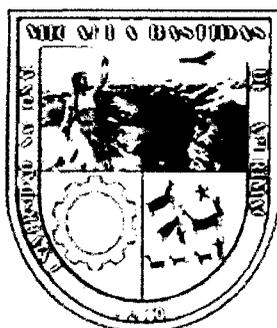


**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS  
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**



**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DEL FRUTO  
DE TANKAR (*Berberis boliviana L.*) Y DETERMINACIÓN  
DEL CONTENIDO POR EL MÉTODO DEL pH-  
DIFERENCIAL**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**ELÍAS ARANIBAR AGUILAR**

**Abancay, Julio del 2013**

**PERÚ**

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS APURIMAC	
BIBLIOTECA CENTRAL	
FECHA INGRESO:	13 SEP 2013
Nº:	00327

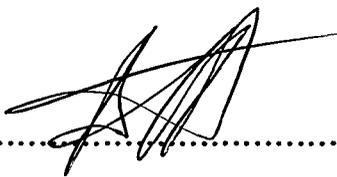
**“EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DEL  
FRUTO DE TANKAR (*Berberis boliviana* L.) Y  
DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO POR EL MÉTODO  
DEL pH-DIFERENCIAL”**

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS  
DE APURÍMAC**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

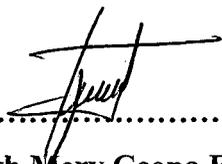
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AGROINDUSTRIAL**

**Jurado calificador integrado por:**



.....  
**Ing. Alfredo Fernández Ayma**

**Presidente**



.....  
**Ing. Ruth Mery Coopa Flores**

**Jurado**



.....  
**Ing. Alex Ernesto Muñoz Cáceres**

**Jurado**



.....  
**Ing. Jorge Beltrán Mendoza Cáceres**

**Asesor**

### **DEDICATORIA**

*Con mucho aprecio y amor al ser especial que Dios me ha regalado, mi madre Isabel Aguilar Valenzuela, quien afrontó con valentía y esfuerzo los problemas que se presentaron en la vida y supo sacar adelante a sus hijos, fruto de ello soy yo uno de ellos.*

*A mis hermanos Camilo y familia, Margarita, Freddy, Inocencio, Paúl (en el cielo) y José; los quiero mucho.*

*A mí querido padre Inocencio Aranibar Villavicencio a quien Dios se lo llevo cuando era muy niño, que sepa que lo quiero.*

*A mí estimado abuelo Germán Aguilar Serrano, quien Dios aun me lo da.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer ante todo a DIOS y a la Santísima Virgen MARÍA (Guadalupe) por haberme dado la vida, porque en los momentos difíciles he confiado en ellos y nunca me han abandonado, por tanta alegría que me dan.

A mi madre gracias por la dicha de traerme al mundo; a mis hermanos, a mis primeros sobrinos Illary, Qory y Camilo que los quiero mucho, a mi abuelo, a mi familia entera, gracias por todo.

A mi alma mater la UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC, por haberme acogido en sus aulas durante mi formación profesional.

Al Ingeniero Jorge Beltrán Mendoza Cáceres docente de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNAMBA; por su disponibilidad en guiar el presente trabajo de investigación, aceptando ser ASESOR, estoy infinitamente agradecido por todo el apoyo que me brindo durante la ejecución de esta investigación, que Dios le bendiga.

Al Médico Veterinario Ludwind Ángel Cárdenas Villanueva docente de la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAMBA; por su apoyo desinteresado en la etapa experimental, dando de su tiempo valioso, gracias.

Al Ingeniero Víctor Hugo Sarmiento Casavilca docente de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNAMBA; por su contribución muy importante en este trabajo de investigación en cada etapa, por sus consejos, por sus palabras de aliento y por ese apoyo incondicional; muchas gracias.

Al Químico Melquiades Barragán Condori, docente de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial – UNAMBA; por algunos alcances que me brindo en la ejecución de este trabajo, que me sirvieron de gran ayuda.

A mi amigo José Díaz Pillaca por su apoyo y contribución en el procesamiento de datos, gracias por todo.

A los docentes de la E.A.P. de Ingeniería Agroindustrial – UNAMBA, a aquellos buenos y verdaderos docentes sencillos, honestos, sinceros; quienes impartieron su conocimiento para con nosotros los estudiantes, durante mi permanencia en la universidad.

A todos los sacerdotes y religiosas quienes me supieron dar su consejo y oración, me enseñaron a confiar en Dios pase lo que pase en todo momento, me ayudaron a crecer en mi fe, de manera especial al Rvdo. Padre Santiago OSA, Rvdo. Padre Ramiro Juro Diocesano y a la Rvda. Madre Ana María de las Hijas del Crucificado; tanto en Chuquibambilla como en Abancay, a todos estoy eternamente agradecido.

A mis amigos, amigas y al Párroco de la Parroquia Nuestra Señora de Guadalupe - Abancay, a los jóvenes del grupo parroquial Ministerios de María, por sus palabras de aliento para seguir adelante cuando habían dificultades en mi vida, de manera especial a Raquel; de igual manera quiero agradecer a los jóvenes del Coro de esta Parroquia, quienes me enseñaron muchas cosas, donde aprendí a amar más a Dios y siempre los tendré presente, gracias Señor por esta bendición.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRAC</b>	<b>2</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>6</b>
2.1. Tankar ( <i>Berberis boliviana L.</i> )	6
2.1.1. Clasificación taxonómica	6
2.1.2. Características morfológicas	7
2.1.3. Descripción	7
2.1.4. Nombres comunes	7
2.1.5. Hábitat	8
2.1.6. Propagación	8
2.1.7. Distribución	8
2.2. Pigmentos	8
2.3. Compuestos Fenólicos	10
2.4. Flavonoides	11
2.4.1. Estructura química de los flavonoides	12
2.5. Antocianinas	13
2.5.1. Estructura de las antocianinas	15
2.6. Biosíntesis de las antocianinas	22
2.7. Estabilidad de las antocianinas	25
2.8. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas	26
2.8.1. Potencial de Hidrogeniones (pH)	26

2.8.2. Temperatura	28
2.8.3. Luz	29
2.8.4. Oxígeno	30
2.8.5. Ácido ascórbico	30
2.8.6. Metales	30
2.8.7. Azúcares	31
2.8.8. Dióxido de azufre	31
2.8.9. Reacciones enzimáticas	31
2.8.10. Sulfitado	32
2.9. Formas de estabilización de las antocianinas	32
2.9.1. Acilaciones	32
2.9.2. Polimerización	32
2.9.3. Copigmentación	33
2.10. Extracción de colorantes	34
2.10.1. Factores que determinan la extracción	34
a. Tamaño de partícula	34
b. Solvente	34
c. Temperatura	35
d. Agitación del Sistema	34
2.10.2. Métodos para extracción de colorantes	35
a. Destilación por arrastre de vapor	35
b. Lixiviación	35
c. Agitación mecánica	35
d. Extracción por cocción	36
2.10.3. Características del solvente	36

2.11. Antecedentes de extracción de antocianinas	36
2.12. Contenido de antocianinas por el método del pH diferencial	39
2.13. Espectrofotometría	42
2.14. Leyes fundamentales en los métodos de absorción	43
2.14.1. La ley de Lambert (o de Bouguer)	44
2.14.2. La ley de Beer (o de Bernard)	44
2.15. Espectro de absorción de las antocianinas por espectrofotometría UV-Vis	45
2.16. Usos de la antocianina	46
2.17. Potencialidad de las antocianinas	47
2.17.1. Actividad antioxidante de las antocianinas	47
2.17.2. Actividad biológica de las antocianinas	48
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>49</b>
3.1. Lugar de ejecución	49
3.2. Materia Prima	49
3.3. Materiales, reactivos y equipos	49
3.3.1. Materiales de ensayo	49
3.3.2. Reactivos	49
3.3.3. Equipos	50
3.4. Método	51
a. Cosecha	53
b. Recepción	53
c. Selección	53
d. Clasificación	53
e. Lavado	53
f. Análisis fisicoquímico	54

j. Extracción de la antocianina	54
h. Contenido de antocianinas	54
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>55</b>
4.1. Análisis fisicoquímico	55
4.2. Contenido de antocianinas	59
4.2.1. Análisis de varianza (ANOVA)	61
<b>V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>69</b>
5.1. Conclusiones	69
5.2. Recomendaciones	70
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>86</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Sustituyentes de las antociadinas	19
2	Antocianidinas diversas en la naturaleza y sus grupos sustituyentes	20
3	Composición antociánica de algunas frutas tropicales	21
4	Diversos solventes de extracción de antocianinas	37
5	Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/100g peso fresco)	40
6	Contenido de antocianinas totales en algunas frutas	40
7	Contenido de antocianinas totales en distintas especies vegetales	41
8	Colores de la luz visible	44
9	Resultado obtenido del análisis fisicoquímico del fruto de tankar ( <i>Berberis boliviana L.</i> )	55
10	Resultados de laboratorio de la cuantificación de antocianinas del fruto de tankar por el método del pH diferencial expresado en base húmeda	59
11	Análisis de Varianza (ANOVA) para la cantidad de antocianinas – Suma de Cuadrado Tipo I	61
12	TUKEY para ANTOCIANINAS por Tratamiento	63
13	TUKEY para el contenido de antocianinas por tiempo	63
14	TUKEY para el contenido de antocianinas por pH	64
15	TUKEY para el contenido de antocianinas por Temperatura	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides	13
2	Estructura química de algunos flavonoides	13
3	Estructura del catión flavilio.	16
4	Estructura de una antocianina	16
5	ejemplo de un mono glucósido y un di glucósido de la malvidina	17
6	Estructura de una antocianidina	19
7	Antocianidinas comunes en la naturaleza ordenadas por incremento en color rojo e incremento en color azul	20
8	estructura del Malvidin-3-(4-cumaril)-glucosido	22
9	Ruta General de biosíntesis de las antocianinas	24
10	Estructura de la antocianina a diferentes pH's	27
11	Espectro de absorción de cianidina-3-ramnoglucósido a distintos valores de pH	28
12	El espectro de la radiación visible	42
13	Representación de la absorción de un haz de luz atravesando una cubeta de tamaño <i>l</i>	46
14	Diagrama de flujo para realizar la extracción y cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial	52

## RESUMEN

El tankar (*Berberis boliviana L.*) es una planta nativa que crece a más de 33000 a 3800 m.s.n.m., su fruto es una pequeña baya comestible, de color morado intenso, con un alto potencial en contenido de antocianinas.

En el presente trabajo de investigación se realizó la extracción de antocianinas a partir del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), para ello se planteó tres parámetros tecnológicos como son tiempo, pH y temperatura; y se determinó el contenido del pigmento en estudio por el método del pH-diferencial, obteniendo como resultado un contenido máximo de  $1234.38 \pm 4.59$  mg/100g de antocianinas en base húmeda. Para este fin se ha utilizado un DCA (diseño completamente al azar) factorial y los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion Versión XVII.I, se determinó el análisis de varianza (ANOVA) y se pudo comprobar que los tres parámetros en estudio son estadísticamente significativos sobre la cantidad de antocianinas del fruto de tankar con un 95.0% de confiabilidad, también se realizó la Prueba Múltiple de Rangos mediante el TUKEY.

Concluyendo que los parámetros tecnológicos (tiempo, pH y temperatura) adecuados para la extracción de las antocianinas a partir del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) son para un tiempo de 24 horas, pH 4 y temperatura de 20°C, correspondientes al tratamiento 12.

Además se determinó el análisis fisicoquímico de este fruto teniendo como resultado, Humedad (%) 56.11; pH 3.01; Sólidos solubles totales (°Brix) 10.25; Acidez titulable (Expresado en ácido cítrico) 2.86; Índice de madurez (SST/acidez) 3.59.

## ABSTRAC

The tankar (Bolivian *Berberis L.*) is a native plant that grows to more than 33,000 at 3800 masl, its fruit is a small edible berry, deep purple, with a high potential in anthocyanins.

In the present research work was carried out the extraction of anthocyanins from the fruit of tankar (Bolivian *Berberis L.*), for it was raised three technological parameters such as time, pH and temperature, and determined the content of the pigment in study the pH-differential method, resulting in a maximum of  $1234.38 \pm 4.59$  mg/100 g wet basis anthocyanins. For this purpose we used a DCA (completely randomized design) factor and the data obtained were analyzed using the Statistical Package Version STATGRAPHICS Centurion XVI.I, we determined the analysis of variance (ANOVA) and it was found that the three parameters in statistically significant study on the amount of anthocyanins from the fruit of tankar with 95.0% reliability, we also performed Multiple Ranges Test by TUKEY.

Concluding that the technological parameters (time, pH and temperature) suitable for the extraction of anthocyanins from the fruit of tankar (*Berberis Bolivian L.*) are for a 24 hour time, pH 4 and 20 ° C for the treatment 12.

Also determined physicochemical analysis of this result with the result, Humidity (%) 56.11, pH 3.01, total soluble solids (° Brix) 10.25; titratable acidity (expressed as citric acid) 2.86; maturity index (TSS / acid) 3.59.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee una variada flora natural, la región de la sierra es quien presenta una mayor diversidad de especies nativas, presentándose algunos frutos comestibles que poseen diversas propiedades funcionales, sin embargo esta potencialidad natural no es aprovechada, debido a que en gran parte dichas plantas nativas no han sido estudiadas, y no existiendo aval científico que corrobore dichas propiedades. El tankar (*Berberis boliviana L.*) es una de ellas, este es una planta silvestre que crece en la sierra de nuestro país sobre los 3300 m.s.n.m. a 3800 m.s.n.m., su fruto es comestible con un considerable contenido de color rojo tinto intenso, actualmente no se realiza ningún tipo de recolección y almacenamiento. Los estudios sobre este fruto nativo son escasos. El problema principal de esta planta es que su fruto es estacional, su producción se centra en los meses de Marzo y Abril; no existe aún estudios que determinen una adecuada conservación de esta materia prima en los meses que no se encuentran.

De acuerdo a un estudio realizado por Del Carpio *et al.*, (2005); realizaron estudios con el objeto de caracterizar los componentes antociánicos presentes en el colorante de los frutos *Berberis boliviana L.*; se determinó la presencia de antocianinas y antioxidantes en este fruto, es por ello que la intención de esta investigación es determinar la cantidad de antocianinas que tiene este fruto, contribuyendo al incremento de la lista de los colorantes naturales.

La materia prima solo se tiene a disposición en los meses en mención, por ello una alternativa es la recolección de la cantidad requerida para la investigación y su posterior almacenamiento en congelación. La investigación que se está proponiendo es la extracción de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) mediante la

utilización de un solvente acidificado. El contenido de antocianinas se determinará por el método de pH-diferencial.

La importancia de estudiar la antocianina de este fruto nativo radica en la tendencia que tiene el mercado nacional e internacional, de buscar fuentes naturales de colorantes para uso alimentario, y así poder reemplazar los colorantes sintéticos; pues se han realizado estudios llegándose a determinar que estos últimos son cancerígenos. Además la necesidad de utilizar colorantes naturales por ser considerados como generalmente seguros (GRASS), y aprovechar la potencialidad de este fruto nativo. A partir de dicho estudio los pobladores de las zonas donde crece este fruto nativo valorarán más y realizarán recolección del fruto para venderlos y así mejorar su condición económica.

