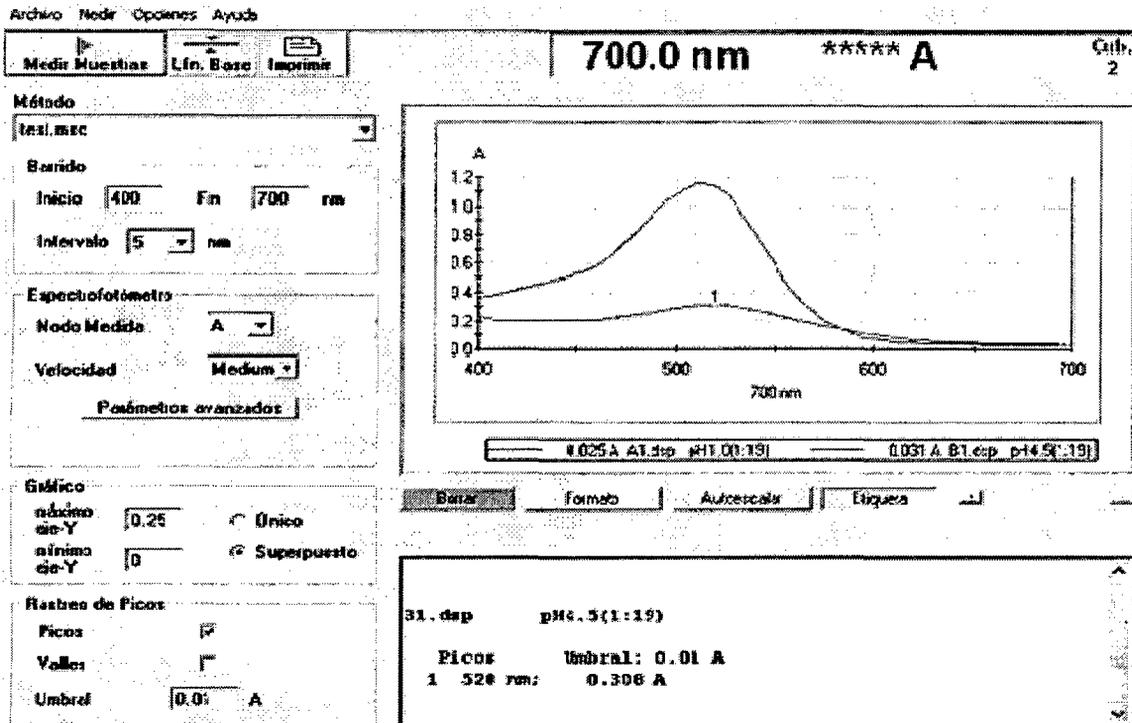
Figura N° 5.1. Lectura de la Absorbancia proporción 1:19 del extracto (520 nm)



A (520 nm y pH=1,0) = 1.135;

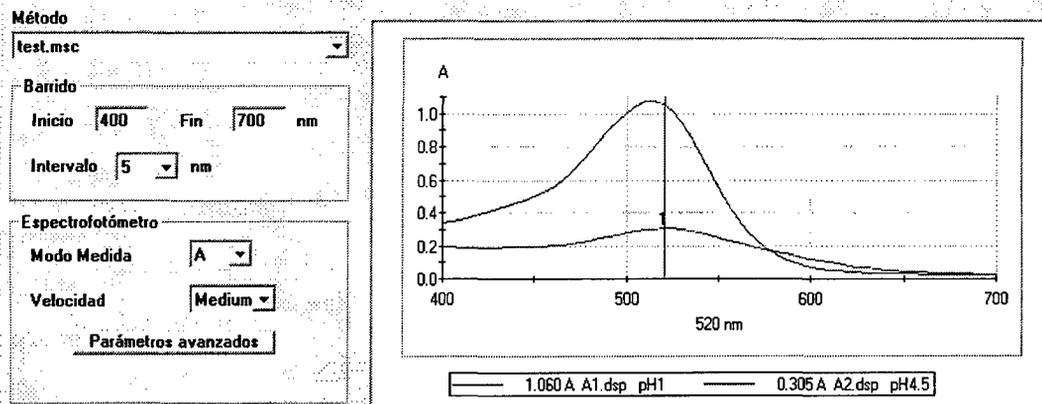
A (520 nm y pH=4,5) = 0,308

Figura N° 5.2. Lectura de la Absorbancia proporción 1:19 del extracto (700 nm)



$A(700 \text{ nm y pH}=1,0) = 0,025;$        $A(700 \text{ nm y pH}=4,5) = 0,031$

Figura N° 5.3 Absorbancia en el análisis de muestras de coronta de maíz morada. (Proporción 1:24)



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

### 5.2.2. Cálculo del contenido de antocianina.

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 siguientes ecuaciones:

**A). Para el extracto:**

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

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

Donde:

$$FD = 20$$

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

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

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

$$Am1 = (0,833)(449,2)(20)(1000)/(26900)(1) = 278.2 \text{ mg/L}$$

Lo cual se interpreta como un contenido de 278.2 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.

Como el análisis se ha realizado en un extracto de 500 ml, entonces en los 500 ml existe  $(278.2 \text{ mg}/2) = 139.10 \text{ mg}$ . Pero como los 500 ml provienen de una muestra húmeda de 5 g, debe entenderse que los 139.10 mg se encuentran en los 5 g de muestra húmeda, vale decir que, la muestra húmeda contiene:  $139.1 \text{ mg}/5 \text{ g} = 27.82 \text{ mg}$  de antocianina por cada g de muestra húmeda (ó  $2782 \text{ mg}/100 \text{ g}$  de muestra húmeda = 3,48 % en peso, pero en base húmeda).

Sin embargo, para fines de comparación estamos considerando la expresión final en base seca, vale decir que, 5 g de muestra al 8,84 % de humedad inicial contendría 4,558 g de materia o matriz seca; por lo tanto:

Los 139.1 mg de antocianinas monomérica existen en 4,558 g de muestra seca de coronta de maíz analizado; luego, la concentración con respecto a la materia o matriz seca es  $30.52 \text{ mg/g}$  (bs),  $3052 \text{ mg}/100 \text{ g}$  (bs), ó simplemente un contenido del 3.052 % en peso.

Resultado final:

$$Am1 = 278.2 \text{ mg/L}$$

Corregido por la dilución y la humedad:

$A_{m1} = 30.52 \text{ mg/g}$  (Base Seca)

Contenido = 3.052 % en peso.

**B). Para la muestra de coronta de maíz morado.**

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

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

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

Donde:

$$FD = 25$$

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

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

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

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

Corregido por la dilución y la humedad:

$$A_m = 34.67 \text{ mg/g}$$
 (Base Seca)

Contenido = 3.467 % en peso.

$$\text{Calculo de la eficiencia: } A_{m1}/A_m = 3.052/3.467 = 0.88$$

**Eficiencia de la extracción = 0.88.**

**5.3. VALIDACIÓN DE LA HIPÓTESIS:**

El método de Superficie de Respuesta, luego del tratamiento estadístico y de la Validación experimental, optimizó los parámetros de extracción de Antocianinas del Maiz Morado, demostrando la concurrencia con los métodos aplicados por otros experimentos que necesariamente necesitaban de la optimización individual de cada parámetro y luego hacer las combinaciones pertinentes que obligan a un mayor número de experimentos.

## CONCLUSIONES

1. De los resultados del análisis de superficie de respuesta para optimización de parámetros en la producción de antocianinas del maíz morado podemos concluir que los rangos de estos son los siguientes:

Respuesta de optimización: Para Máximo contenido de antocianina luego de la extracción.

FACTOR	BAJO	ALTO	ÓPTIMO
TEMPERATURA	56,591	73,409	73,3529
TIEMPO	16,591	33,409	33,409
pH	2,32955	3,17045	3,17045
RELAC. SOLUT.	0,100294	0,153606	0,148957

2. El método de superficie de respuesta aplicado desde el programa STATGRAFICS PLUS® es una herramienta eficaz para la optimización de variables múltiples con un manejo estadístico de alto nivel y con resultados muy cercanos a la perfección. Lógicamente el analista tendrá que contribuir con el criterio acertado de su manejo.
3. Si el polígono resultante del análisis de la matriz de consistencia resulta ser perfecto (octágono perfecto) esto significa que el modelo se ajusta a la solución de la ecuación propuesta para los cuatro parámetros que influyen en la extracción de antocianinas del maíz morado
4. Del análisis de la carta de Parapeto se desprende que sólo dos de los factores son más determinantes en la extracción, el pH y la relación soluto – solvente teniendo como valores óptimos pH= 2,75, relación soluto-solvente = 0,12695 (1/8) el tiempo en primera instancia y luego la temperatura pueden variar en rangos de máximos y mínimos como se muestra líneas arriba.
5. De la comprobación experimental se desprende que el proceso de optimización ha logrado identificar adecuadamente los valores optimos de los parámetros que influyen en el proceso de extracción de las antocianinas del maíz morado.