## OBJETIVOS

### a. Objetivo general

- Extraer antocianinas a partir del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) y determinar el contenido por el método de pH-diferencial.

### b. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros tecnológicos (tiempo, pH y temperatura) adecuados para la extracción de las antocianinas a partir del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*)
- Determinar la concentración de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) por el método de pH-diferencial en función de los parámetros en estudio.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Tankar (*Berberis boliviana* L.)

El tankar (*Berberis boliviana* vLechler) es una especie vegetal silvestre del Perú, pertenece a la familia Berberidaceae, su fruto es una pequeña baya comestible de color morado, crece especialmente alrededor de los campos de cultivo a maneras de protección, grandes y filudas, sus flores son amarillas. Existen información sobre dicha especie en Perú desde tiempos de la conquista, especialmente el cronista Bernabé Cobo describió a esta planta con el nombre común de quisca – quisca, que significa planta espinosa. Un análisis preliminar del pigmento determino la presencia de antocianinas. Estos pigmentos fueron consumidos por los hombres a lo largo de incontables generaciones sin causar ningún efecto tóxico (Del Carpio *et al.*, 2005).

Los frutos de tankar están disponibles en los meses de marzo y abril de cada año, presentan un intenso color morado oscuro.

#### 2.1.1. Clasificación taxonómica

Del Carpio *et al.* (2005), realizó una clasificación taxonómica, de acuerdo al Sistema de Judd, Campbell, Kellogg y Stevens, 1 999:

División	:Magnoliophyta (Angiosperms)
Clase	:Magnoliopsida (Tricolpates- Eudicots)
Sub Clase	: Magnoliidae (Magnoliid- Complex)
Orden	: Ranunculales
Familia	: Berberidaceae
Género	: Berberis
Especie	: <i>Berberis boliviana</i> Lechler

### **2.1.2. Características morfológicas**

El tankar es una planta herbácea, arbustiva inermes y espinosas, con rizomas arrastrados y gruesos, plantas vivaces con hojas simples o compuestas, flores hermafroditas, solitarias o en racimo, ramas erectas acanaladas provistas de espinas (Dueñas, 1992).

### **2.1.3. Descripción**

Dueñas (1992), realizó una descripción de la planta de tankar como se detalla a continuación:

- Presenta hojas de 12 mm de longitud y 5 mm de ancho, reticuladas, venación sobre ambos lados, de una coloración verde.
- Flores amarillas pequeñas, hermafroditas, sus miembros ordenados cíclicamente.
- Fruto, viene a ser una baya o cápsula con una o varias semillas. Presenta una forma globulosa, de tamaño pequeño y una coloración que varía entre rojo y azul morado.
- Semillas, pueden ser una o varias, protegidas por un endospermo carnoso y duro.
- Las espinas miden entre de 2 a 8 mm.
- Pueden alcanzar de 1 a 2 metros de altura.

Las plantas de las cuales se recolectaron los frutos de tankar para la presente investigación alcanzan entre 1 a 4 metros de altura.

### **2.1.4. Nombres comunes**

En el sur de nuestro país, esta planta se conoce como “Tankar”, “Cheqche”, “Qeswacheqche”, “Agracejo peruano”, “Ailampo”, “Uva – uva”, “Quisca – quisca”.

### **2.1.5. Hábitat**

El tankar es una planta que crece entre matorrales de alturas, en climas fríos (Dueñas, 1992).

La altitud en el cual crece y se desarrolla el tankar, esta aproximadamente entre 3300 a 3800 msnm.

### **2.1.6. Distribución**

Según, Dueñas (1992); el genero *Berberis boliviana L.* se encuentra en América Central y a lo largo de los Andes hasta el extremo sur de Sudamérica. Teniendo la siguiente distribución:

- Mundo : 175 especies
- Perú : 32 especies

### **2.1.7. Propagación**

La propagación de dicha planta se realiza mediante reproducción vegetativa y por semillas (Dueñas, 1992).

## **2.2. Pigmentos**

Los pigmentos son sustancias de origen natural o sintético, los pigmentos naturales se encuentran en las células y los tejidos de plantas y animales, las cuales imparten color (Fennema, 1996).

Un pigmento natural en sistemas biológicos es aquel que es sintetizado y acumulado o excretado de células vivientes. Por esta razón, una definición más amplia de un colorante natural es dada como un “pigmento formado en células vivientes o muertas de plantas, animales, hongos o microorganismos, incluyendo compuestos orgánicos

aislados de células y estructuras modificadas para alterar la estabilidad, solubilidad o intensidad del color” (Hendry, 1992).

Los pigmentos pueden tener propiedades, como por ejemplo, ser receptores de energía, transportadores de oxígeno o protectores contra las radiaciones. Es obvio que el color de un alimento se debe a los pigmentos naturales existentes en el mismo. Por tanto, para conseguir la aceptabilidad y el color deseado, es esencial conocer los pigmentos en cuestión (Francis, 1993).

Como ejemplos de pigmentos en tejidos de animales y plantas se encuentran:

- Compuestos hemo: Responsables del color de la carne.
- Clorofila: Pigmentos en plantas, algas y bacterias fotosintéticas.
- Carotenoides: Pigmentos cuyo color van del amarillo al anaranjado, sintetizados por algas y plantas.
- Betalainas: Presentan colores del rojo al amarillo, debido a que contienen betacianinas (color rojo) y betaxantinas (color amarillo), sintetizados por una amina primaria o secundaria y el ácido betalámico.
- Antocianinas: Responsables de brindar colores tales como el azul, violeta, magenta, rojo y naranja en plantas.

Según, Delgado *et al*, (2000); los pigmentos pueden ser clasificados tomando en cuenta alguna de sus características, como se menciona a continuación:

- Origen: pueden ser naturales o sintéticos, los pigmentos naturales son producidos por organismos vivos, mientras que los sintéticos son producidos en el laboratorio.

- Estructura química del cromóforo: el cromóforo puede tener sistemas conjugados como los Carotenoides, las antocianinas y las betalainas, entre otros.
- Estructura de los pigmentos naturales: encontramos a los derivados del tetrapirrol (clorofilas), los derivados de los isoprenoides (Carotenoides), compuestos N-heterocíclicos (betalainas), derivados del benzopirano (antocianinas) y quinonas (benzoquinonas).
- Como aditivos de alimentarios: pueden ser certificados y no certificados según la FDA (Fennema, 1996).

Desde tiempos prehistóricos hasta la mitad del siglo XIX, el teñido fue hecho con colorantes naturales. La importancia de estos disminuyó cuando en 1856 el inglés William Henry Perkin, en su intento de sintetizar la quinina, oxidó sulfato de anilina con dicromato potásico y produjo el primer colorante sintético, la mauveína, de color purpura. Posteriormente, los químicos alemanes, perfeccionaron los colorantes derivados del alquitrán de hulla hasta tal punto que empresas de colorantes vegetales, se arruinaron totalmente antes de que finalizara el siglo XIX (Lock, 1997).

Un incremento en la tendencia de la Industria Alimentaria es hacia el reemplazo de colorantes sintéticos por pigmentos naturales (Schnetzler *et al*, 1994).

Hay un interés en el mundo entero en el desarrollo de colorantes alimenticios de fuentes naturales (Francis, 1987; Lauro, 1991).

### **2.3. Compuestos Fenólicos**

Los compuestos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grupos: los ácido fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los flavonoides

tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los pigmentos fenólicos reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, como los flavonoides y las antocianinas, o entre sí para formar polímeros, como los taninos (Badui, 2006).

Los compuestos fenólicos abarcan un amplio rango de compuestos con su respectivo anillo, su sustituyente hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Entre los compuestos fenólicos naturales, de los cuales aproximadamente 8000 son conocidos por estar presentes en las plantas, los flavonoides y sus parientes forman el grupo más grande con más de 5000 estructuras conocidas (Harborne, 1986).

Solamente una pequeña familia de polifenoles son considerados a ser importantes en los alimentos. Ellos son los ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico y sus derivados, y los flavonoides comunes y sus glucósidos. Las antocianinas y los flavonoles son pigmentos importantes en una variedad de frutas y vegetales (Pierpoint, 1983).

Los compuestos fenólicos son considerados como un grupo de compuestos que contribuyen a la actividad antioxidante de las frutas y vegetales (Scalver *et al*, 2005).

#### **2.4. Flavonoides**

Los flavonoides constituyen uno de los grupos más distintivos de metabolitos secundarios en plantas superiores. La palabra flavonoide proviene del latín flavus, "amarillo", es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 moléculas de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides". Todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que les son adicionados, en 6 clases

principales: las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas y los taninos condensados (Winkel, 2001), más una séptima clase, las auronas, tomadas en cuenta por algunos autores, por estar presentes en una cantidad considerable de plantas.

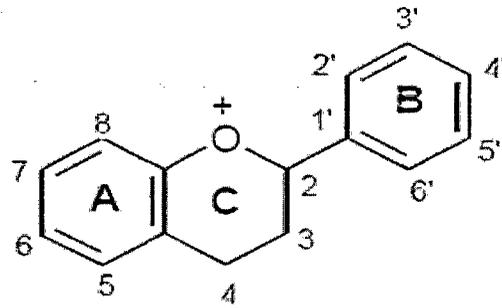
#### **2.4.1. Estructura química de los flavonoides**

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6-C_3-C_6$ ), compuesto por dos anillos fenil (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Figura 1). Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Kühnau, 1976).

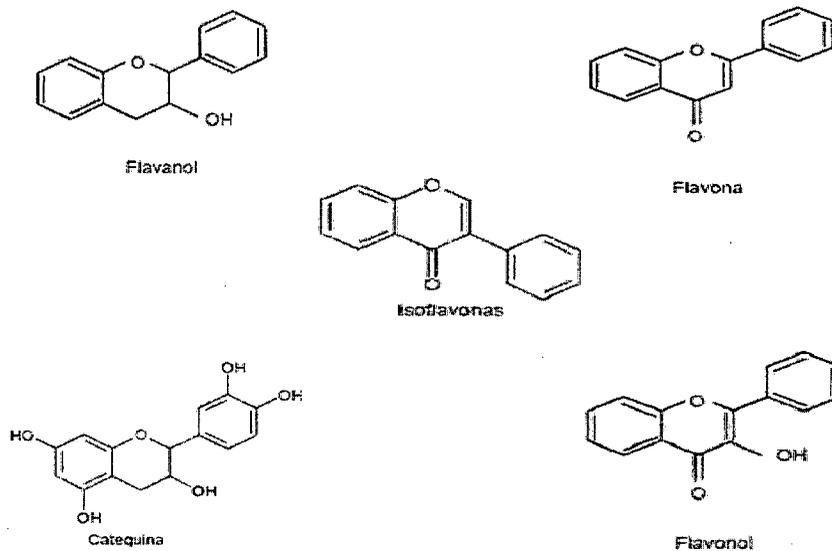
Los compuestos individuales dentro de cada clase son también distinguidos por el número de hidroxilos, metoxilos y otros grupos sustituidos en los dos anillos bencénicos (A y B) (Harborne *et al*, 1988).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Borset *al*, 1990).

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición  $C_3$  y con menor frecuencia al  $C_7$  del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico.



**Figura 1.** Estructura química del esqueleto básico de los flavonoides (Shahidi y Naczk, 1995).



**Figura 2.** Estructura química de algunos flavonoides (Shahidi y Naczk, 1995).

## 2.5. Antocianinas

Las antocianinas (del griego anthos: flor y kyanos: azul), son el grupo más importante de pigmentos solubles en agua, visibles para el ojo humano (Harbone, 1976). Forman parte de la familia de los polifenoles, es decir constituyen una sub clase y se definen como flavonoides fenólicos (Mazza, 1995). Son los responsables de las coloraciones rojiza y azulada encontradas en plantas (Andersen, 2000). Mientras Coultate (1984),

menciona que los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos.

Al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como antocianidinas, se trata de flavanoides, que son derivadas del núcleo flavano (Coultate, 1984).

Las antocianinas son un grupo importante y extenso de pigmentos, las cuales aunque la mayoría claramente vistas en flores y frutas, pueden ser también encontradas en la epidermis de las hojas (Delpech, 2000). Por su parte Gross (1987), menciona que las antocianinas se localizan principalmente en la piel de frutas como manzanas, peras, uvas, zarzamoras, ciruelas, de flores como la jamaica, rosas y verduras como col morada y cebolla morada. La diferencia de color entre las frutas, flores y verduras depende de la naturaleza y concentración de antocianinas.

Wagner (1982), menciona que las antocianinas se encuentran en las vacuolas y en los organelos esféricos denominados antocianoplastos. Dentro de las funciones de las antocianinas se encuentran:

- La atracción visual de los animales con el fin de llevar a cabo la polinización y la dispersión de semillas.
- La posible función en hojas tiernas de la filtración o recepción de la luz, o como respuesta a algún tipo de estrés (Hrazdina, 1982).
- Las antocianinas funcionan como una pantalla de protección a los rayos UV, ya que son producidos en respuesta a la exposición de la planta a radiación UV, protegiendo su DNA del daño del sol.
- Por su desagradable sabor ahuyentan a los depredadores de las plantas.

El término antocianina fue utilizado por Marquart en 1835 para designar el pigmento azul de las flores. Después se notó que no sólo era el color azul, sino también el púrpura, violeta, magenta y casi todos los tonos rojos que aparecen en muchas flores, frutos, algunas hojas, tallos y raíces (Bridle *et al.*, 1997).

En 1913, Willstätter y Everest propusieron que el término antocianina se aplicara para el glicósido y el de antocianina para la aglicona. Ellos también reconocieron la naturaleza oxonio de estos compuestos por lo que utilizaron un medio ácido para su extracción, venciendo así las dificultades de su extracción en solventes neutros (Willstätter *et al.*, 1913).

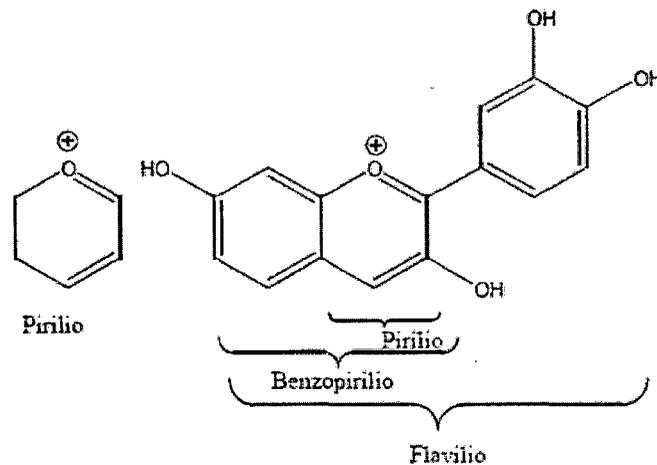
### **2.5.1. Estructura de las antocianinas**

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, tienen el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro (Swain, T. 1986).

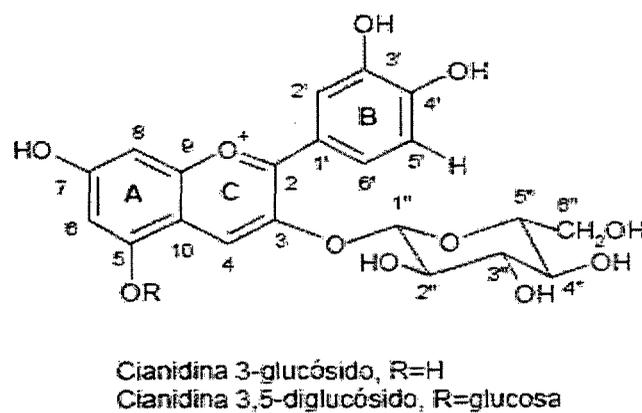
Como las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, su estructura química está formada por un esqueleto que contiene quince carbonos ( $C_6 - C_3 - C_6$ ), ordenados en dos anillos aromáticos (anillo A y anillo B) unidos por un tercer anillo que consta de tres carbonos y un oxígeno (O) (Ávalos *et al.*, 2009). Específicamente, la estructura de las antocianinas la constituye el 2-fenilbenzopirilo, también conocido como ion flavilio, consta del primer anillo bencénico ligado al pirilo que forman un benzopirilo, el grupo benzopirilo está ligado con un segundo anillo bencénico, la unión y formación de esta estructura se denomina flavilio (más exactamente catión flavilio) (Figura 3) (Castañeda *et al.*, 2009; Garzón, 2008; Mercadante *et al.*, 2008; Quintero, 2004).

En términos generales, se ha observado que las antocianinas están constituidas por dos o tres partes (Figura 4): La primera una antocianidina o aglucón, la segunda una o varias

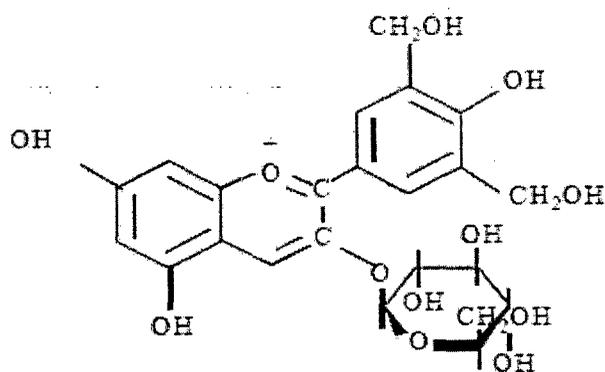
moléculas de carbohidratos (especialmente monosacáridos) unida a un aglucón por medio de un enlace  $\beta$ -glicosídico (usualmente ocurre en las posiciones 3, algunas veces en las posiciones 3 y 5 y ocasionalmente en la 3 y 7) y la tercera un grupo acilado como los grupos hidroxilo (OH), metoxilo (O-CH<sub>3</sub>) o varios ácidos orgánicos; es decir, que las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas (Castañeda *et al.*, 2009; Garzón, 2008; Mercadante y Bobbio, 2008; Quintero, 2004).



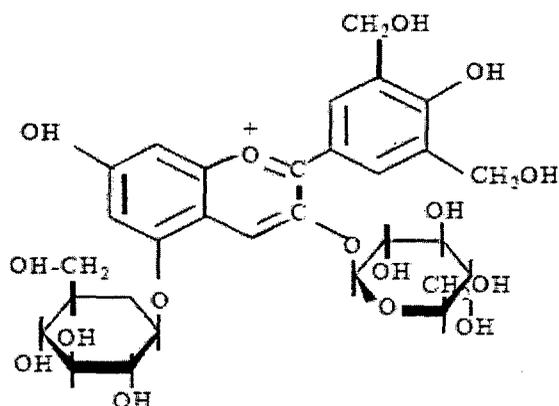
**Figura 3.** Estructura del catión flavilio.



**Figura 4.** Estructura de una antocianina (Walford, 1980).



(1)



(2)

**Figura 5.** (1) Ejemplo de un monoglucósido y (2) un diglucósido de la malvidina, (Brouillard, 1982) (Timberlake y Bridle, 1982).

Hoy en día se han identificado en la naturaleza cerca de 540 pigmentos antociánicos (Del Valle *et al.*, 2005). Existen 17 tipos de agliconas en la naturaleza (Ming *et al.*, 2003), se han identificado 23 grupos (Andersen *et al.*, 2006); sin embargo, sólo 6 son comunes en las plantas superiores (Prior, 2004).

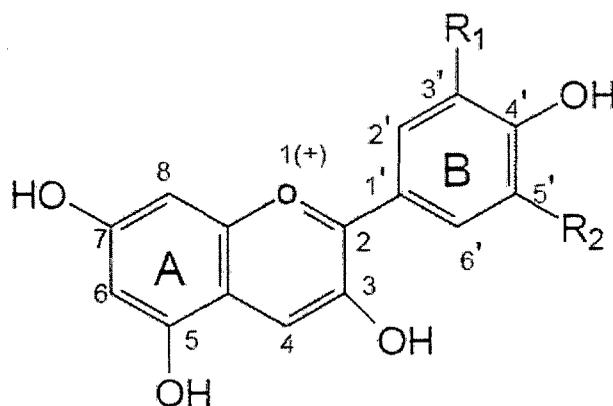
El tono y el matiz de los colores desplegados por las antocianinas dependerán del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo en el ion flavilio. Los incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que los incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Quintero, 2004; Garzón, 2008).

Las variaciones estructurales que se presentan en el anillo B, como el número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de azúcares ligados a la molécula, la posición de éstos y la naturaleza y número de ácidos alifáticos o aromáticos enlazados a los azúcares en la molécula, son las que dan origen a las antocianidinas más abundantes en la naturaleza, las cuales son pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina, que se encuentran en más de 90% de las antocianinas aisladas (Clifford, 2000). Ya que cada aglicona puede estar glicosilada y asilada por diferentes azúcares y ácidos cinámicos y alifáticos, se ha reportado en diversos estudios que la combinación de las moléculas origina entre 400 y 539 antocianinas diferentes; de las cuales 50% se basa en cianidina, 12% en pelargonidina, 12% en delphinidina, 7% en petunidina y 7% en malvidina; en cuanto a la asociación con el glucósido, los más comunes son: 3-monósidos, 3-biósidios, 3,5-diglucósidos y 3,7-diglucósidos. Los 3-glucósidos ocurren 2,5 veces más que los 3,5-diglucósidos, por lo tanto, la antocianina más distribuida en la naturaleza es la cianidina 3-glucósido (Ming *et al.*, 2003).

La antocianidina está unida a una o varias moléculas de azúcar, esta puede ser monosacáridos como la glucosa, galactosa ramnosa, arabinosa, etc.; disacáridos como la xilosa, rutinosa, sambubiosa, genciobiosa y soforosa, entre otros (Fennema, 1985).

Las antocianinas pueden clasificar en base a la cantidad de moléculas de azúcar que contiene, se divide en varios tipos: los monósidos (monosacáridos) sólo tienen una molécula de azúcar, generalmente en posición 3, rara vez en las posiciones 5 ó 7 y nunca en otras posiciones; los bióxidos (disacáridos) contienen 2 azúcares, ambos en posición 3, o uno en 3 y el otro en 5 y muy pocas veces en 3 y en 7; los trióxidos (trisacáridos) contienen 3 azúcares, generalmente dos en la posición 3 y uno en la posición 5, con frecuencia tres en una estructura ramificada o lineal en la posición 3 o en algún caso, con dos en la posición 3 y uno en la posición 7 (Fennema, 2000).

Los monosacáridos comúnmente encontrados son D-glucosa, D-galactosa, L-Ramnosa, D-arabinosa y D-Xilosa, aunque también pueden contener oligo sacáridos como gentobiosa, rutinosa y soforosa. El grupo hidroxilo de la posición 3 siempre se encuentra glicosilado en las antocianinas, y esto les da cierta estabilidad y solubilidad (Walford, 1980). Es común que una misma antocianidina interactúe con más de una clase de carbohidrato para formar diferentes antocianinas (Badui, 1988).

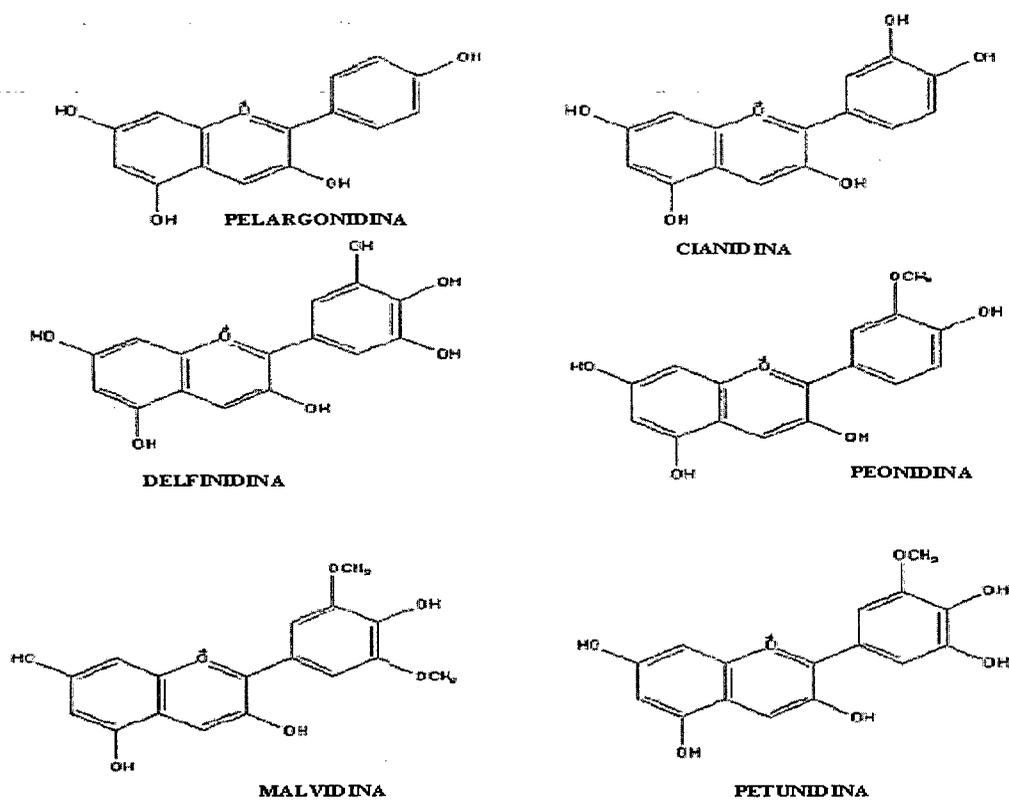


**Figura 6.** Estructura de una antocianidina (Rodríguez *et al*, 2001).

**Cuadro 1.** Sustituyentes de las principales antocianidinas

Aglicona	Sustitución		Espectro visible $\lambda_{max}$ . (nm)
	R1	R2	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

**Fuente:**(Rodríguez *et al*, 2001).



**Figura 7.** Antocianidinas comunes en la naturaleza ordenadas por incremento en color rojo e incremento en color azul (Fennema, 1996).

**Cuadro 2.** Antocianidinas diversas en la naturaleza ysus grupos sustituyentes

ANTOCIANIDINAS	3	5	6	7	3'	5'
Apigenidina	H	OH	H	OH	H	H
Luteolinidina	H	OH	H	OH	OH	H
Tricitinidina	H	OH	H	OH	OH	OH
Pelargonidina	OH	OH	OH	OH	H	H
Aurantidinina	OH	OH	H	OH	H	H
Cianidina	OH	OH	H	OH	OH	H
Peonidina	OH	OH	H	OH	OMe	H
Rosinidina	OH	OH	H	OMe	OMe	H
Delfinidina	OH	OH	H	OH	OH	OH
Petunidina	OH	OH	H	OH	OMe	OH
Pulchelidina	OH	OMe	H	OH	OH	H
Europinidina	OH	OMe	H	OH	OMe	OH
Malvidina	OH	OH	H	OH	OMe	OMe
Hirsutidina	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe
Capensinidina	OH	OMe	H	OH	Ome	OMe

**Fuente:**(Mazza, 2001)

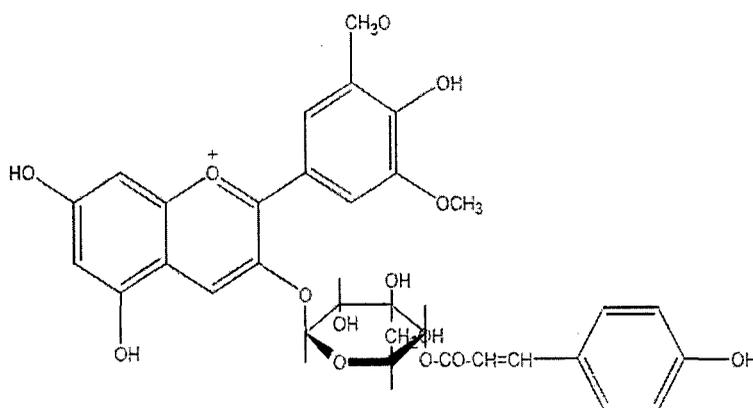
**Cuadro 3.** Composición antociánica de algunas frutas tropicales

Nombre Común	Nombre Científico	Antocianina
Uva caimaroná	<i>Pouroumacecropiifolia</i>	Dp-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido Cy-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido Cy-3-O- $\alpha$ -(malonil) glucopiranosido
Acerola	<i>Malphigiaemarginata</i>	Cy-3-ramnósido, Pn-3-ramnósido
Jambolao	<i>Syzgiumcumini</i>	Dp-3-galactópiranosido, Pt-3-Galactopiranosido Dp-3-(6''-acetil) galactópiranosido
Jussara	<i>Euterpe edulis</i>	Pt-3-(6''-acetil) galactópiranosido, Dp-3-(6''-acetil) glucósido, Pt-3-(6'' succinil) ramnósido, Pn-3-(6'' succinil) ramnosido
Guajiru	<i>Chrysobalanusicaco</i>	Dp-3-5, diglucósido, Cy-diglucósido, Pt-diglucósido, Pn-diglucósido, Mv-diglucósido-3-sambubiósido, Cy-3-glucósido, Cy-3-rutinósido, Pg-3-glucósido, Pg-3-rutinósido, Cy-3-ramnósido.
Bacuacu	<i>Eugenia umbelliflora</i>	Dp-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido, Cy-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido, Pt-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido, Pg-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido, Pn-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido, Mv-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido
Manzana estrella	<i>Chrysophyllum Cainito</i>	Cy-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido Cy-O- $\alpha$ -glucopiranosido
Surinam cherry	<i>Eugenia uniflora</i>	Cy-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido
Jaboticaba	<i>Myrciariacauliflora</i>	Dp-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido
Mango	<i>Mangifera indica</i>	Cy-diglucósido, Pt-diglucósido, Pn-diglucósido
Chirimoya	<i>AnnonacherimoliaMill.</i>	Cy-3-O- $\alpha$ -glucopiranosido
Zapote	<i>Calocarpumzapota</i>	Pg-3-glucósido, Pg-3-rutinósido, Cy-3-ramnósido
Corozo	<i>Bactrizguineensis</i>	Cy-3-sambubiósido, Cy-3-glucósido, Cy-3-rutinósido, Pn-3-glucósido, Pn-3-rutinósido, Cy-3-(6-O-malonil) glucósido

**Fuente:** (Barrioset *al*, 2010; Kuskoski *et al*, 2003; Einbond *et al*, 2004; Osorio *et al*, 2010).

Los glicósidos a veces se desarrollan de forma más compleja, entre las cuales tienen especial interés los acilados. En ellos la misma molécula de azúcar que esterifica la aglicona es a su vez esterificada por un ácido orgánico, frecuentemente un ácido

hidroxicinámico como el ácido p-hidroxicinámico (pcumárico) (figura 9), ácido caféico y el ferúlico, y otros como el ácido clorogénico, etc. (Harborne, 1986; Hrazdina, 1982). Las últimas investigaciones en este campo señalan que en la naturaleza existen también pigmentos antociánicos acilados con otros ácidos alifáticos dicarboxílicos, tales como malónico, málicos y succínico (Harborne, 1986; Takeda *et al*, 1986 y Terahara *et al*, 1986).