## **RECOMENDACIONES**

1. Desarrollar los estudios específicos para la identificación de los factores que influyen en el proceso de extracción de las antocianinas del maíz morado.
2. Mejorar los estudios de optimización de parámetros para lograr diseños matemáticos que ajusten mejor el grado de respuesta de las ecuaciones que generan los softwares estadísticos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. CUADROS CCORAHUA, Abel; OCHOA CONTRERAS, Julio. **“ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA INSTALACIÓN DE UNA PLANTA INDUSTRIAL PARA PRODUCIR ANTOCIANINA EN POLVO A PARTIR DE CORONTA DE MAIZ MORADO (*Zea mays L.*)**. Tesis para optar el título de Ing. Químico. 2001 Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú.
2. DELGADO ESPINOZA, J. **“ENSAYOS SOBRE EL USO DE MICROCAPSULANTES EN EL SECADO POR ATOMIZACIÓN DEL CONCENTRADO DE MAIZ MORADO (*Zea mays L.*)**, Tesis UNA-1989.
3. FERNANDEZ, J. **“DETERMINACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS DEL MAIZ MORADO”**. Tesis UNMSM, 1977.
4. FERNANDEZ, N. A. **“EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE MAIZ MORADO”**, Tesis UNA, 1995.
5. GIBAJA OVIEDO, **“PIGMENTOS QUINÓNICOS NATURALES”**, Tesis UNMSM, 1996.
6. GORRITI G. Arilmí, QUISPE J. Fredy, ARROYO A, Jorge L., CÓRDOVA R. Augusta, JURADO T. Bertha, SANTIAGO A. Ilario y TAYPE E. Evelyng. **“EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LAS CORONTAS DE *Zea mays L.* “MAÍZ MORADO”** Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Unidad de I-D+I. Empresa AGRONEGOCIOS PERUAGRO S.R.L. Facultad de Medicina UNMSM.
7. HENDRY G. A. F. & HOUGHTON J. D. **“NATURAL FOODS COLORANTS”**; Second Edition, Blakie Academic & Professional, Great Britain, 1996.
8. HERAS Irina, ALVIS Armando y ARRAZOLA Guillermo. **“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE BERENJENA (*Solana melonera L.*)”**. Universidad de Córdoba, Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías, Grupo de Investigación Procesos y Agroindustria de vegetales, Carrera 6 No76-103, Km 3, vía Cereté. Córdoba - Colombia. (e-mail: guillermo.arrazola@ua.es)

9. LOCK SING DE UGAZ, Olga. "COLORANTES NATURALES". Primera Edición de 1997. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú.
10. MANRIQUE CHAVEZ, A. "EL MAIZ MORADO PERUANO", Ministerio de Agricultura- INIA, Lima Perú 1995.
11. SIERRA EXPORTADORA. "ANTOCIANINA DEL MAIZ MORADO" Perfil Comercial. Presidencia del Consejo de Ministros. Organismo Público Sierra Exportadora. Lima-Perú. 2013.
12. SOTOMAYOR, Rosa. "EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LOS GRANOS DE *Zea mays L.* (MAÍZ MORADO)" Universidad Alas Peruanas. Arequipa. Perú.
13. TINEO BERMÚDEZ, Alex L. "MANUAL PARA EL ANÁLISIS DE DISEÑOS EXPERIMENTALES DE SUPERFICIE DE RESPUESTA". Primera Edición del 2000. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
14. ZAPATA, Luz M.; HEREDIA, Ana M.; QUINTEROS, Carlos F.; MALLARET, Antonio D.; CLEMENTE, Gabriela; CARCEL, Juan A. "OPTIMIZACION DE LA EXTRACCION DE ANTOCIANINAS DE ARÁNDANOS". Facultad de Ciencias de la Alimentación (FCAL). Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER). Concórdia. Argentina. Octubre 2011.

**ANEXO 01**

**RESULTADOS TAL COMO LOS MUESTRA EL PROGRAMA EN ORDEN DE APARICIÓN.**

Design Summary

-----  
 Design class: Response Surface  
 Design name: Draper-Lin small composite design  
 Design characteristic: Rotatable  
 File name: C:\Mis documentos\cronwell.sfx

Base Design

-----  
 Number of experimental factors: 4    Number of blocks: 1  
 Number of responses: 1  
 Number of runs: 18                      Error degrees of freedom: 3  
 Randomized: Yes

Factors	Low	High	Units	Continuou
Temperatura	60.0	70.0	°C	Yes
Tiempo	20.0	30.0	minutos	Yes
pH	2.5	3.0		Yes
solvente	0.1111	0.1428		Yes

Responses

Units

-----  
 Contenido

%

The StatAdvisor

-----  
 You have created a Draper-Lin small composite design design which will study the effects of 4 factors in 18 runs. The design is to be run in a single block. The order of the experiments has been fully randomized. This will provide protection against the effects of lurking variables.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
 POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

C:\Mis documentos\cronwell.sfx

run	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	pH	solvente	Contenido (%)
1	65.0	25.0	2.75	0.153606	_____
2	65.0	33.409	2.75	0.12695	_____
3	60.0	30.0	3.0	0.1428	_____
4	70.0	20.0	3.0	0.1428	_____
5	65.0	25.0	2.75	0.12695	_____
6	65.0	25.0	2.75	0.12695	_____
7	65.0	25.0	3.17045	0.12695	_____
8	70.0	30.0	3.0	0.1111	_____
9	65.0	25.0	2.32955	0.12695	_____
10	60.0	20.0	3.0	0.1111	_____
11	65.0	25.0	2.75	0.100294	_____
12	70.0	20.0	2.5	0.1428	_____
13	56.591	25.0	2.75	0.12695	_____
14	60.0	30.0	2.5	0.1428	_____
15	60.0	20.0	2.5	0.1111	_____
16	65.0	16.591	2.75	0.12695	_____
17	73.409	25.0	2.75	0.12695	_____
18	70.0	30.0	2.5	0.1111	_____

The StatAdvisor

-----  
 This pane shows a worksheet containing the experimental runs to be performed, in the order they are to be run. Press the alternate mouse button and select Print to send this worksheet to the printer. After the experiments have been run and the results recorded on the worksheet, open this experiment again. Then type the results into the spreadsheet and select Special - Experimental Design - Analyze Design.

Resultados experimentales luego de la generación aleatoria de ensayos por el programa StatGrafics Plus.

	Temp.	Tiempo	Ph	Relación	Contenido
1	65	25	2.75	0.153606	0.045
1	65	33.409	2.75	0.12695	0.06
1	60	30	3	0.1428	0.055
1	70	20	3	0.1428	0.04
1	65	25	2.75	0.12695	0.05
1	65	25	2.75	0.12695	0.045
1	65	25	3.17045	0.12695	0.057
1	70	30	3	0.1111	0.058
1	65	25	2.32955	0.12695	0.048
1	60	20	3	0.1111	0.04
1	65	25	2.75	0.100294	0.041
1	70	20	2.5	0.1428	0.046
1	56.591	25	2.75	0.12695	0.047
1	60	30	2.5	0.1428	0.05
1	60	20	2.5	0.1111	0.046
1	65	16.591	2.75	0.12695	0.04
1	73.409	25	2.75	0.12695	0.058
1	70	30	2.5	0.1111	0.048