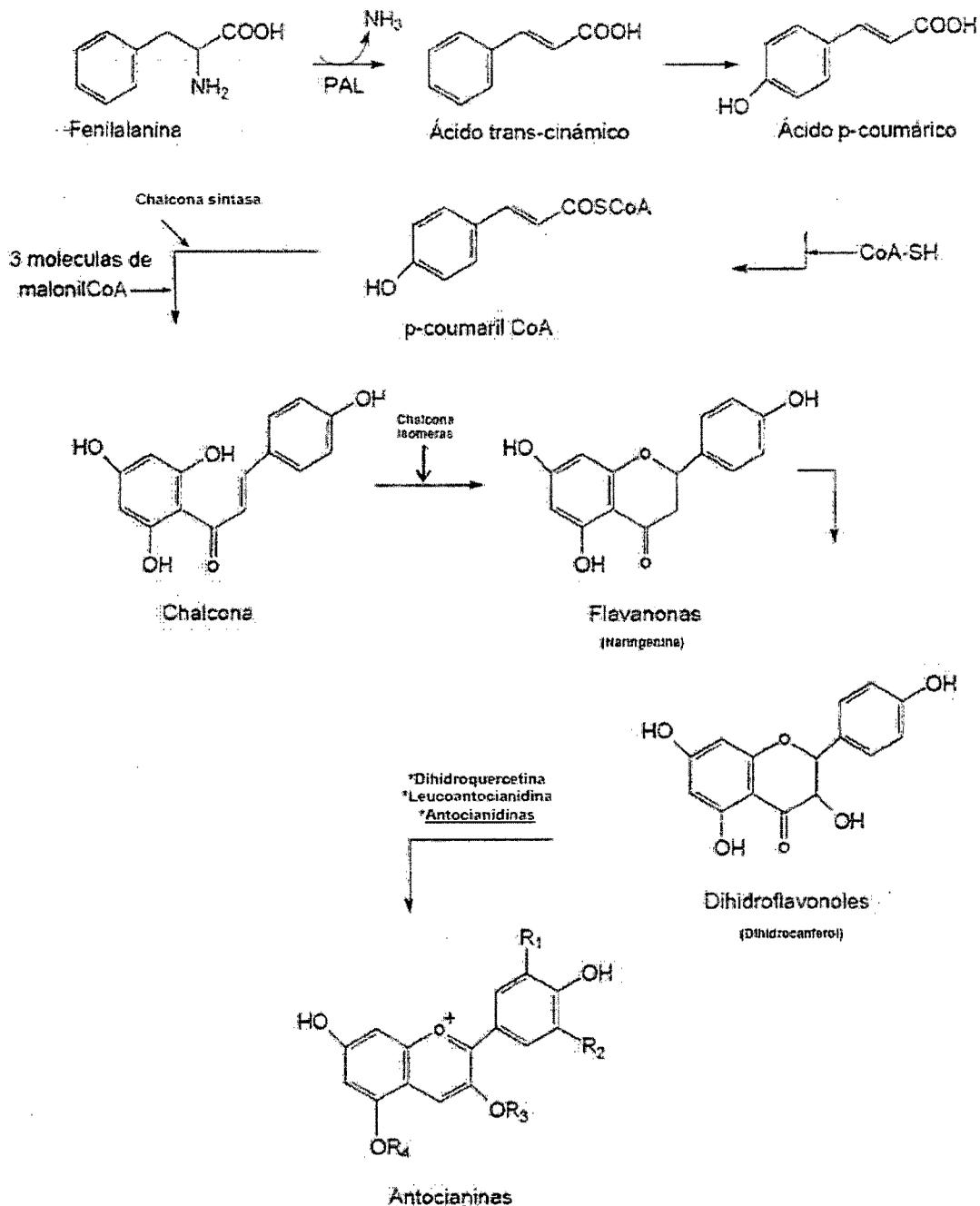
**Figura 8.** Estructura del Malvidin-3-(4-cumaril)-glucósido

## 2.6. Biosíntesis de las antocianinas

Las antocianinas se sintetizan a partir de la condensación de dos moléculas precursoras: malonil CoA y p-cumaril-CoA, las que más tarde formarán anillos A y B respectivamente. (Cuevas *et al*, 2008)

Davies (2009) indica que la biosíntesis de compuestos fenólicos ha sido la ruta metabólica más estudiada; en diversas fuentes (Raghvendra, 2011; Ávalos *et al*, 2009; Garzón, 2008; Hernández, 2003) se ha señalado que estos compuestos se forman a partir de dos rutas de biosíntesis: la ruta del *ácido malónico* (ocurre principalmente en hongos, bacterias y en algunas plantas superiores) y la *ruta del ácido shikímico* (frecuente en las plantas superiores).

En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples (por medio de diversas reacciones) derivados de la glicólisis, de la ruta de las pentosas fosfato y ciclo de Calvin en diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-coumárico, cafeico, ferúlico, clorogénico, triptófano, tirosina, y fenilalanina. Posteriormente, como se muestra en la Figura 10, la fenilalanina sufre un proceso de desaminación (es decir, que pierde un  $\text{NH}_3$ ) inducido por la enzima fenilalanina amonioliasa (PAL); después de este proceso, se adhieren hidroxilos y otros grupos sustituyentes a lo que quedó de la molécula de fenilalanina, dando origen a diversos ácidos orgánicos como el cinámico, p-cumárico, caféico, ferúlico, entre otros, que son precursores de los compuestos fenólicos; en el caso específico de la ruta de biosíntesis de las antocianinas, se da origen al ácido p-cumárico, este ácido, se adiciona la CoA-SH formando así el p-cumaril-CoA, que inmediatamente y en conjunto con la enzima chalcona sintasa participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona (naringenina) en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Dicha flavonona puede dar origen a dihidroflavonoles, dihidroquercetinas, leucoantocianidinas y antocianidinas, que son el resultado de una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. Finalmente, en la síntesis de las antocianinas se dan las acilaciones y las glicosilaciones (Gross, 1987), la molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo, reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posteriormente posibles reacciones de metilación de los hidroxilos (Davies, 2009). Cabe resaltar que esta ruta sintética también es compartida por otros compuestos fenólicos (Cuevas *et al*, 2008).



**Figura 9.** Ruta General de biosíntesis de las antocianinas (Delgado *et al.*, 2000).

La fenilalanina amonio liasa (PAL), primera enzima en la ruta, juega un papel central en dirigir la síntesis hacia metabolitos secundarios y por ello ha sido extensamente estudiada. Un estudio realizado por Aoki *et al.* (1985), demostró que la actividad PAL en frutos de fresa maduros es mucho mayor que en frutos verdes. Así, se encontró una

correlación muy estrecha entre la actividad de PAL y la concentración de antocianinas, que se incrementa durante la maduración (Hyodo, 1971).

## **2.7. Estabilidad de las antocianinas**

Las antocianinas son sustancias relativamente inestables, teniendo un comportamiento aceptable únicamente en medio ácido (Wesche *et al.*, 1990). El núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina es deficiente en electrones y, por tanto, muy reactivo. Las reacciones ordinariamente comprenden la decoloración de los pigmentos (Fennema, 1993). Son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentran (Wrolstad, 2000, Delgado *et al.*, 2003). Cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, sean recubiertas por una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables (Badui, 1999).

Lock (1997); menciona que las antocianinas tienen una inestabilidad inherente. Un conocimiento de los factores involucrados en su inestabilidad y mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y purificación de las antocianinas, y su uso como colorante de alimentos, además menciona que se han desarrollado estudios sobre la antocianina y se ha demostrado que:

- Las antocianidinas son menos estables que las antocianinas, y menos solubles en agua.
- En presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina-3-glicosidas es a pH 1,8 a 2,0; mientras que para las antocianidina-3,5-diglicosidas lo es a pH a 4,0 – 5,0.

- Las antocianinas son generalmente inestables cuando se exponen a la luz UV o a la luz visible, siendo algunas más afectadas que otras.

## 2.8. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

La estabilidad del color de las antocianinas depende de factores como el pH, temperatura, luz, oxígeno, metales, azúcares, ácido ascórbico, dióxido de azufre, degradación enzimática y no enzimática (Wesche *et al.*, 1990).

### 2.8.1. Potencial de Hidrogeniones (pH)

Uno de los principales factores que afecta la estabilidad del color de las antocianinas es el pH (Chandra *et al.*, 1992; Wesche *et al.*, 1990). Las antocianinas son muy sensibles a los cambios de pH (Wong, 1995). Este parámetro es uno de los principales factores que hace que la molécula pueda mantener su color.

Las antocianinas no aciladas y las mono aciladas se comportan como indicadores de pH, ya que se presentan en un color rojo a pH bajo, azul a pH intermedios e incoloros a pH alto (Brouillard, 1982).

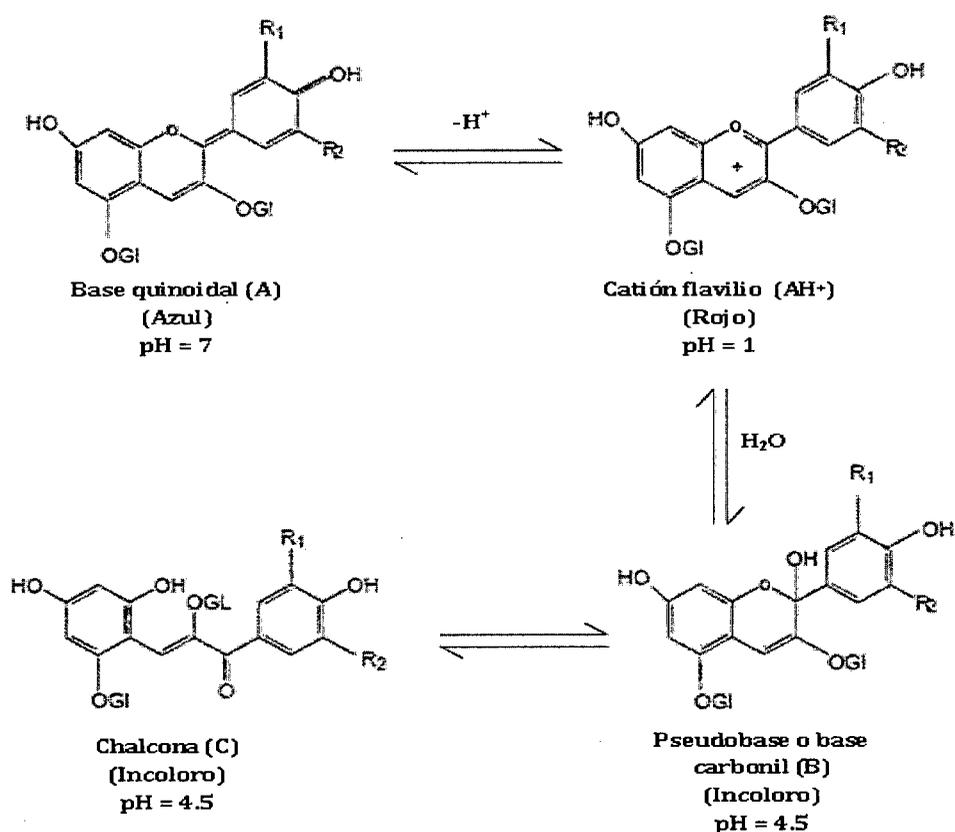
En condiciones ácidas se conserva un color intenso de la antocianina (Chandra *et al.*, 1992). Por otro lado en una solución ácida, coexisten cuatro especies en equilibrio: la base quinoidal (A), el catión flavilio (AH<sup>+</sup>), la pseudobase o carbinol (B), y la chalcona (C). La interconversión entre estas estructuras se presenta de la siguiente manera (figura 10) (Fennema, 1996).

En soluciones muy ácidas (pH 0.5) el catión flavilio, de color rojo, es la única que se encuentra en solución (Wong, 1995). Conforme el pH incrementa, la distribución electrónica se modifica (Badui, 1999), ocurriendo una pérdida de protón y adición de agua en la posición 2 (Hutchings, 1999), obteniendo la forma quinoidal azul (A) o base

anhidra. Las proporciones del catión flavilio, la forma quinoidal y la chalcona varían con el pH y con la estructura de la antocianina (Fennema, 1996).

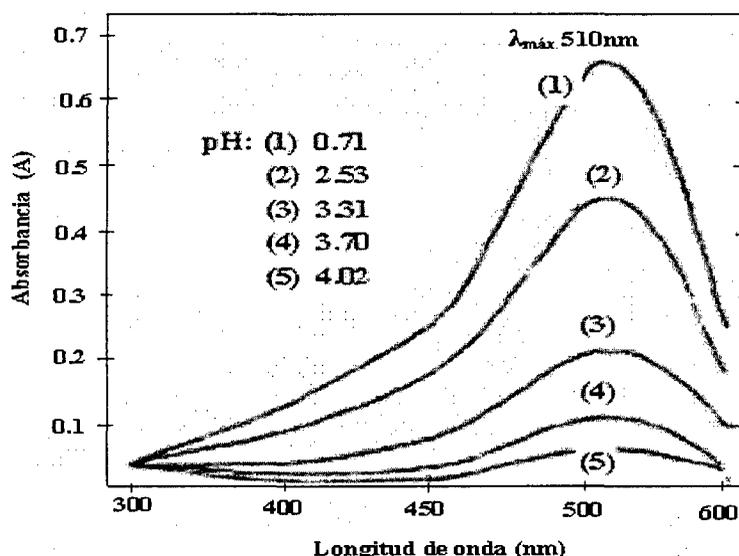
Entre el pH 4 y 5.5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazará a las formas incoloras. Por lo tanto, la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable (Chandra *et al.*, 1992; Wesche *et al.*, 1990).

La acidificación con ácidos fuertes como el HCl sirve para mantener un pH bajo. Este puede, sin embargo, alterar la forma nativa del complejo de pigmentos (Moore *et al.*, 1982).



**Figura 10.** Estructura de la antocianina a diferentes pH's (Fennema, 1996).

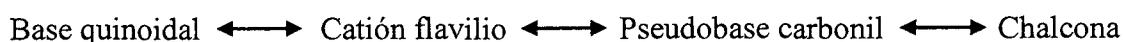
La pérdida de color a medida que el pH aumenta, puede ser monitoreada midiendo el espectro de absorción del pigmento con un espectrofotómetro. En la figura 11, se observa una disminución en el pico a 510nm a medida que el pH aumenta, lo que indica que hay una pérdida del color rojo, existiendo un equilibrio entre las dos formas de la antocianina (catión flavilio y base carbinol).



**Figura 11.** Espectro de la cianidina-3-ramnoglucósido a distintos valores de pH (Francis, 1989).

### 2.8.2. Temperatura

La antocianina es destruida por el calor durante el procesamiento y almacenamiento. Un incremento logarítmico en la destrucción de la antocianina ocurre con un incremento en la temperatura (Cuevas *et al.*, 2008, Markakis, 1982). Timberlake *et al.*, (1982) observó que el equilibrio entre las estructuras es endotérmico, en una dirección de izquierda a derecha:



El aumento de la temperatura produce la pérdida de una molécula de azúcar en la posición 3 y como consecuencia la ruptura del anillo y como efecto la formación de chalconas incoloras (Garzón, 2008, Timberlake, 1980).

Los tratamientos térmicos influyen significativamente en la destrucción de las antocianinas. Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumenta la temperatura se acelera la decoloración de la fruta, ya que se favorece tanto la extracción que incluso se puede llegar a obtener productos prácticamente incoloros (Badui, 1999). Al incrementar la temperatura, el equilibrio se desplaza hacia la formación de la chalcona. Al disminuir la temperatura, la base quinoidal y el carbinol se transforman rápidamente en forma de catión flavilio, pero el cambio de la chalcona es muy lento (García *et al*, 1998). Toma 6 a 7 horas a la chalcona de los 3-glucósidos para alcanzar el equilibrio con el catión flavilio a 25°C (Mazza y Brouillard, 1987).

### **2.8.3. Luz**

La luz acelera el proceso de degradación de las antocianinas. Aquellas que presentan una sustitución en el hidroxilo del carbón 5 son más susceptibles a la foto degradación. Sin embargo la copigmentación puede retrasar la foto degradación (Delgado *et al*, 2000).

Las antocianinas son generalmente inestables cuando son expuestas a luz UV o visible (Jackman *et al*, 1992; Palamadis *et al*, 1975). Las antocianinas sustituidas en el grupo hidroxilo del C-5, las cuales son conocidas a presentar fluorescencia, son más susceptibles a la descomposición fotoquímica (Jackman *et al*, 1992).

#### **2.8.4. Oxígeno**

El oxígeno tiene un efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas. Esto es debido a que la presencia del oxígeno molecular hace muy susceptible a la molécula de la antocianina (Wesche *et al*, 1990). El oxígeno ha sido mencionados como uno de los agentes acelerantes más específicos en la destrucción de antocianinas. El oxígeno puede causar degradación de las antocianinas por un mecanismo de oxidación directo y/o por oxidación indirecta (Jackman *et al*, 1992). Existen diversos métodos para la eliminación de oxígeno. Es por esto que el procesado de alimentos con antocianinas se lleva a cabo bajo condiciones de vacío (Fennema, 2006).

#### **2.8.5. Ácido ascórbico**

El ácido ascórbico es un compuesto muy común en una gran variedad de frutas, y el cual varía dependiendo de la variedad de la fruta, el grado de madurez y la intensidad de la luz durante su crecimiento. Este ácido, decolora las antocianinas en presencia de iones cobre o hierro por formación de peróxido de hidrógeno, produciéndose la degradación de ambos compuestos cuando se almacenan por tiempos prolongados. (Fennema, 1996). La destrucción de antocianinas inducida por el ácido ascórbico probablemente resulta de la oxidación indirecta por peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) formado durante la oxidación aeróbica del ácido ascórbico (Jackman *et al*, 1992).

#### **2.8.6. Metales**

Los complejos que forman las antocianinas con los metales amplían el espectro de color. El complejo formado por antocianinas y metales causa un desplazamiento batocrómico a colores azules (Fennema, 1996).

### **2.8.7. Azúcares**

El azúcar a altas concentraciones (>20%) tiene un efecto protector sobre las antocianinas. Esto es debido a que a altas concentraciones se tiene una baja actividad del agua ( $a_w$ ) Lewis, 1995). La actividad del agua reducida está asociada con una reducida velocidad de degradación de antocianinas (Jackman *et al*, 1992).

### **2.8.8. Dióxido de azufre**

El dióxido de azufre es un compuesto utilizado en la industria alimenticia como un preservante, pero muestra la desventaja que decolora a las antocianinas (Wesche *et al*, 1990). El dióxido de azufre causa en las antocianinas el efecto de blanqueamiento de las mismas a concentraciones altas (Fennema, 1996).

### **2.8.9. Reacciones enzimáticas**

Según, Aguilar (2002); existen enzimas implicadas en la pérdida de color de las antocianinas. Jackman *et al*. (1992); mencionan que varias enzimas que son endógenas en muchos tejidos de plantas han sido implicadas en la decoloración oxidativa de antocianinas.

### **2.8.10. Sulfitado**

El sulfitado de frutas es importante para el almacenamiento de frutas antes de fabricar jaleas o conservas. Sin embargo, puede incluir decoloración de antocianinas, lo que hace que la fruta tome un color amarillo debido a la presencia de otros pigmentos. Esta pérdida puede ser recuperada por acidificación o adición de compuestos con grupos carbonilo (Wesche *et al.*, 1990).

## **2.9. Formas de estabilización de las antocianinas**

Los principales mecanismos por los que las antocianinas pueden ser estabilizadas con el fin de proporcionar un color más brillante y estable son:

- a. Acilaciones.
- b. Polimerización.
- c. Copigmentación.

### **2.9.1. Acilaciones**

Las antocianinas aciladas han sido de gran interés debido a que la sustitución del grupo acilado se relaciona con la estabilidad (Baublis *et al.*, 1994). Las antocianinas aciladas poseen un color más estable con el incremento de la temperatura y la luz. (Mazza, 1995).

### **2.9.2. Polimerización**

Las antocianinas se pueden encontrar copolimerizadas con ellas mismas o con otros compuestos fenólicos, proteínas y polisacáridos aumentando su estabilidad frente al pH. El fenómeno de polimerización es debido a interacciones hidrofóbicas del núcleo aromático de la antocianina y del copigmento. Se propone la formación de una capa hidrofóbica rodeada de un área hidrofílica de residuos glicosilados, por lo que la antocianina está protegida del agua y retiene su color. Por lo tanto, el principal objetivo de la polimerización es controlar la hidratación del catión flavilio para evitar la formación de la pseudobase (Mazza, 1995).

### 2.9.3. Copigmentación

La copigmentación es el fenómeno por medio del cual hace que el color de las antocianinas sea más intenso, brillante y estable debido a la interacción entre sustancias orgánicas y las antocianinas; además las protegen de la degradación de la luz, calor o pH (Markakis, 1982).

La copigmentación es un mecanismo de interacción molecular que previene el ataque nucleofílico del agua, previniendo la decoloración del pigmento. Cabe mencionar que la copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido. Las antocianinas por sí solas no confieren tanto color dado que existen en su forma incolora en un rango de pH muy amplio. En la naturaleza, sin embargo, las antocianinas se encuentran asociadas con ciertos compuestos mediante interacciones débiles. Esto implica que el compuesto coloreado es estabilizado por factores fisicoquímicos inusuales (Asen *et al.*, 1972).

La copigmentación es usual en la naturaleza y contribuye a la profusión (abundancia) de colores en las flores y algunos tejidos.

Markakis (1982), menciona que existen dos tipos de copigmentación propuestos por: Abe *et al* (1977), la “copigmentación intermolecular”, y la “copigmentación intramolecular”.

La copigmentación intermolecular de antocianinas con otros flavonoides produce un incremento en la absorbancia a una longitud de onda visible (efecto hipercromico), así como un desplazamiento a longitudes de onda mayores del máximo de absorbancia (efecto batocrómico); y la copigmentación intramolecular es la responsable por la estabilidad del color de antocianinas que poseen dos o más grupos acilos aromáticos. El color se intensifica al incrementar el contenido de ácidos orgánicos como el cinámico y malónico (Mazza, 1995).

## **2.10. Extracción de colorantes**

La extracción de colorantes (sólido-líquido), es una operación unitaria básica que consiste en la separación de uno o varios componentes presentes en una fase sólida, para esto se utilizan una fase líquida o un solvente. La extracción de los pigmentos a partir de los tejidos vegetales suele realizarse con solventes orgánicos. Los solventes empleados para el proceso depende de la naturaleza de los pigmentos y su polaridad (Ibarz, 2005).

### **2.10.1. Factores que determinan la extracción**

#### **a. Tamaño de partícula**

Los sólidos de tamaño pequeño tienen una mayor superficie de contacto con el líquido y la distancia de difusión entre el soluto y el solvente es menor por lo tanto la cantidad de soluto transferido es más alto (Ullauri, 2010).

#### **b. Solvente**

Debe ser altamente selectivo, de baja viscosidad (Ibarz, 2005). Generalmente se utiliza etanol para la extracción, sin embargo el agua es considerada el solvente universal por su capacidad de extracción en fase sólido-líquido (Ullauri, 2010).

#### **c. Temperatura**

A medida que se incrementa la temperatura, la extracción es mejor, pero si el rango de temperatura está entre 70°C y 100°C, el rendimiento no aumenta de forma significativa (Centeno, 2003).

#### **d. Agitación del Sistema**

La agitación del sistema sólido-líquido es importante porque aumenta la difusión y como consecuencia la transferencia de masa aumenta desde las partículas sólidas al líquido (Ullauri, 2010).

### **2.10.2. Algunos métodos para extracción de colorantes**

#### **a. Destilación por arrastre de vapor**

Es llamada también: destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodifusión o hidroextracción, steam distillation o hydrodistillation. Es así que, cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado “destilación por arrastre de vapor”. Cuando se usa vapor saturado, pero la materia prima está en contacto íntimo con el agua que genera el vapor, se le llama “hidrodestilación” (Günther, 1948).

#### **b. Lixiviación**

Para separar el soluto deseado o eliminar un soluto indeseable de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos se difunden desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes originales del sólido. Este proceso se llama lixiviación líquido-sólido o simplemente, lixiviación. (Geankoplis, 2004)

#### **c. Agitación mecánica o difusión**

La extracción consiste en colocar la muestra con el solvente elegido en un vaso de precipitado y mediante un agitador magnético mecánico se pone en contacto el solvente con la materia prima para obtener el colorante deseado (Cabezudo, 1973; Zapata, 1978).

#### **d. Extracción por cocciones**

Los conocimientos son preparados líquidos que se confeccionan hirviendo con agua las sustancias vegetales. La muestra se coloca en un recipiente de vidrio, se agrega el solvente y se somete a ebullición por diferentes tiempos. La temperatura de extracción debe ser tal que no afecte a la estructura del colorante (Yufera, 1979).

#### **2.10.3. Características del solvente**

Según Quintero *et al.* (2002), mencionan que para la extracción de pigmentos a partir de los vegetales, se debe tomar en cuenta las siguientes condiciones:

- El rendimiento o recuperación máxima de los colorantes para un óptimo aprovechamiento de la materia prima.
- Baja o nula toxicidad del solvente empleado, para facilitar la seguridad del personal que participa en el proceso y porque el producto final está destinado para el consumo humano.
- Bajo nivel de extracción de impurezas, o bien, que estas sean de fácil remoción

#### **2.11. Antecedentes de extracción de antocianinas**

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares (Cuadro 4)(Delgado *et al.*, 2000).

El método usual de extracción es por maceración de la muestra con una solución de HCl 1% en metanol (en etanol en caso de utilización de alimentos) (Lock, 1997). Dado que las antocianinas son compuestos orgánicos solubles en agua y pueden ser fácilmente extraídas (Ming *et al.*, 2003), se han empleado varios compuestos orgánicos como etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, ácido trifluoroacético, diclorometano, dicloroetano, hexano, alcohol y/o sus mezclas acuosas (Sowbhagya y Chitra, 2010;

Cacace y Mazza, 2003; Kähkönen *et al.*, 2001; García *et al.*, 1998). Asimismo, se ha observado que este tipo de solventes generan condiciones de pH bajos (ácidos) en el cual las antocianinas tienden a mantenerse en un estado estable y por lo tanto, los estudios de cuantificación y caracterización, proveen resultados más exactos y confiables (Kong *et al.*, 2003; Macheix *et al.*, 1990).

**Cuadro 4.** Diversos solventes de extracción de antocianinas

Solvente	Características
0.001% HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001% HCl en etanol	80% tan efectivo como el metanol.
0.001% HCl en agua	27% tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificado con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1000 ppm de SO <sub>2</sub>	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional, los cuales implica sistemas de etanol: ácido acético: agua.

**Fuente:** Delgado *et al.*, (2000)

Como se observa en el Cuadro 4, los métodos de extracción han ido en busca de mejores rendimientos pero se han comprometido en cuestiones de seguridad (Delgado *et al.*, 2000). Comúnmente la extracción de antocianinas se lleva a cabo con etanol (en el caso de utilizarlos para alimentos) con una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (HCl) o ácido fórmico (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) con el propósito de obtener el catión flavilio, mismo que en

condiciones ácidas se estabiliza y previene la degradación de compuestos no acilados (Longo y Vasapollo, 2006).

Kong *et al.* (2003), señalan que también es frecuente el uso de metanol, en combinación con HCl y CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, García *et al.* (1998) apuntan que también es adecuado utilizar acetona como solvente para la extracción de antocianinas, ya que ésta es más eficiente y reproducible que el metanol y el etanol, además evita la formación de pectinas.

En los últimos años se han desarrollado nuevos y más sofisticados métodos de extracción (Mercadante y Bobbio, 2008); por ejemplo, la extracción enzimática que consiste en tratar al tejido previamente triturado y pulverizado con una enzima que sea capaz de romper las paredes de las células vegetales y así permitir la liberación de los pigmentos contenidos en ellas (Sowbhagya y Chitra, 2010). En uvas (*Vitis vinifera* L.), utilizando la enzima pectinasa se ha incrementado el rendimiento de antocianinas entre 10% y 30% en comparación con los métodos de extracción tradicionales (Bakkar *et al.* 1999; Nicoloni y Mattivi, 1997); en fresas (*Fragaria* spp.), utilizando una mezcla de pectinasa y proteasa (1:1), el rendimiento se incrementó 28% (Flores y Heatherbell, 1984).