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Analysis Summary

-----  
File name: C:\Mis documentos\cronwell I.sfx

Estimated effects for contenido

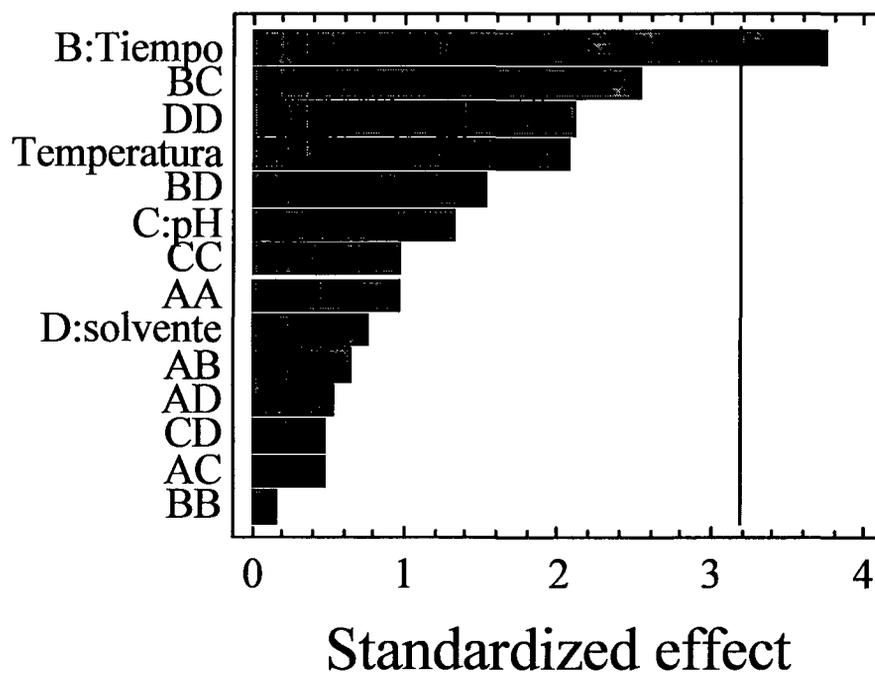
-----  
average = 0.0486027 +/- 0.00241791  
A:Temperatura = 0.00654061 +/- 0.00318736  
B:Tiempo = 0.011892 +/- 0.00318736  
C:pH = 0.00265598 +/- 0.00205137  
D:solvente = 0.00237845 +/- 0.00318742  
AA = 0.00209027 +/- 0.00221048  
AB = 0.00262845 +/- 0.00416454  
AC = 0.00125 +/- 0.00268025  
AD = 0.00214202 +/- 0.00416449  
BB = 0.000322523 +/- 0.00221048  
BC = 0.00675 +/- 0.00268025  
BD = 0.00629061 +/- 0.00416449  
CC = 0.00209027 +/- 0.00221048  
CD = -0.00125 +/- 0.00268025  
DD = -0.00462739 +/- 0.00221055  
-----

Standard errors are based on total error with 3 d.f.

The StatAdvisor

-----  
This table shows each of the estimated effects and interactions. Also shown is the standard error of each of the effects, which measures their sampling error. To plot the estimates in decreasing order of importance, select Pareto Charts from the list of Graphical Options. To test the statistical significance of the effects, select ANOVA Table from the list of Tabular Options. You can then remove insignificant effects by pressing the alternate mouse button, selecting Analysis Options, and pressing the Exclude button.

## Standardized Pareto Chart for contenido



BIBLIOTECA E INFORMACION  
CULTURAL  
U.N.S.C.H.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
 POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Analysis of Variance for contenido

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
A:Temperatura	0.0000605	1	0.0000605	4.21
B:Tiempo	0.0002	1	0.0002	13.92
C:pH	0.0000240847	1	0.0000240847	1.68
D:solvente	0.000008	1	0.000008	0.56
AA	0.0000128474	1	0.0000128474	0.89
AB	0.0000057233	1	0.0000057233	0.40
AC	0.000003125	1	0.000003125	0.22
AD	0.00000380105	1	0.00000380105	0.26
BB	3.05865E-7	1	3.05865E-7	0.02
BC	0.000091125	1	0.000091125	6.34
BD	0.0000327825	1	0.0000327825	2.28
CC	0.0000128474	1	0.0000128474	0.89
CD	0.000003125	1	0.000003125	0.22
DD	0.0000629586	1	0.0000629586	4.38
Total error	0.0000431025	3	0.0000143675	
Total (corr.)	0.000744444	17		

R-squared = 94.2101 percent

R-squared (adjusted for d.f.) = 67.1906 percent

The StatAdvisor

The ANOVA table partitions the variability in contenido into separate pieces for each of the effects. It then tests the statistical significance of each effect by comparing the mean square against an estimate of the experimental error. In this case, 1 effects have P-values less than 0.05, indicating that they are significantly different from zero at the 95.0% confidence level.

The R-Squared statistic indicates that the model as fitted explains 94.2101% of the variability in contenido. The adjusted R-squared statistic, which is more suitable for comparing models with different numbers of independent variables, is 67.1906%. The standard error of the estimate shows the standard deviation of the residuals to be 0.00379045. The mean absolute error (MAE) of 0.00126691 is the average value of the residuals. The Durbin-Watson (DW) statistic tests the residuals to determine if there is any significant correlation based on the order in which they occur in your data file. Since the DW value is greater than 1.4, there is probably not any serious autocorrelation in the residuals.

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Regression coeffs. for contenido

```
-----  
constant          = 0.653757  
A:Temperatura     = -0.00918552  
B:Tiempo          = -0.0150137  
C:pH              = -0.166636  
D:solvente        = 0.976498  
AA                = 0.0000418055  
AB                = 0.000052569  
AC                = 0.0005  
AD                = 0.0135143  
BB                = 0.00000645046  
BC                = 0.0027  
BD                = 0.0396884  
CC                = 0.0167222  
CD                = -0.157729  
DD                = -9.20975  
-----
```

The StatAdvisor

-----  
This pane displays the regression equation which has been fitted to the data. The equation of the fitted model is

$$\begin{aligned} \text{contenido} = & 0.653757 - 0.00918552 * \text{Temperatura} - 0.0150137 * \text{Tiempo} \\ & - 0.166636 * \text{pH} + 0.976498 * \text{solvente} + 0.0000418055 * \text{Temperatura}^2 + \\ & 0.000052569 * \text{Temperatura} * \text{Tiempo} + 0.0005 * \text{Temperatura} * \text{pH} + \\ & 0.0135143 * \text{Temperatura} * \text{solvente} + 0.00000645046 * \text{Tiempo}^2 + \\ & 0.0027 * \text{Tiempo} * \text{pH} + 0.0396884 * \text{Tiempo} * \text{solvente} + 0.0167222 * \text{pH}^2 - \\ & 0.157729 * \text{pH} * \text{solvente} - 9.20975 * \text{solvente}^2 \end{aligned}$$

where the values of the variables are specified in their original units. To have STATGRAPHICS evaluate this function, select Predictions from the list of Tabular Options. To plot the function, select Response Plots from the list of Graphical Options.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays* L.)  
POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Correlation Matrix for Estimated Effects

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
(1)average	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.6224	0.0000	0.0000
(2)A:Temperatura	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(3)B:Tiempo	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)C:pH	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)D:solvente	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.7654	0.0000
(6)AA	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(7)AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	1.0000	0.0000
(8)AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
(9)AD	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(10)BB	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000
(11)BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(12)BD	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(13)CC	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000
(14)CD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(15)DD	-0.6224	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000

	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1)average	0.0000	-0.6224	0.0000	0.0000	-0.6224	0.0000	-0.6224
(2)A:Temperatura	0.0000	0.0000	0.0000	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000
(3)B:Tiempo	0.7654	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)C:pH	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)D:solvente	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(6)AA	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.2649
(7)AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(8)AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(9)AD	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(10)BB	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	0.2649
(11)BC	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(12)BD	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(13)CC	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.2649
(14)CD	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
(15)DD	0.0000	0.2649	0.0000	0.0000	0.2649	0.0000	1.0000

The StatAdvisor

The correlation matrix shows the extent of the confounding amongst the effects. A perfectly orthogonal design will show a diagonal matrix with 1's on the diagonal and 0's off the diagonal. Any non-zero terms off the diagonal imply that the estimates of the effects corresponding to that row and column will be correlated. In this case, there are 9 pairs of effects with non-zero correlations. Since one or more of the pairs is greater than or equal to 0.5, you may have some difficulty separating the effects from each other when analyzing the data. You should consider adding additional runs to the design to reduce the correlations.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
 POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Estimation Results for contenido

Row	Observed Value	Fitted Value	Lower 95.0% CL for Mean	Upper 95.0% CL for Mean
1	0.045	0.0440588	0.0324121	0.0557054
2	0.06	0.0590588	0.0474121	0.0707055
3	0.055	0.0566185	0.045084	0.068153
4	0.04	0.0416185	0.030084	0.053153
5	0.05	0.0486027	0.0409078	0.0562976
6	0.045	0.0486027	0.0409078	0.0562976
7	0.057	0.0537922	0.0441472	0.0634372
8	0.058	0.0596185	0.048084	0.071153
9	0.048	0.0493254	0.0396804	0.0589704
10	0.04	0.0416185	0.030084	0.053153
11	0.041	0.0400588	0.0284121	0.0517054
12	0.046	0.0457125	0.034178	0.0572471
13	0.047	0.0460588	0.0344121	0.0577055
14	0.05	0.0497125	0.038178	0.0612471
15	0.046	0.0457125	0.034178	0.0572471
16	0.04	0.0390588	0.0274121	0.0507055
17	0.058	0.0570588	0.0454121	0.0687055
18	0.048	0.0477125	0.036178	0.0592471

The StatAdvisor

This table contains information about values of contenido generated using the fitted model. The table includes:

- (1) the observed value of contenido (if any)
- (2) the predicted value of contenido using the fitted model
- (3) 95.0% confidence limits for the mean response

Each item corresponds to the values of the experimental factors in a specific row of your data file. To generate forecasts for additional combinations of the factors, add additional rows to the bottom of your data file. In each new row, enter values for the experimental factors but leave the cell for the response empty. When you return to this pane, forecasts will be added to the table for the new rows, but the model will be unaffected.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Path of Steepest Ascent for contenido

Temperatur (°C)	Tiempo (minutos)	pH	solvente	Predicted contenido (%)
65.0	25.0	2.75	0.12695	0.0486027
66.0	26.7045	2.77667	0.128275	0.0519087
67.0	28.2686	2.81267	0.12981	0.0559512
68.0	29.7632	2.85459	0.131412	0.0608458
69.0	31.2195	2.90066	0.133035	0.0666545
70.0	32.6537	2.94984	0.13466	0.073419

The StatAdvisor

-----  
This pane displays the path of steepest ascent (or descent). This is the path from the center of the current experimental region along which the estimated response changes most quickly for the smallest change in the experimental factors. It indicates good locations to run additional experiments if your goal is to increase or decrease contenido. Currently, 6 points have been generated by changing Temperatura in increments of 1.0 °C. You can specify the amount to change any one factor by pressing the alternate mouse button and selecting Pane Options. STATGRAPHICS will then determine how much the other factors have to change to stay on the path of steepest ascent. The program also computes the estimated contenido at each of the points along the path, which you can compare to your results if you run those points.

**OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DEL MAÍZ MORADO (*Zea mays L.*)  
 POR EL MÉTODO DE SUPERFICIE DE RESPUESTA Y VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL**

Cronwell Eduardo Alarcón Mundaca

Optimize Response

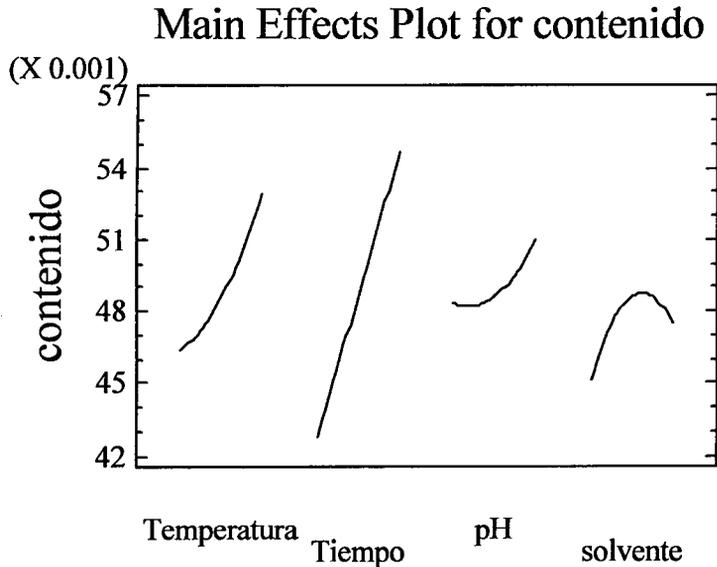
-----  
 Goal: maximize contenido

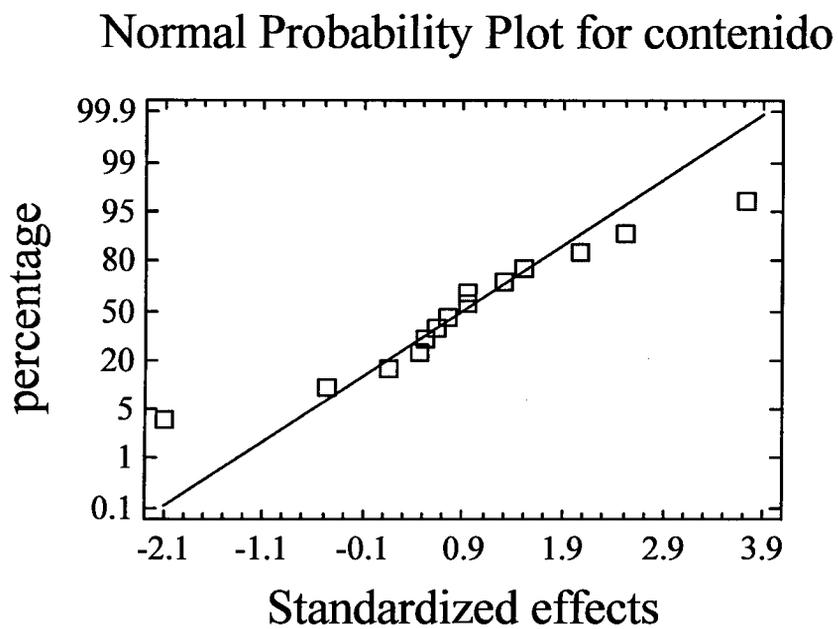
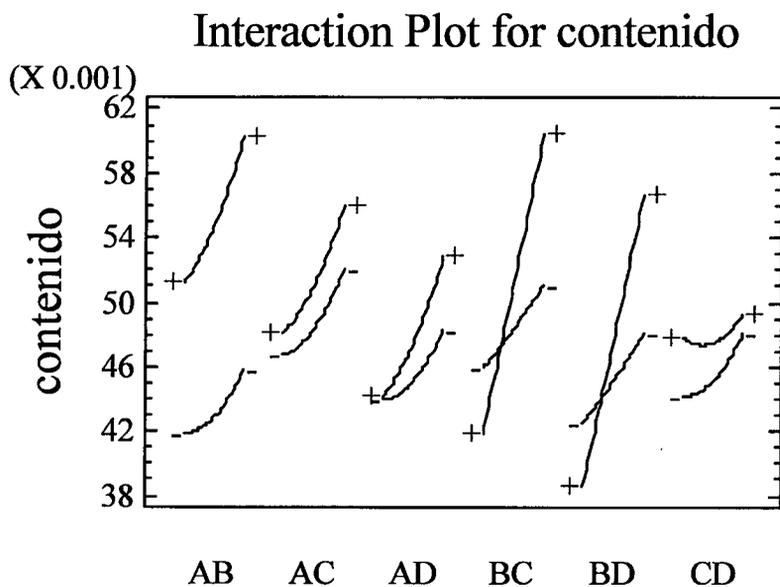
Optimum value = 0.093183

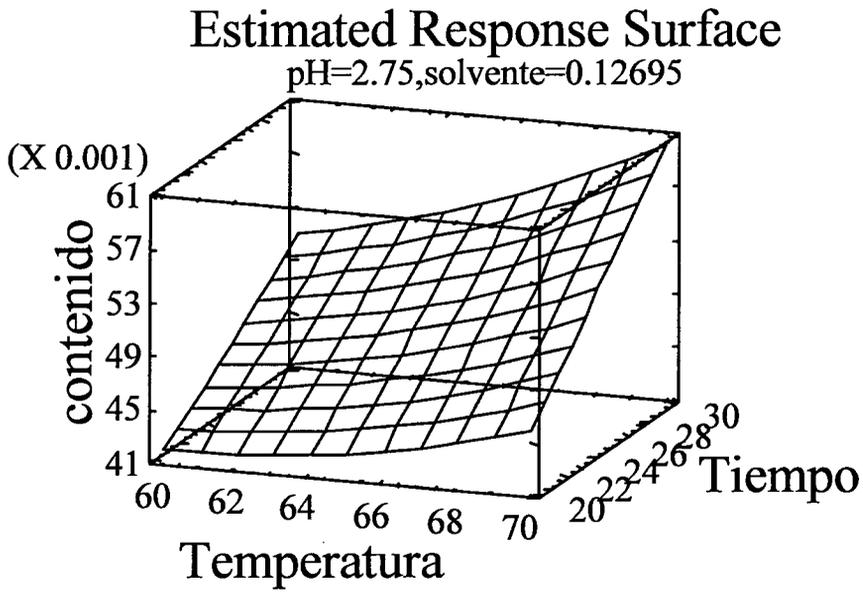
Factor	Low	High	Optimum
Temperatura	56.591	73.409	73.3529
Tiempo	16.591	33.409	33.409
pH	2.32955	3.17045	3.17045
solvente	0.100294	0.153606	0.148957