En el caso del maíz pigmentado, Yang *et al.*, (2009) realizaron la extracción de antocianinas contenidas en los granos de maíz azul utilizando 1N de HCl al 95 % etanol (15:85, v/v) como solvente, evaluando al mismo tiempo distintas temperaturas de extracción (entre 30°C y 70°C), tiempos de extracción (desde 60 hasta 120 min) y diferentes proporciones sólido-líquido (entre 1:20 y 1:40). Los resultados indicaron que el rendimiento más alto de antocianinas extraídas de los granos de maíz azul (6.02 mg g<sup>-1</sup>) fue obtenido a 70 °C, con el tiempo de extracción de 73 min, y con la proporción sólido-líquido de 1:25, en donde el factor que más afectó el rendimiento de antocianinas fue la temperatura.

## **2.12. Cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial**

El método descrito originalmente en el año de 1957 por Francis y posteriormente por Servadio, 1963; otras investigaciones realizadas por los investigadores Fuleki, T. y Francis, F. (1968); modificaron el método de pH diferencial. Este método permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas tampón y la medición por espectroscopia de UV-Visible. Se obtiene una medida de la absorbancia máxima en la región visible (Giusti y Wrolstad, 2001).

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-VIS a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas (Giusti y Wrolstad, 2001). La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas, generalmente expresados como cianidina-3-glucósido.

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Francis y Fuleki (1968), el contenido de antocianinas es calculado con el peso molecular y el coeficiente de extinción molar de la antocianina que existe en mayor cantidad y se encuentra en la matriz de la muestra como principal componente.

**Cuadro 5.** Contenido de antocianinas en diferentes especies de bayas (mg/100g peso fresco)

Bayas	Genero	Antocianinas mg/100g de peso fresco
Zarzamora	<i>Rubusspp</i>	131 - 256 <sup>1</sup>
Grosella negra	<i>Ribesnigrum L.</i>	80 - 810 <sup>2</sup>
Mora azul	<i>Vaccinium</i> (diferentes subgeneros)	60 - 480 <sup>2</sup>
Arándano	<i>Vacciniumoxycoccus, L.</i>	20 - 360 <sup>2</sup>
Arándano americano	<i>Vacciniummyrtillus, L.</i>	300 - 600 <sup>2</sup>
Arándano rojo	<i>Vacciniumvitisidaea, L.</i>	35 - 170 <sup>2</sup>
Frambuesa	<i>Rubusidaeus, L.</i>	20 - 220 <sup>2</sup>
Fresa	<i>Fragaria ananassa</i>	10 - 802 <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siriwoham et al., 2004; <sup>2</sup>Rein, 2005

**Fuente:** Leyva, (2009)

**Cuadro 6.** Contenido de antocianinas en algunas frutas

Taxonomía	Nombre común	Concentración (mg/100g )	Antocianina	Referencia
<i>Vacciniumuliginosum</i>	Arándano alpino	256	Mv-3-glu	Andersen (1987)
<i>Rubus occidental L.</i>	Frambuesa negra	627	Cy-3-glu	Moyer et al. (2002)
<i>V. panifolium</i>	Arando rojo	34	Cy-3-glu	Moyer et al. (2002)
<i>R. nigrum cv</i>	Grosella negra	411	Cy-3-glu	Moyer et al. (2002)
<i>Sambucusnigra</i>	Cauco negro	200 – 1000	Cy-3-glu	Bridle et al. (1997)
<i>V. vinífera</i>	Uva de vid	30 – 750	Cy-3-glu	Bridle et al. (1997)
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja dulce	200	Cy-3-glu	Bridle et al. (1997)

**Mv.:** Malvidina; **Cy.:** Cianidina; **Glu.:** Glucosa

**Fuente:** Santacruz, (2011)

**Cuadro 7.** Contenido de antocianinas en distintas especies vegetales

Fuente de extracción	Antocianinas totales (g/100g)	Autor
Soya negra ( <i>Glycinemax L.</i> )	2.00	Raghvendra et al. (2011)
Aroniaspp. (Fruto)	1.48	Wu et al. (2006)
Berberisbuxofolia	0.752	Arena et al. (2010)
Uva	0.75	Clifford (2000)
Zarzamora	0.70	Arozarena et al. (2002)
Col morada	0.322	Mercadante y Bobbio (2008)
Acai	0.32	Raghvendra et al. (2011)
Arándano	0.23 – 0.5	Mercadante y Bobbio (2008)
Sambucusnigra	0.2 – 1.00	Bridle y Timberlake (1997)
Berenjena	0.086	Mercadante y Bobbio (2008)
Zarzamora	0.067 – 0.23	Wang y Xu (2007)
Zanahoria morada	0.005 – 0.174	Mercadante y Bobbio (2008)
Jaboticaba	0.0044 – 0.0163	Montes et al. (2005)
Trigo morado	0.0034 – 0.05	Bustos et al. (2012)
Papa morada	0.002 – 0.04	Mercadante y Bobbio (2008)
Musa paradisiaca (brácteas de la flor)	0.032	Pazmiño et al. (2001)
Uva	0.25	Bridle y Timberlake (1997)
Cereales	0.0007 – 0.3276	Abdel et al. (2006)
Ribes uva crispa (Fruto)	0.0007	Wu et al. (2006)

**Fuente:** Mendoza, (2012)

### 2.13. Espectrofotometría

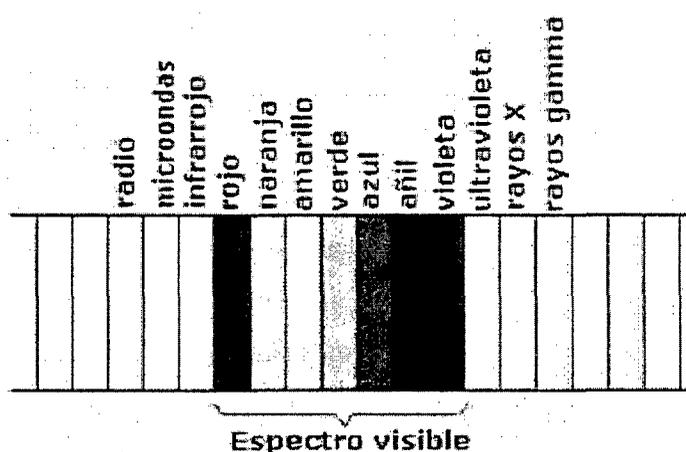
La espectrofotometría es una técnica que mide la interacción de moléculas con la radiación electromagnética. La energía de la luz es usada para promover electrones de un estado de excitación a otro. Un espectro es obtenido cuando la absorción de luz es medida en función de una frecuencia o longitud. Moléculas con electrones

deslocalizados en sistemas aromáticos a menudo absorben la luz a 150-400nm (ultravioleta) o en la región visible de 400-800nm. La absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración y por consiguiente la espectrofotometría de absorción es ideal para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia de una molécula no sólo depende de la naturaleza química, si no del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo (Arenas y López, 2004).

**Cuadro 8.** Colores de la luz visible

Longitud de onda de absorción máxima (nm)	Color absorbido	Color observado
380	Violeta	Amarillo verdoso
420	Azul-Violeta	Amarillo
440	Azul	Naranja
470	Verde-Azul	Rojo
500	Verde	Púrpura
520	Verde-Amarillento	Violeta
550	Amarillo	Azul-Violeta
580	Naranja	Azul

**Fuente:** Ayuso, (2009).



**Figura 12.** El espectro de la radiación visible (Ayuso, 2009).

## 2.14. Leyes fundamentales en los métodos de absorción

La sola absorción de la luz por un compuesto dado se ha usado ampliamente como un medio para el análisis. Los primeros trabajos se realizaron con comparadores de color que requerían comparaciones directas contra estándares. El desarrollo de métodos instrumentales ha hecho posible muchos refinamientos en métodos colorimétricos y ha ampliado el campo para incluir la absorción en muchas regiones del espectro además de las visibles. Según el compuesto y el tipo de absorción que se esté midiendo, la muestra puede encontrarse en los estados sólido, líquido o gaseoso. En las regiones ultravioleta y visible, la muestra generalmente se disuelve para formar una solución diluida; en la región infrarroja se utiliza una mayor variedad de técnicas para el manejo de las muestras (Hamiltony Simpson, 1985).

Los siguientes términos se usan frecuentemente en los métodos por absorción:

$P_0$  o  $I_0$  = Intensidad de la luz incidente (o sea, la luz que entra a la muestra).

$P$  o  $I$  = Intensidad de la luz transmitida (o sea, la luz que sale de la muestra).

$b$  = Longitud de la trayectoria de la muestra (normalmente en cm).

$c$  = Concentración del soluto en el medio de la muestra.

$T = \frac{P}{P_0}$  = Transmitancia de la muestra (la relación de la potencia radiante

transmitida por la muestra a la potencia que incide sobre la muestra).

$100T$  = Porcentaje de transmitancia de la muestra.

$A = \log \frac{P_0}{P}$  = Absorbancia (densidad optica) de la muestra.

Según Hamiltony Simpson, (1985); existen dos leyes fundamentales en los métodos de absorción:

### 2.14.1. La ley de Lambert (o de Bouguer)

Establece que en una muestra homogénea, la intensidad de la luz monocromática plano paralela que entra a una muestra en forma normal a su superficie disminuye exponencialmente mientras que la longitud de la trayectoria de absorción aumenta aritméticamente.

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

En donde k es una constante cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz, de la concentración de la solución y frecuentemente de la naturaleza del medio. El símbolo e es la base de los logaritmos naturales (neperianos = 2.718).

### 2.14.2. La ley de Beer (o de Bernard)

Establece que cuando la luz monocromática paralela pasa a través de una solución, la intensidad de la luz transmitida decrece exponencialmente, mientras que la concentración de la solución aumenta aritméticamente.

$$\frac{P}{P_0} = e^{-k'c}$$

En donde k' es una constante cuyo valor depende de la naturaleza del soluto, de la longitud de onda de la luz, de la longitud de la capa absorbente y de la naturaleza del medio. Estas leyes se combinan con frecuencia en una sola que se conoce comúnmente como la *ley de Lambert-Beer* o ley general de la espectrofotometría y que utiliza una sola constante (Hamiltony Simpson, 1985). Esta ley permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra (Ayuso, 2009).

$$\log \frac{P_0}{P} = abc \quad \text{o} \quad A = abc$$

La constante  $a$  se llama absorbancia y la concentración  $c$  se expresa en gramos por litro (g/l). En los casos en que  $c$  está en unidades molares, se usa el símbolo  $\epsilon$  en vez de  $a$  y se llama absorbancia molar.

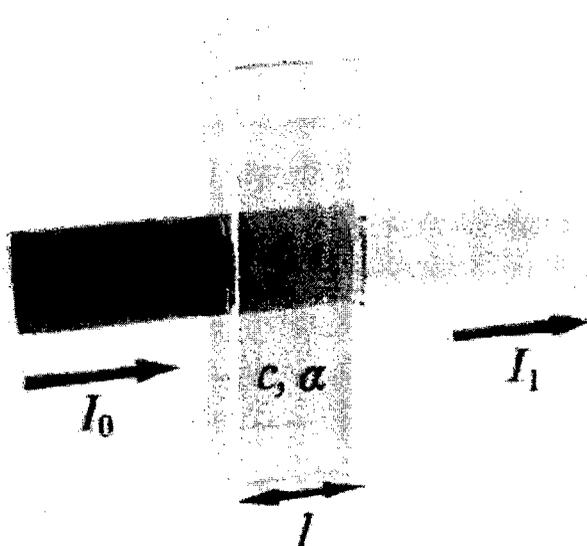
### **2.15. Espectro de absorción de las antocianinas por espectrofotometría UV-Vis**

Las antocianinas a ciertos pH's presentan diferente actividad debido a que esto repercute en su estabilidad molecular. Los espectros UV-Visible a diferentes pH también cambian y nos ayudan a determinar si está o no polimerizada (Giusti *et al*, 2001). Debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos (Harborne *et al*, 1995). Es así como se pueden identificar las antocianinas por su absorción en la región visible (Andersen *et al*, 2004)

El espectro de absorción de los flavonoides se caracteriza por tener dos bandas separadas, una a longitudes de onda largas (Banda I) determinada por la conjugación (enlace) del anillo B, y la segunda en la región ultravioleta (Banda II) determinada por la conjugación del anillo A. A mayor sustitución del anillo B, la absorbancia máxima de las antocianinas se desplaza hacia el extremo del rojo del espectro (Gross, 1987). Las sales de antocianinas de alta coloración en una solución ácida poseen dos absorciones máximas, una en la región visible entre los 465 y 550nm (Banda II), y otra menos intensa en la región ultravioleta entre los 260 y 280nm (Banda I). Dependiendo de la aglicona que se tenga va a ser la longitud de onda máxima que se obtenga (Gross, 1987).

La forma del espectro nos brinda información acerca del número y posición de las sustituciones glicosídicas y el número de acilaciones. La glicosidación conlleva a un

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



**Figura 13.** Representación de la absorción de un haz de luz atravesando una cubeta de tamaño  $l$  (Ayuso, 2009).

## 2.16. Usos de la antocianina

La demanda de antocianina a nivel mundial, obtenida a partir de fuentes naturales, se calcula entre 1.200 y 1.300 toneladas anuales. Los principales países consumidores son Japón y Estados Unidos y en menor escala Francia, Inglaterra, Alemania, España, Bélgica y Venezuela. La producción global de antocianinas está orientada a las empresas productoras de productos de bebidas, saborizantes de yogur y golosinas (Carlos, 2008).

Las políticas regulatorias en cuanto al uso de colorantes derivados de las antocianinas varían según el país considerado. Estados Unidos es el país más restrictivo en cuanto al

empleo de las antocianinas como colorantes naturales. Allí, solo cuatro de los 26 colorantes que están exentos de certificación y aprobados para el uso en alimentos (Wrolstad, 2004). En contraste, en la Unión Europea, Chile, Colombia, Irán, Israel, Corea del Sur, Malta, Perú, Arabia Saudita y los Emiratos Árabes todos los colorantes derivados de las antocianinas son reconocidos como naturales y no presentan restricciones para su utilización (Ottersäater, 1999).

Las antocianinas son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio (Abdel-Aal y Hucl, 2003). Esto podría explicar el principal uso de extractos de antocianinas, tales como pigmentos de uva en bebidas alcohólicas y no alcohólicas (Bezar, 1982).

## **2.17. Potencialidades de las antocianinas**

Estos pigmentos son consideradas como sustitutos potenciales para los colorantes sintéticos debido a sus colores atractivos brillantes y solubilidad en el agua que permiten su incorporación a sistemas alimenticios acuosos también como posibles beneficios en la salud (Mazza *et al*, 1993).

### **2.17.1. Actividad antioxidante de las antocianinas**

Las antocianinas, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazados en su estructura aromática (Ramírez *et al*, 2001). Los antioxidantes son muy importantes para el organismo, ya que protegen las macromolécula biológicas contra el daño oxidativo. Entre los compuestos antioxidantes más conocidos se encuentran: tocoferoles, ácido ascórbico, flavonoides, antocianinas, carotenoides y ácidos fenólicos (Ávalos *et al.*, 2009). Una actividad antioxidante óptima

se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado (Harborne, 1998).

Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli *et al.*, 1998); estos resultados son la explicación de la conocida “Paradoja Francesa”, sobre el bajo riesgo de las enfermedades coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto (Xia *et al.*, 1998).