The StatAdvisor

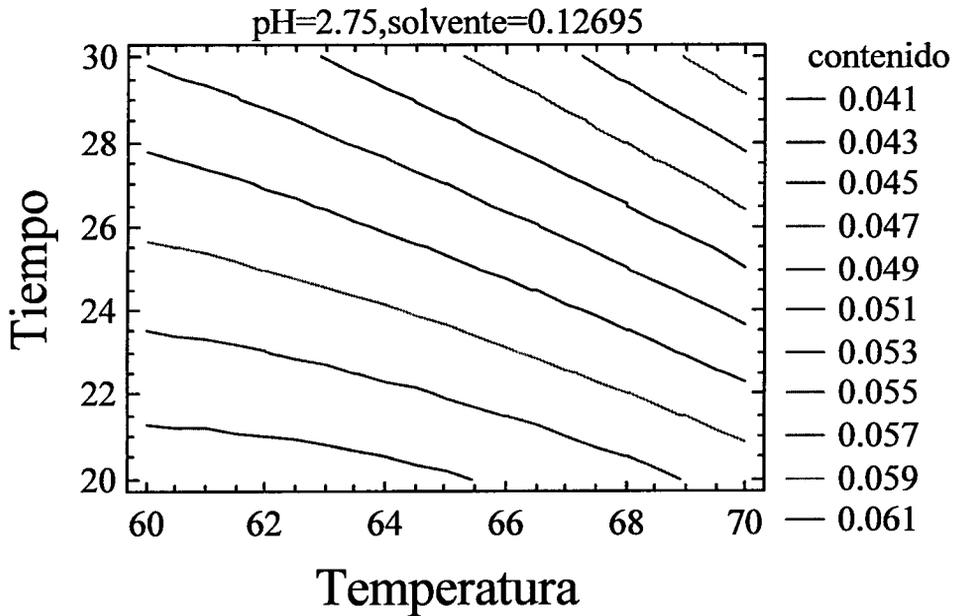
-----  
 This table shows the combination of factor levels which maximizes contenido over the indicated region. Use the Analysis Options dialog box to indicate the region over which the optimization is to be performed. You may set the value of one or more factors to a constant by setting the low and high limits to that value.

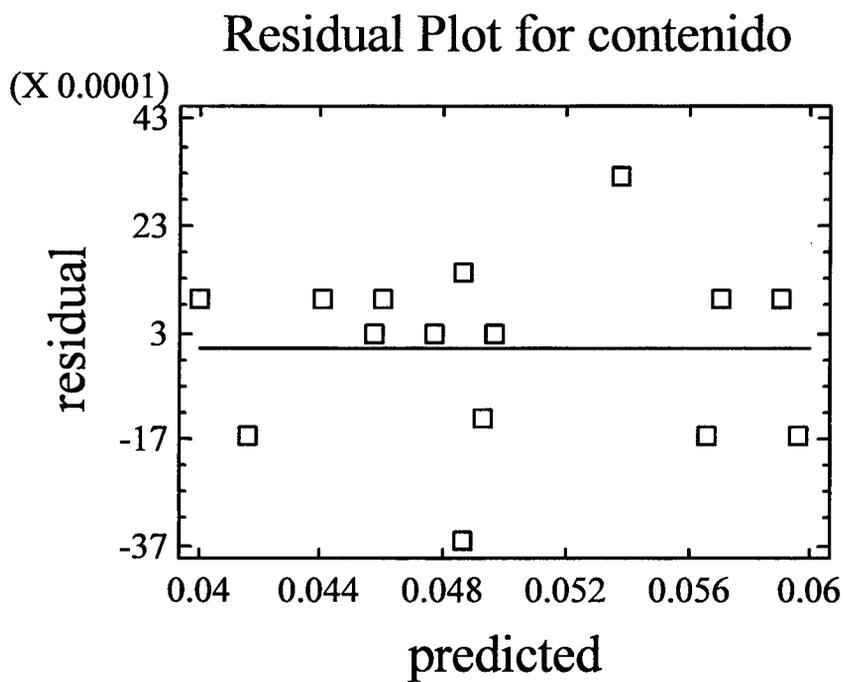






### Contours of Estimated Response Surface





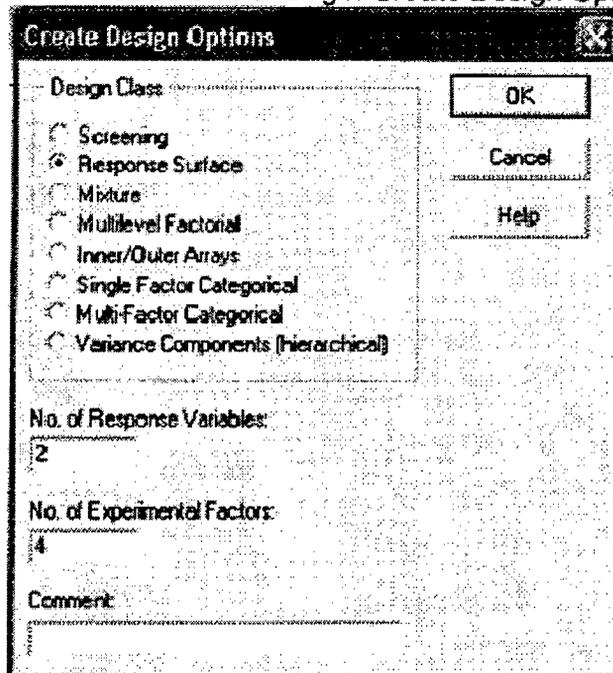
## ANEXO 02

### COSTRUCION DE UN DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la creación de un determinado diseño, de entre los que Statgraphics ofrece, se tiene:

1. Seleccione Special/Experimental Design/ Create Design. Aparecerá el cuadro de dialogo de la figura 10, en el se pueden observar diferentes *clases de diseño*.
2. Seleccione la segunda opción, Response Surface y haga clic sobre el botón OK.
3. Seleccione el factor A, escriba el nombre (Dilución), los valores bajos y alto (7 y 9) y las unidades (gramos).  
Seleccione el factor B, escriba el nombre (Cultivo), los valores bajos y alto (1 y 3) y las unidades (%).  
Seleccione el factor C, escriba el nombre (Sacarosa), los valores bajos y alto (3 y 5) y las unidades (%).  
Seleccione el factor D, escriba el nombre (Glucosa), los valores bajos y alto (2 y 4) y las unidades (%).
4. Haga clic sobre el botón OK. (Como se muestra en la figura 11).

Figura N° 10: Cuadro de Dialogo: Create Design Options



5. Escriba el nombre de la variable respuesta, Evaluación Organoléptica, en el cuadro de diálogo que aparece (véase figura 12), y las unidades. De igual forma para la otra variable respuesta, Acidez y sus unidades (%).