### **2.17.2. Actividad biológica de las antocianinas**

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos, que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Miyazawa *et al.*, 1999).

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Lugar de ejecución**

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Química General y Analítica, y Laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustrial de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.

#### **3.2. Materia Prima**

La materia prima empleada en la presente investigación fue el fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) los cuales provienen de la comunidad campesina de Utupalla, distrito de Chuquibambilla, provincia de Grau, región de Apurímac, de la campaña 2011-2012, ubicada a una altitud de 3500 a 3800 m.s.n.m.

#### **3.3. Materiales, reactivos y equipos**

##### **3.3.1. Materiales de ensayo**

- Matraz Erlenmeyer de 100, 250, 500, 1000 ml
- Pipetas de 0.5, 1, 2, 5, 10 ml
- Vasos precipitado de 100, 250, 500, 1000 ml
- Fiolas de 25, 50, 100, 250 ml
- Probetas de 50, 100, 250 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Placas petri
- Embudo
- Baguete

- Botellas con tapa de 500 ml
- Termómetro
- Papel Whatman # 1, Grado 1: 11µm, VWR Part of Ge Healthcare
- Gradillas
- Bombilla de succión
- Piceta
- Mortero y pistón
- Meza de acero inoxidable

### 3.3.2. Reactivos

- Etanol al 96% de pureza (Laboratorio AMERICA S.R.L.)
- Ácido clorhídrico (HCl) concentrado, 37.5% de pureza (Laboratorio MERCK)
- Solución Ácido clorhídrico (HCl) 0.1N (Laboratorio MERCK)
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N (Laboratorio MERCK)
- Buffer Cloruro de potasio (KCl) 0.025 N y pH 1 (LaboratorioMERCK)
- Buffer Acetato de sodio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na) 0.4 N y pH 4.5 (Laboratorio MERCK)
- Indicador fenoftaleina (C<sub>2</sub>OH<sub>14</sub>O<sub>4</sub>) (Laboratorio MERCK)

### 3.3.3. Equipos

- Refrigeradora, COLDEX AUTOFROST
- Congeladora, FAEDA ARTICA PLUS
- Espectrofotómetro UV-Visible, JENWAY 6405, margen de error 0.2 nm
- Balanza analítica, OHAUS ADVENTURER, 0.0001g de exactitud
- Balanza digital, ACU BALANCE JR, 0.001g de exactitud
- Refractómetro, ATAGO N-50E, rango de medición 0% a 50%

- Potenciómetro (pH metro), 016 MCA HITECH
- Estufa, MEMMERT GERMANY
- Destilador, GFL 2008

### 3.4. Método

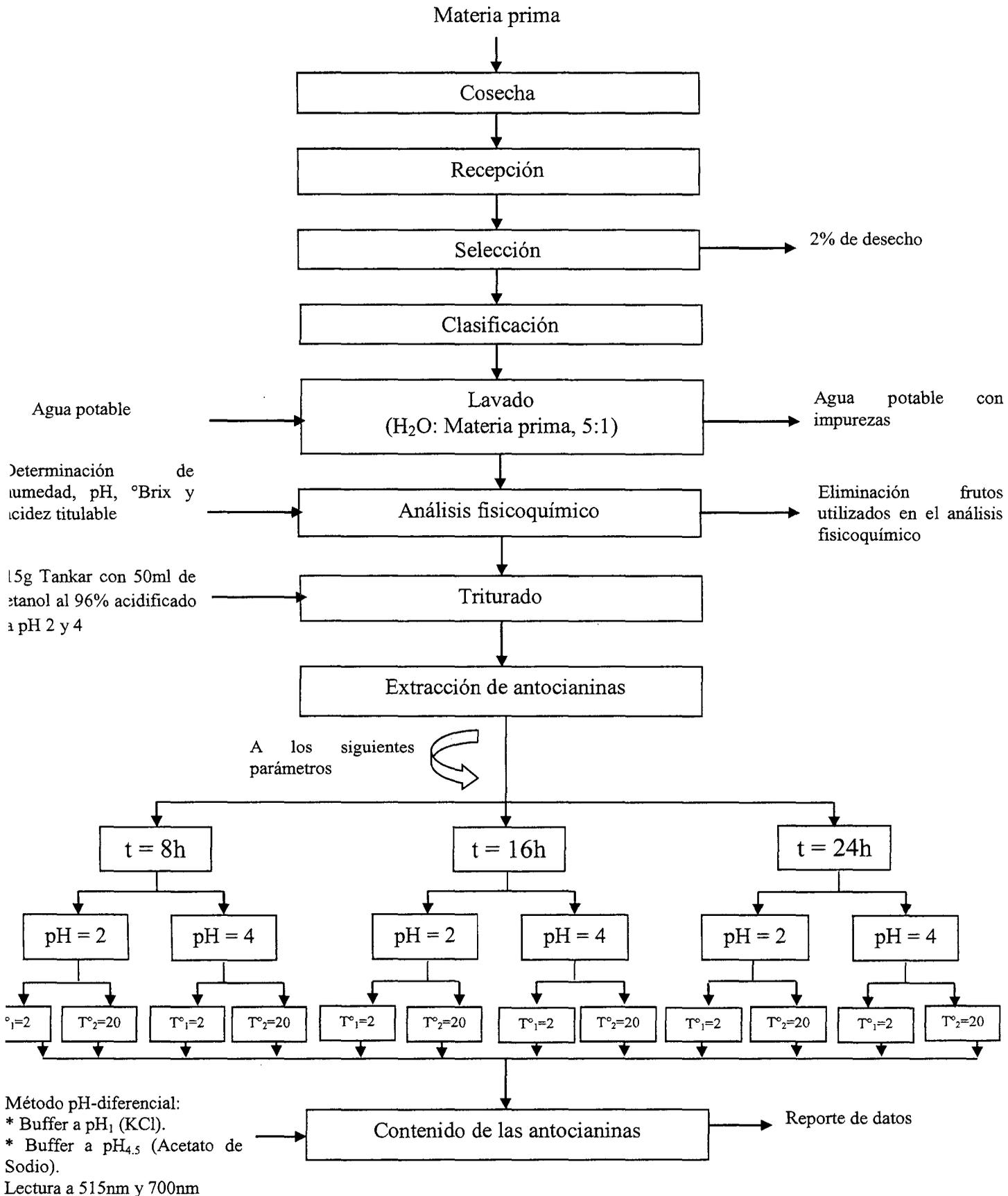
En el presente trabajo de investigación EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DEL FRUTO DE TANKAR (*Berberis boliviana L.*) Y DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO POR EL MÉTODO DEL pH-DIFERENCIAL, se realizó la extracción de las antocianinas presentes en el fruto de tankar, empleando etanol al 96% acidificado con diferentes parámetros tecnológicos, como tiempo de extracción (8, 16 y 24 horas), pH del solventes para la extracción (2 y 4), y temperaturas de maceración (2°C y 20°C), estos extractos fueron cuantificados por el método del pH diferencial utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

En dicha investigación se buscó evaluar las mejores condiciones de extracción del pigmento del fruto en estudio y obtener la mayor concentración de antocianinas.

Los resultados obtenidos de la cantidad de antocianinas expresados en mg/100g, fueron analizados en el paquete estadístico STATGRAPHICS, con un 95% de nivel de confianza y un P igual o menor a 5% (0.05), los valores P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

El procedimiento a seguir en el presente trabajo de investigación se muestra a continuación con un diagrama de flujo y su desarrollo respectivo:

**Figura 14.** Diagrama de flujo para realizar la extracción y cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial.



#### **a. Cosecha**

La recolección del fruto fresco se realizó en el mes de abril del 2012, campaña 2011-2012, se tomaron los frutos que presentaron una coloración rojo intenso, frutos de forma circunferencial y no afectados por alguna enfermedades; que se encuentren en buen estado, sin daño alguno, todo lo recolectado se colocó en baldes de plástico (litros), siendo transportados a la ciudad de Chuquibambilla y posteriormente a la ciudad de Abancay.

#### **b. Recepción**

El fruto recolectado fue llevado al Laboratorio de Procesamiento de Productos Agroindustrial de la E.A.P.I.A., UNAMBA, una vez ingresado en este ambiente, el fruto fue extendido en una mesa de acero inoxidable, se realizó una inspección visual general del estado en el cual llegaron, ya que pudieron haber sufrido daños durante el transporte. La temperatura es un factor a tomar en cuenta en la recepción, ya que el fruto se encuentra entre 25 a 30°C aproximadamente, siendo desfavorable, pues podría generarse cambios fisicoquímicos.

#### **c. Selección**

Se retiró toda materia extraña ajena al fruto de tankar, como piedrecillas, hojas, tallos, pastos, demás.

#### **d. Clasificación**

Se clasificó los frutos ya sean grandes o pequeños, que se encontraban en buen estado, aquellos que no presentaban algún daño físico, de coloración rojo intenso; los frutos magullados o que presentaban algún daño se les descarto.

#### **e. Lavado**

La etapa de lavado se realizó con la finalidad de quitar el jugo de los frutos magullados, el polvo u otra materia extraña adherida a la materia prima (tankar), además sirvió para refrescar el fruto y mantener a temperatura media. El lavado se realizó con agua potable en una proporción de 5:1; agua: materia prima. Una vez realizado la presente etapa se procedió a almacenar toda la muestra en congelación, para luego ir retirando porciones de diferentes pesos para los análisis respectivos y para la extracción de las antocianinas.

#### **f. Análisis fisicoquímico**

Se determinó el porcentaje de humedad, el pH, sólidos solubles (°Brix), acidez titulable según lo recomendado por la AOAC (1997), y también se determinó el índice de madurez. La descripción de cada análisis se encuentra en el anexo 01, 02, 03 y 04.

#### **j. Extracción de la antocianina**

La extracción de la antocianina del fruto de tankar se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Fuleki y Francis (1968), recopilado por Giusti y Wrolstad (2001), con el pasar de los años muchos investigadores fueron adaptando o recopilándolo este método. La descripción de esta metodología se presenta en el anexo N°05.

#### **k. Contenido de antocianinas**

El contenido de antocianinas en el fruto de tankar se realizó mediante el método de pH diferencial propuesto por Fuleki y Francis (1968) y recopilado por Giusti y Wrolstad (2001). La descripción de esta metodología se presenta en el anexo N°06.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Análisis fisicoquímico

En el siguiente cuadro se muestra los resultados del análisis fisicoquímico expresados en media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{X} \pm SD$ ).

**Cuadro 9.** Resultado obtenido del análisis fisicoquímico del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*).

Análisis	$\bar{X} \pm SD$
Humedad (%)	56.11 $\pm$ 0.85
pH	3.01 $\pm$ 0.06
Sólidos solubles totales ( $^{\circ}$ Brix)	10.25 $\pm$ 0.74
Acidez titulable (Expresado en ácido cítrico)	2.86 $\pm$ 0.21
Índice de madurez (SST/acidez)	3.59

Urueta (2004), menciona que la humedad es un indicativo de la frescura del fruto, está relacionada con la firmeza e impacta directamente sobre la textura y la apariencia. Wrolstad y Acree (2001), mencionan que en la composición química de los alimentos el agua se encuentra en mayor porcentaje, el compuesto es parte inherente de la mayoría de las sustancias biológicas y constituye más del 90% del material fresco en algunas materias vegetales. Cabezas *et al*, (2009), realizaron una actualización de los datos de las Tablas Peruanas de Composición de Alimentos y dieron a conocer los alimentos que mayor porcentaje de humedad; el tumbo 93.3%, sandía 93.0%, melón enano 94.3%, coco 95.5%, camu camu 93.3%; por otro lado los alimentos con porcentaje medio de humedad son la aceituna 57.5%, aguaje 53.4%. El porcentaje de humedad del fruto de tankar es de 56.11  $\pm$  0.85%, la diferencia que existe entre este valor y los valores de los

alimentos con mayores porcentajes de humedad es significativo, entonces el peligro de un deterioro del fruto en estudio es probable siempre y cuando existan las condiciones debidas, como altas temperaturas, etc.; pues si no existen estas condiciones adecuadas dicho deterioro se da pero en un más tiempo prolongado.

Laguado *et al*, (1998); Mattoo *et al*, (1975), mencionan que durante el desarrollo de los frutos, el pH incrementa hacia el rango ácido, manteniéndose relativamente entre 3.7 a 4.02, y conforme el fruto va madurando la concentración de ácidos disminuye como pueden ser el ácido cítrico, málico, etc.; según sea el fruto. En el caso del pH del fruto de tankar es de  $3.01 \pm 0.06$ ; este valor se encuentra en el rango ácido y que es cercano a los valores descritos por Laguado y Mattoo. Los frutos para la presente investigación fueron recolectados en un estado maduro.

Silva (2000), indica que el almacenamiento de los frutos a  $10^{\circ}\text{C}$  es una condición ideal para la conservación del pH por un periodo de 25 días, este parámetro interviene en la calidad química de los frutos, ya que en condiciones ácidas la vitamina C presente en el fruto se conserva mejor. Los frutos de tankar fueron almacenados a temperatura de congelación durante un mes aproximadamente, siendo diferentes los valores de temperatura entre lo mencionado por Silva y la presente investigación. La aplicación del frío tiene como efectos fundamentales: Frenar el metabolismo y la actividad respiratoria, lo que se traduce en una reducción de las pérdidas de azúcar, vitaminas, ácidos orgánicos, etc.; retrasa la maduración biológica y comercial de los productos; disminuye los riesgos de aparición y desarrollo de bacterias, hongos y levaduras; con respecto al tiempo de almacenamiento de los frutos existe una compatibilidad entre la presente investigación y lo mencionado por Silva, pues en nuestro caso la muestra fue almacenado entre 25 a 28 días aproximadamente; por otra parte algo que confirmar es cualquier sea el fruto generalmente cítricos es decir con pH ácidos, si se quiere

conservar sus propiedades fisicoquímicas deben ser almacenados a temperaturas bajas y por un tiempo no muy prolongado.

Albi y Gutiérrez, (1991), mencionan que durante la maduración hay degradación en el contenido de carbohidratos poliméricos, almidón y hemicelulosas, particularmente frecuente en la casi total conversión del almidón en azúcares. Este cambio cuantitativamente es el más importante asociado con la maduración de frutas y hortalizas. Estas transformaciones tienen el doble efecto de alterar tanto el gusto como la textura. A pesar del consumo de una parte de los azúcares por la actividad respiratoria, se produce un aumento de su contenido que hace a los productos más dulces y aceptables, este aumento proviene de la hidrólisis ya sea del almidón o bien de hemicelulosas de paredes celulares. Perdomo (2008), realizó un estudio sobre la guayaba, comprobando que en el transcurso del almacenamiento hay un incremento de °Brix a los 15 días con respecto al control. En forma general, se aprecia una tendencia al incremento de los sólidos solubles con respecto al tiempo de almacenamiento, hecho que puede fundamentarse en que los °Brix son producto de la respiración del fruto, la cual mediante las reacciones metabólicas correspondientes van degradando los azúcares de reserva y formando azúcares simples como glucosa, ribosa y sacarosa contenidos estos en la guayaba. Hulme, (1971), menciona que cuando los azúcares están en bajas concentraciones en un fruto, no tienen mucho efecto sobre la actividad del agua, provocando la aceleración de la degradación de las antocianinas. Los sólidos solubles del fruto de tankar es de  $10.25 \pm 0.74^{\circ}\text{Brix}$ , la determinación de este valor se hizo con la utilización de un refractómetro, que tiene una escala de 0 a  $50^{\circ}\text{Brix}$ , donde  $0^{\circ}\text{Brix}$  indica que no existe concentración de azúcares y  $50^{\circ}\text{Brix}$  indica mucha concentración de azúcar, con respecto a estas escalas la concentración de azúcares en el fruto de tankar

es poco, no teniendo mucho efecto sobre la actividad del agua y provocando la aceleración de la degradación de las antocianinas como lo menciona Hulme.