Figura N° 11: Cuadro de Dialogo: Factor Definition Options

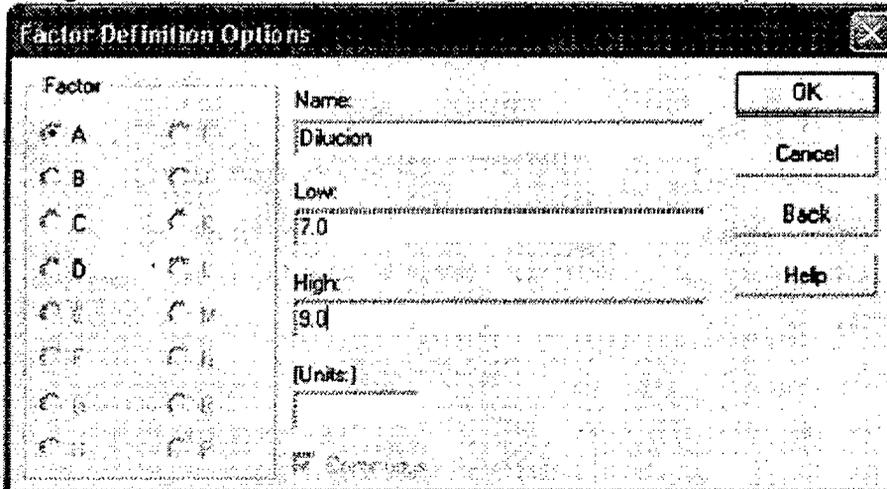
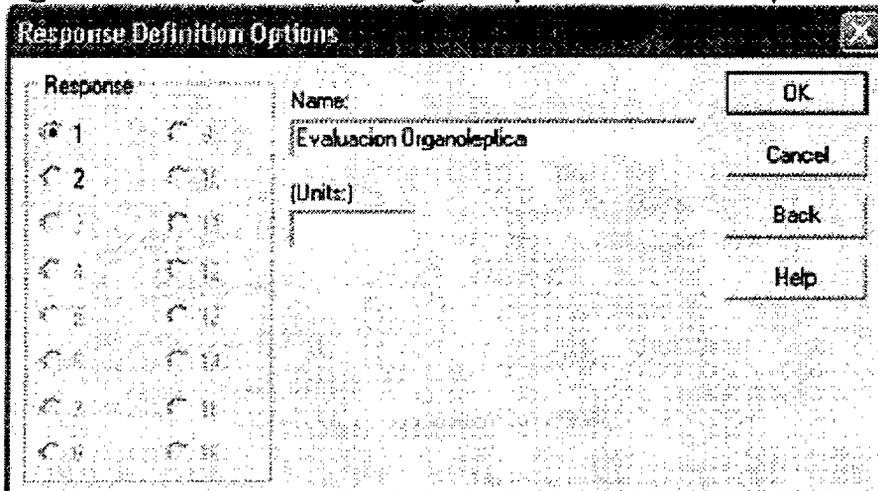


Figura N° 12: Cuadro de Dialogo: Response Definition Options



6. Haga clic sobre el botón OK. Aparecerá un cuadro de diálogo en el que se debe de elegir el tipo de diseño (véase figura 13). La elección de uno u otro, explicado de forma resumida, supone decidir en que puntos (de los del cubo: Vértices, punto central, puntos medios...) se mide la variable respuesta.
7. Seleccione el tipo: Diseño Compuesto Central Cubo y Estrella y haga clic sobre el botón OK.

- En el cuadro de diálogo que aparece (véase figura 14), especifique que se desea un a replicación y active la casilla de aleatorización (randomize). Para aceptar las otras propuestas que el programa hace por defecto haga clic sobre el botón OK.

Figura N° 13: Cuadro de Dialogo: Response Surface Design Selection

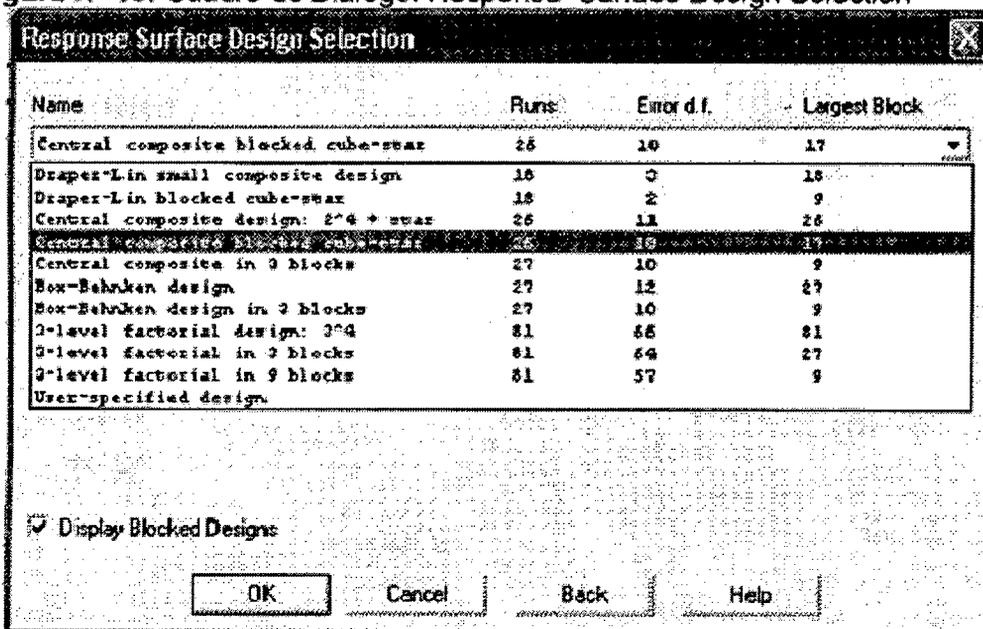
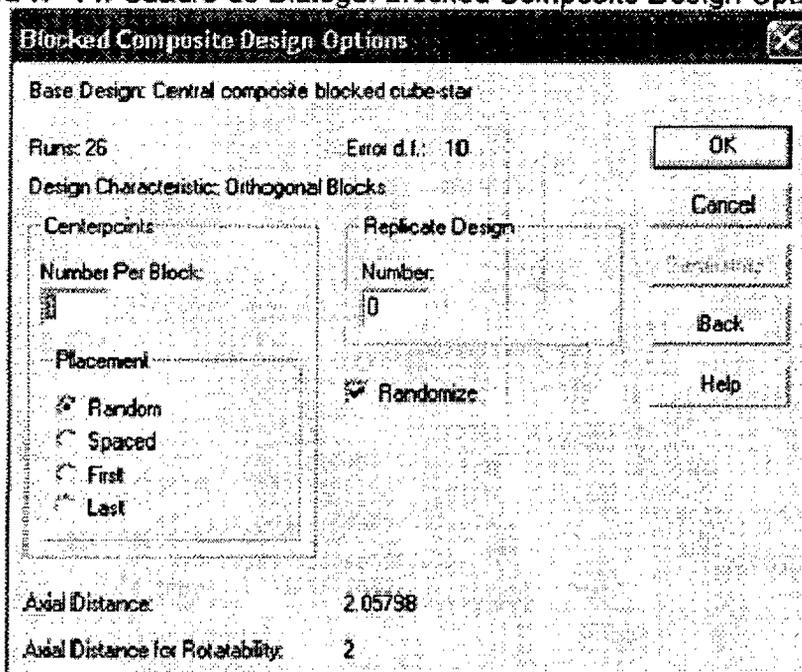


Figura N° 14: Cuadro de Dialogo: Blocked Composite Design Options



Un resumen del diseño confeccionado aparecerá en un panel, tal y como se muestra en la figura 15 y 16.

De cara a la toma de datos, el programa ofrece una hoja de trabajo, que se puede imprimir, con el objeto de anotar en ella todos los valores obtenidos en la experimentación (botón Tabular options y selección de la opción Worksheet) y trasladar posteriormente dichos valores a la hoja de cálculo del programa.

Figura N° 15: Resumen de Diseño

	BLOCK	Dilución	Cellulosa	Sacarosa	Glucosa	Evaluación	Índice
1	1	7,0	1,0	5,0	2,0		
2	1	9,0	3,0	5,0	4,0		
3	1	7,0	3,0	3,0	4,0		
4	1	9,0	1,0	3,0	4,0		
5	1	9,0	3,0	3,0	2,0		
6	1	8,0	2,0	4,0	3,0		
7	1	9,0	1,0	3,0	2,0		
8	1	7,0	3,0	3,0	4,0		
9	1	7,0	1,0	3,0	4,0		
10	1	9,0	3,0	3,0	4,0		
11	1	7,0	1,0	3,0	2,0		
12	1	7,0	3,0	3,0	2,0		
13	1	9,0	3,0	3,0	2,0		
14	1	7,0	3,0	3,0	2,0		
15	1	9,0	1,0	3,0	2,0		
16	1	9,0	1,0	3,0	4,0		
17	1	7,0	1,0	3,0	4,0		
18	2	8,0	2,0	4,0	1,0		
19	2	10,0	2,0	4,0	2,0		
20	2	8,0	4,0	4,0	3,0		
21	2	8,0	2,0	6,0	3,0		
22	2	8,0	2,0	4,0	5,0		
23	2	8,0	2,0	4,0	3,0		
24	2	8,0	2,0	2,0	3,0		
25	2	6,0	2,0	3,0	3,0		
26	2	8,0	0,0	4,0	3,0		
27							
28							
29							
30							

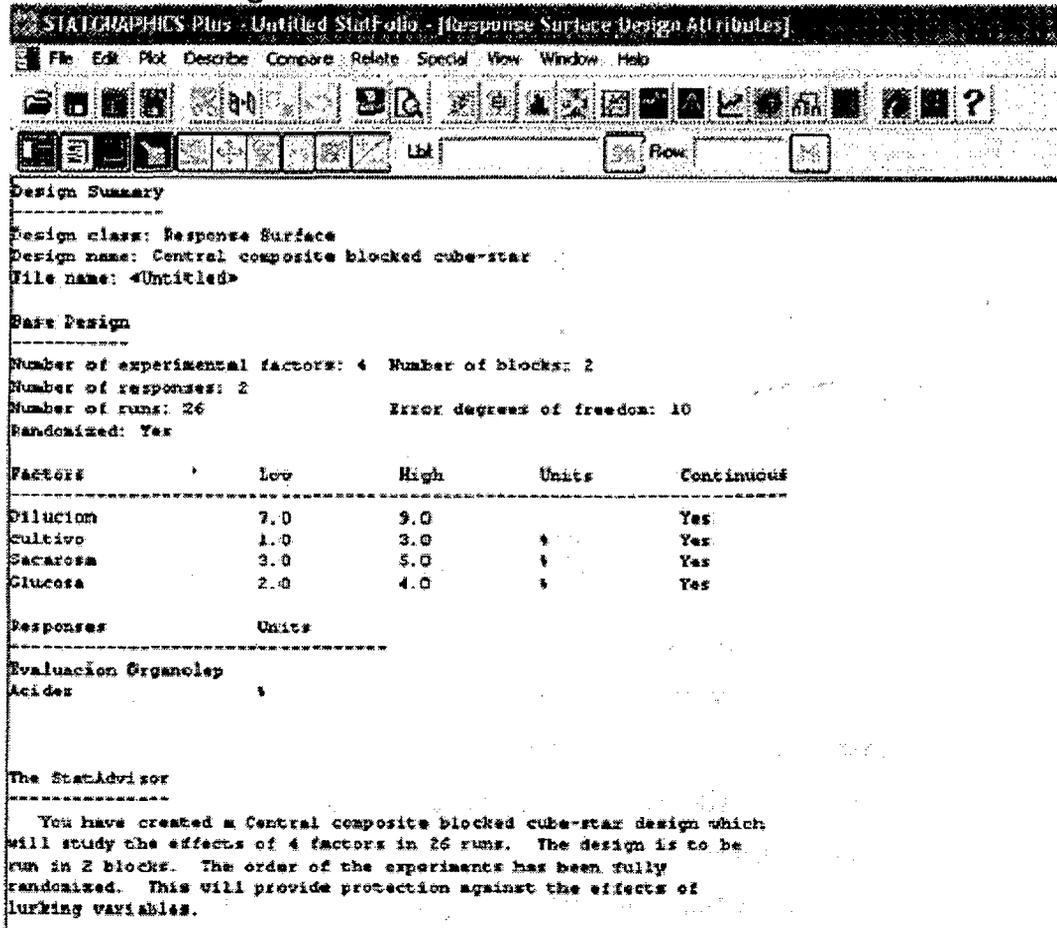
En cualquier caso, los puntos a considerar son los de la figura 15

Una vez obtenidos los datos, hay que introducirlos en la ventana correspondiente:

9. Active la ventana de hoja de calculo (no la worksheet) e introduzca los valores experimentales.

Tras guardar el diseño creado, se puede proceder al análisis

Figura N° 16: Resumen de Diseño



## ALMACENAMIENTO DE DISEÑO CREADO

Una vez creado, se puede guardar el diseño creado. Para ello:

1. Seleccione File/Save As/Save Design File As.
2. Escriba un nombre, en el cuadro de dialogo que aparece, y elija una ubicación en el disco. Después, haga clic sobre el botón Guardar. Los ficheros así creados se guardaran con la extensión SFX. En lo sucesivo, el diseño se podrá abrir mediante Special/Experimental Design/Open Design o como cualquier fichero de datos.

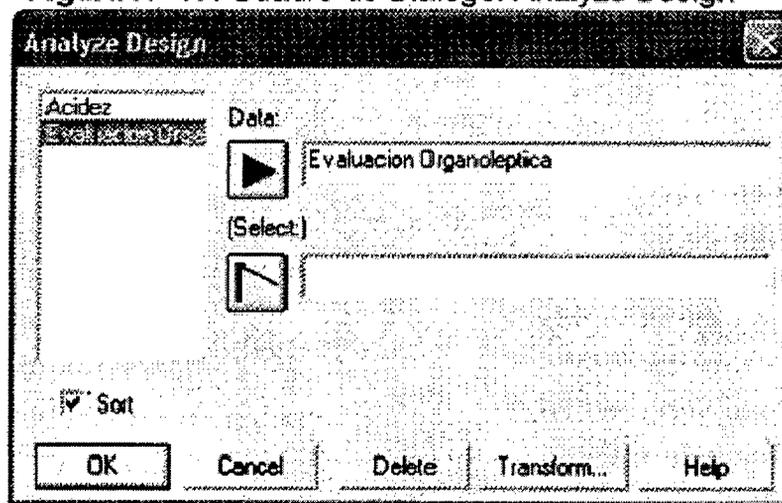
## ANÁLISIS DE DISEÑO

La tercera fase es el análisis del diseño creado. Si este se encuentra abierto (en caso contrario hay que abrirlo como se acaba de indicar):

1. Seleccione Special/Experimental Design/Analyze Design. Aparecerá el cuadro de dialogo de la figura 17

2. Introduzca la variable objeto de estudio como en la figura 17 Después, haga clic sobre el botón OK.

Figura N° 17: Cuadro de Dialogo: Analyze Design



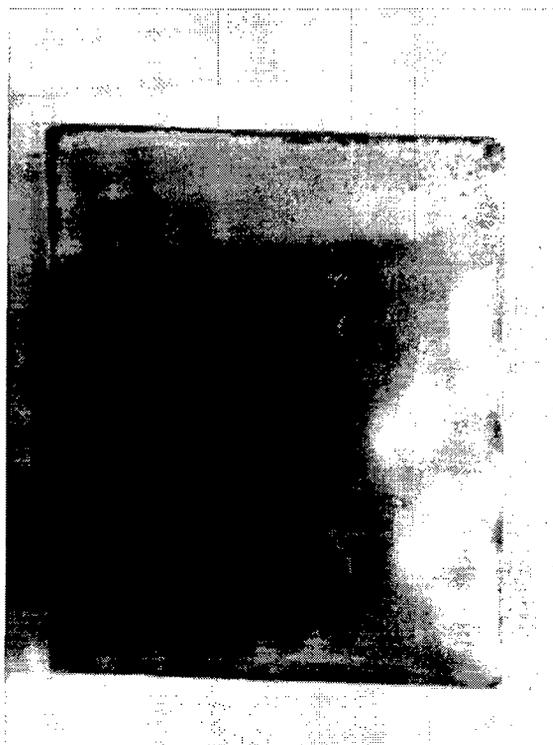
Aparecerá un primer panel en el que ofrece una estimación de los efectos de los factores y de las interacciones y un panel grafico en el que aparecen ordenados gráficamente estos efectos, trazando el programa una línea divisoria de los que considera significativos y los que no (véase figura 7, en el Capítulo III)

A la tabla ANOVA se llega pulsando el botón Tabular Options, seleccionando la opción ANOVA Table, y confirmando (véase Tabla 9, en el capítulo III). De igual forma en el botón Tabular Options, seleccionando la opción Optimization y confirmando (véase Tabla 11, en el capítulo III)

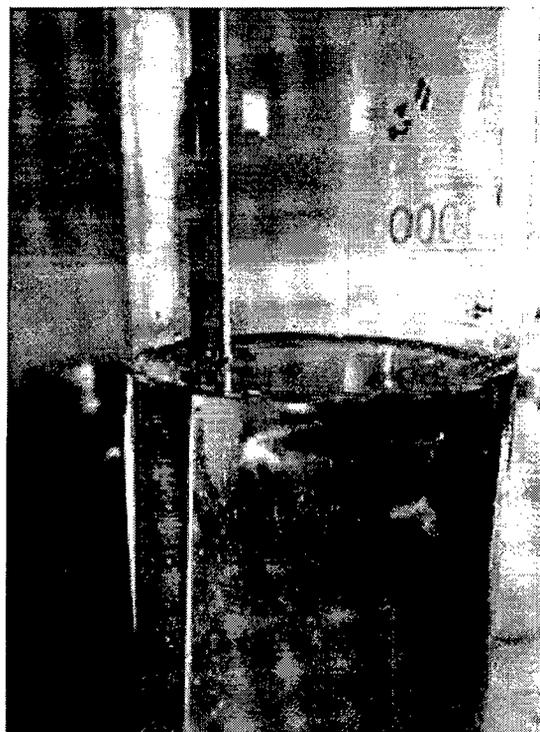
A otros análisis se llega de forma similar. Por ejemplo, haga clic sobre el botón Graphical options y active las casillas Response Plots. Después haga Clic sobre el botón OK. De la misma forma para el grafico de contornos. Los cuales se muestran en las Figuras 8 y 9 (en el Capítulo III)

ANEXO 03  
FOTOS DE LA VALIDACION EXPERIMENTAL.

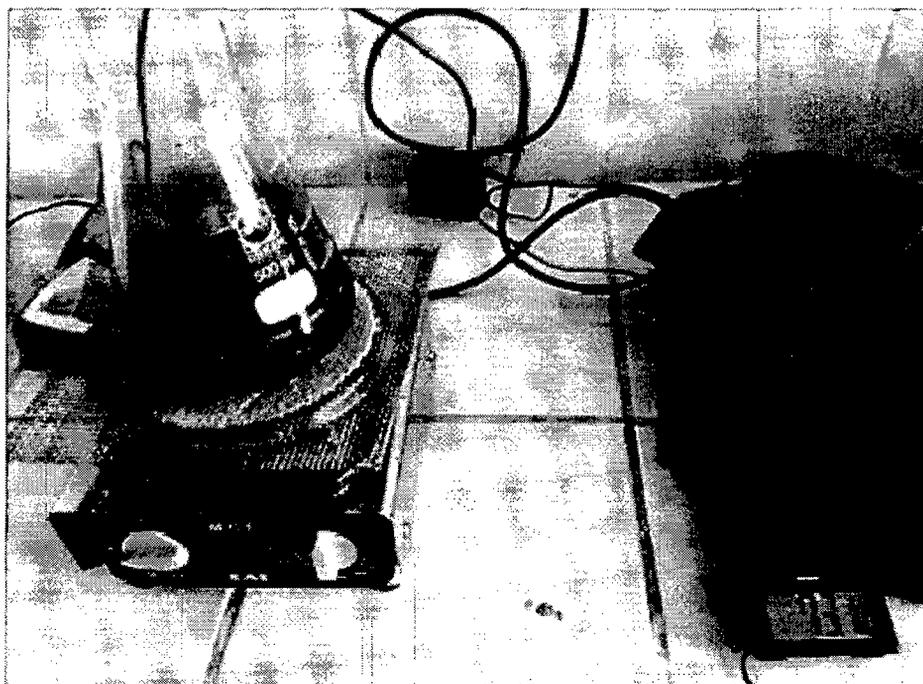
1. MUESTRA MOLIDA.



2. SOLUCIÓN ETANÓLICA.



### 3. PROCESO DE EXTRACCIÓN.



### 4. FILTRADO.



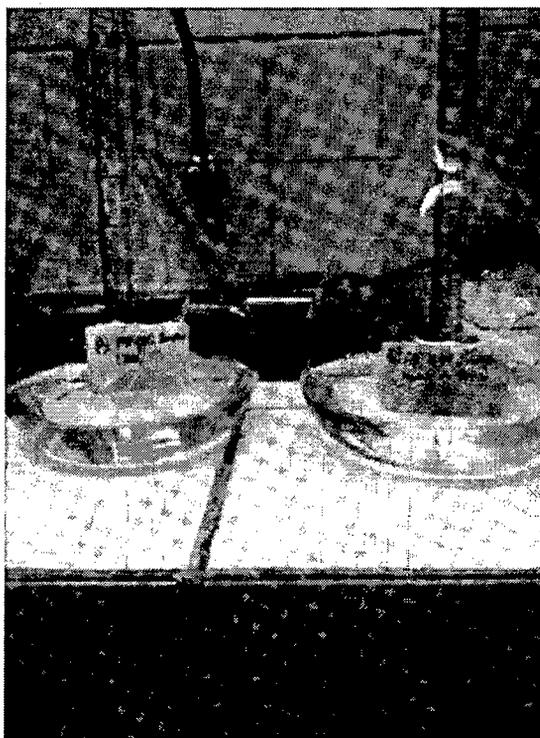
## 5. ESPECTROFOTÓMETRO UV VISIBLE



## 6. SOLUCIÓN EXTRAIDA EN FUNCIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS.



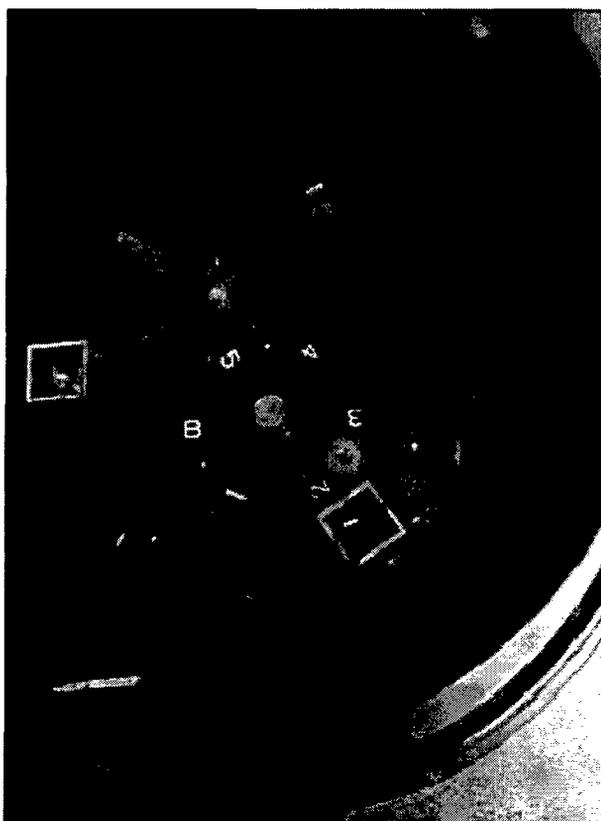
## 7. SOLUCIONES BUFFER.



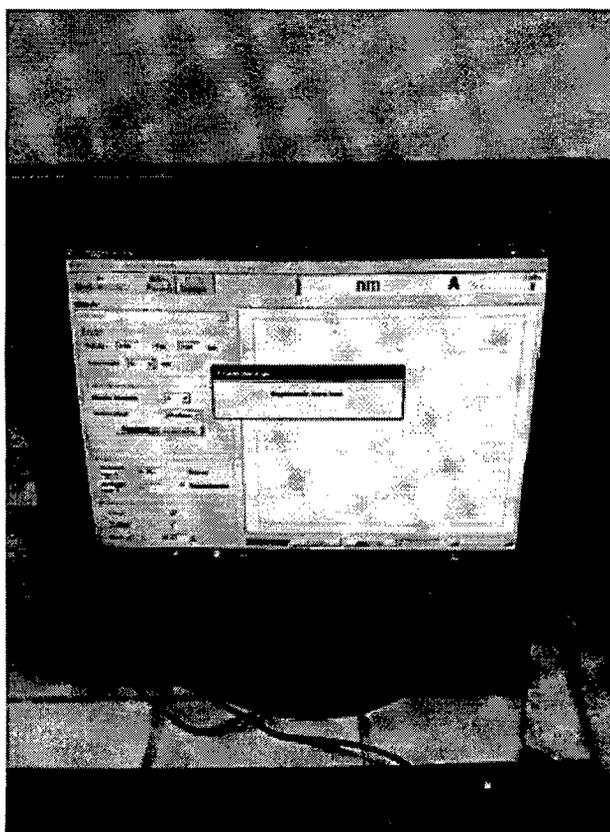
## 8. ALÍCUOTAS DE MUESTRA LISTAS PARA LECTURA.



### 9. MUESTRAS LISTAS PARA LECTURA.



### 10. INICIANDO PROCESO DE LECTURA (SOFTWARE VISION)



## 11. PRIMEROS RESULTADOS.