Alvarez, (1988); Salysbury *et al*, (1998), mencionan que la acidez es una de las características que determinan la calidad de los frutos, la cual es expresada en porcentaje de ácido cítrico como consecuencia del metabolismo o el proceso respiratorio, atributo importante en cuanto al sabor del fruto. La acidez es el resultado de las sustancias generadas durante la maduración entre las cuales destacan los azúcares, proteínas y algunos componentes grasos que requiere para la formación de células. Laguado *et al.*, (1998), mencionan que a medida que los frutos avanzan en su estado de maduración se observa una disminución en el contenido de acidez titulable, indicando de esta manera un avance en la maduración del fruto. El porcentaje de acidez titulable del fruto de tankar es de  $2.86 \pm 0.21$ , la investigación que se ha realizado del fruto del tankar, se hizo con frutos maduros, es decir frutos que mostraban buen aspecto organoléptico, todo esto resumido en calidad, lo cual es corroborado por Álvarez y Salysbury. Otro aspecto importante que mencionar es que al igual que el pH la acidez titulable disminuye conforme madura el fruto, el almidón es degradado en azúcares diversos.

Ferrer *et al.*, (2001), mencionan que frecuentemente, los melocotones se recolectan habiendo alcanzado la madurez fisiológica, pero sin haber alcanzado la madurez organoléptica debido a que su vida útil después de la cosecha es muy corta. Pero si se cosecha antes que su desarrollo fisiológico sea suficiente no podrá completar la evolución climatérica durante la conservación y su calidad será muy pobre. Para evitar esto, se establecen los denominados índices de madurez y poder así recolectar el fruto con un grado de madurez óptimo. Los frutos inmaduros son más susceptibles a marchitamientos. Las frutas sobre maduras se ablandan en exceso, presentan texturas

anómalas, son más susceptibles a invasiones fúngicas y pierden rápidamente su sabor y aroma después de la cosecha. El índice de madurez (I.M.) del fruto de tankar es de 3.59, para la recolección del fruto en estudio no se utilizó ningún instrumento para determinar el I.M., sino que se tuvo en cuenta la madurez organoléptica.

#### 4.2. Contenido de antocianinas

**Cuadro 10.** Resultados de laboratorio del contenido de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*), por el método del pH diferencial expresados en base húmeda (b.h.), con su respectiva media  $\pm$  desviación standard ( $\bar{X} \pm SD$ ).

TRATAMIENTOS	Concentración de antocianinas en (mg/100g)b.h.						
	Variables de estudio			Repeticiones			$\bar{X} \pm SD$
				R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	
Tr1	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	676.31	673.30	670.29	673.30 $\pm$ 3.01
Tr2	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	712.37	715.38	718.39	715.38 $\pm$ 3.01
Tr3	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	553.07	550.06	547.06	550.06 $\pm$ 3.01
Tr4	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	619.20	628.21	622.20	623.20 $\pm$ 4.59
Tr5	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	688.33	685.32	691.33	688.33 $\pm$ 3.01
Tr6	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	694.34	691.33	694.34	693.34 $\pm$ 1.74
Tr7	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	676.31	670.29	673.30	673.30 $\pm$ 3.01
Tr8	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	784.51	787.52	790.53	787.52 $\pm$ 3.01
Tr9	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	1220.35	1214.34	1217.35	1217.35 $\pm$ 3.01
Tr10	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	1214.34	1220.35	1217.35	1217.35 $\pm$ 3.01
Tr11	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	1205.33	1208.33	1211.34	1208.33 $\pm$ 3.01
Tr12	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	1238.39	1235.38	1229.37	1234.38 $\pm$ 4.59

Tr: Tratamiento; t: Tiempo; pH: Potencial de hidrogeniones; T: Temperatura

Es importante mencionar que los trabajos que se presentan a continuación están expresados en base húmeda (b.h.).

Según Raghvendra *et al.* (2011), realizaron una investigación sobre la cantidad de antocianinas en la Soya negra (*Glycine max* L.) encontrando 2000 mg/100g de este pigmento; Bridle *et al.* (1997) cuantifico la cantidad de antocianinas del Cauco negro (*Sambucusnigra*) encontrando 200 a 1000 mg/100g; Clifford (2000), cuantifico la Uva (*V. vinífera*) encontrando 750 mg/100g; Moyer *et al.* (2002), cuantifico la Frambuesa negra (*Rubus occidental* L.) encontrando 627 mg/100g; Kähkönen *et al.* (2001), cuantifico el Arándano (*Vaccinium myrtillus*) y el Grosellero negro (*Ribes nigrum*), encontrando que el mayor contenido en los arándanos es 300-600 mg/100g de peso fresco y en el grosellero negro es 80 a 810 mg/100g. Según la presente investigación, de los resultados expresados en el cuadro 10, las variables que más influyen en la extracción y cuantificación de antocianinas en el fruto de tankar son; tiempo de 24 horas, pH de 4 y temperaturas de 20°C, dichas variables pertenecen al tratamiento 12 (Tr12), cuyo valor en contenido de antocianinas es de  $1234.38 \pm 4.59$  mg/100g, los datos de la presente investigación en comparación a los trabajos citados muestran que este fruto es una fuente rica en antocianinas, pigmento importante en el uso de la industria alimentaria y el beneficio en la salud de las personas, además según los datos expuestos se encuentra en el segundo lugar de contenido de antocianinas siendo superada solo por Soya negra (*Glycine max* L.) descrito por Raghvendra *et al.* (2011).

Según Kalt (2005), menciona que la variación en el contenido de antocianinas totales en las frutas es explicable en el sentido de que la maduración de las frutas está típicamente acompañada por cambios sustanciales en el perfil de compuestos fenólicos antioxidantes. Por ejemplo, los cambios en el color de las frutas durante la maduración incrementan el contenido de antocianinas.

#### 4.2.1. Análisis de Varianza (ANOVA) para los resultados del contenido de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*).

##### Prueba de hipótesis:

##### Hipótesis nula ( $H_0$ )

- Todos los tratamientos de extracción de antocianinas como son; tiempo, pH y temperatura tienen el mismo efecto.
- La determinación del contenido de antocianinas en el fruto de tankar, determinado por el método del pH-diferencial en función de los parámetros en estudio son los mismos.

##### Hipótesis alterna

- Al menos uno de los tratamientos de extracción de antocianinas como son; tiempo, pH y temperatura influye en la etapa de extracción.
- Al menos uno de los tratamientos en la determinación del contenido de antocianinas del fruto de tankar, determinado por el método del pH-diferencial en función de los parámetros en estudio es diferente.

Si:  $P < \alpha$ , se rechaza la  $H_0$  y se acepta la  $H_a$ ; por lo tanto existe diferencias y es significativa sobre la variable respuesta.

Si:  $P > \alpha$ , se acepta la  $H_0$  y se rechaza la  $H_a$ ; por lo tanto no existe diferencias todos son iguales y no influye en la variable respuesta.

**Cuadro 11.** Análisis de Varianza (ANOVA) para la extracción y contenido de antocianinas en el fruto de tankar - Suma de Cuadrados Tipo I.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>GL</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
A:Tiempo	222805.00	2	111403.00	10569.22	0.0024
B:pH	3261.55	1	3261.55	309.44	0.0118
C:Temperatura	20528.10	1	20528.10	1947.58	0.0083
<b>INTERACCIONES</b>					
AB	312633.00	2	156317.00	14830.40	0.0162
AC	512192.00	2	256096.00	24296.86	0.0085
BC	9838.92	1	9838.92	933.46	0.0132
ABC	1384852.60	2	692425.00	65693.21	0.0096
RESIDUOS	252.97	24	10.54		
TOTAL (CORREGIDO)	2466362.67	35			

Nivel de significancia ( $\alpha = 0,05$ )

La variable tiempo es el factor que más influye en la extracción y contenido de antocianinas del fruto de tankar, seguido de la temperatura y el pH; en la interacción entre dos variables los que mayor influencia muestran son el tiempo y la temperatura, seguido de la interacción entre el pH y la temperatura, luego la interacción entre el tiempo y el pH; por último la interacción entre las tres variables también muestra influencia significativa. De todos estos valores expuestos, los valores P ( $<0.05$ ) que prueban la significancia estadística de cada uno de los factores, se determinó que los 7 valores P son menores que 0.05, y por ende tienen un efecto estadísticamente significativo sobre la extracción y contenido de antocianinas con un 95.0% de nivel de confianza. Esto se debe a que cuanto más tiempo el fruto este sumergido en el solvente de extracción, la difusión del líquido por todo el tejido del fruto será mayor.

**Cuadro 12.** Pruebas de Múltiple Rangos para ANTOCIANINAS por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Tratamiento</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
4	3	550.061	X
10	3	623.202	X
5	3	673.299	X
1	3	673.299	X
2	3	688.328	X
8	3	693.338	X
7	3	715.38	X
11	3	787.519	X
6	3	1208.33	X
3	3	1217.35	X
9	3	1217.35	X
12	3	1234.38	X

**Cuadro 13.** Pruebas de Múltiple Rangos para el contenido de antocianinas por tiempo

Método: 95.0 % Tukey HSD

<i>Tiempo</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	12	782.259	0.937207	X
2	12	822.587	0.937207	X
3	12	965.613	0.937207	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	-40.3279	3.31099
1 - 3	*	-183.354	3.31099
2 - 3	*	-143.026	3.31099

\* indica una diferencia significativa.

El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares, indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente

significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

**Cuadro 14.** Pruebas de Múltiple Rangos para el contenido de antocianinas por pH

Método: 95.0 % Tukey HSD

<i>pH</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	18	847.301	0.765226	X
2	18	866.338	0.765226	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	-19.0367	2.23354

\* indica una diferencia significativa.

Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

**Cuadro 15.** Pruebas de Múltiple Rangos para el contenido de antocianinas por Temperatura

Método: 95.0 % Tukey HSD

<i>Temperatura</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	18	832.94	0.765226	X
1	18	880.699	0.765226	X

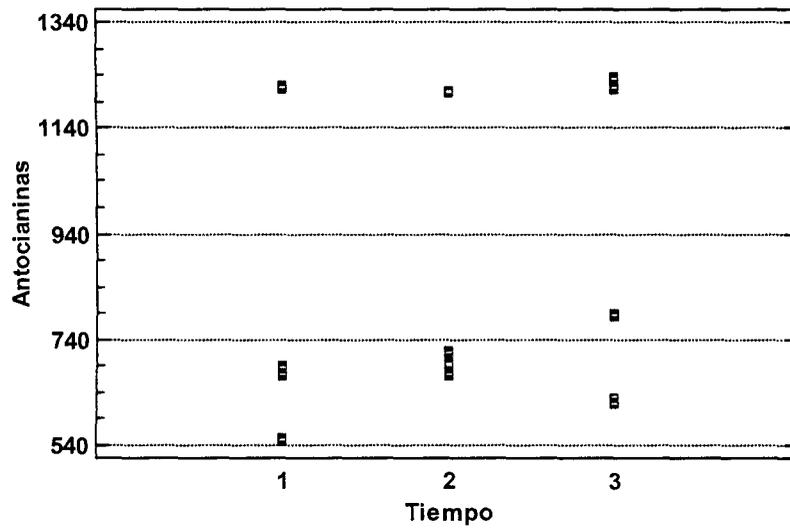
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	47.7588	2.23354

\* indica una diferencia significativa.

Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que uno o más pares son significativamente diferentes, cuando la diferencia real es igual a 0.

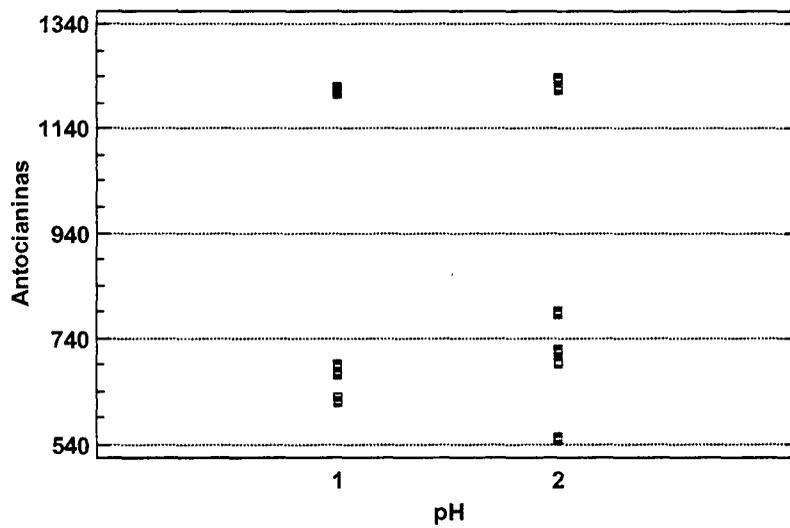
**GRAFICAS DE DISPERSIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS POR CADA FACTOR EN ESTUDIO.**

**Dispersión por Código de Nivel**



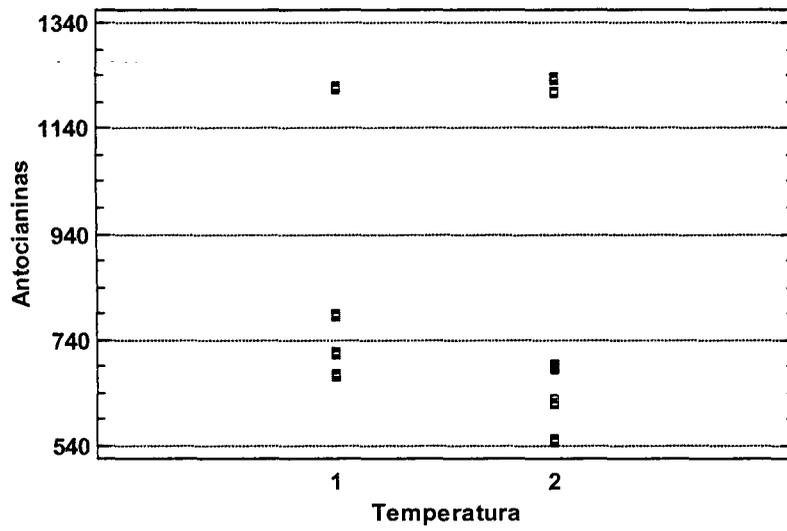
Dispersión del tiempo por cantidad de antocianinas.

**Dispersión por Código de Nivel**



Dispersión del pH por cantidad de antocianinas.

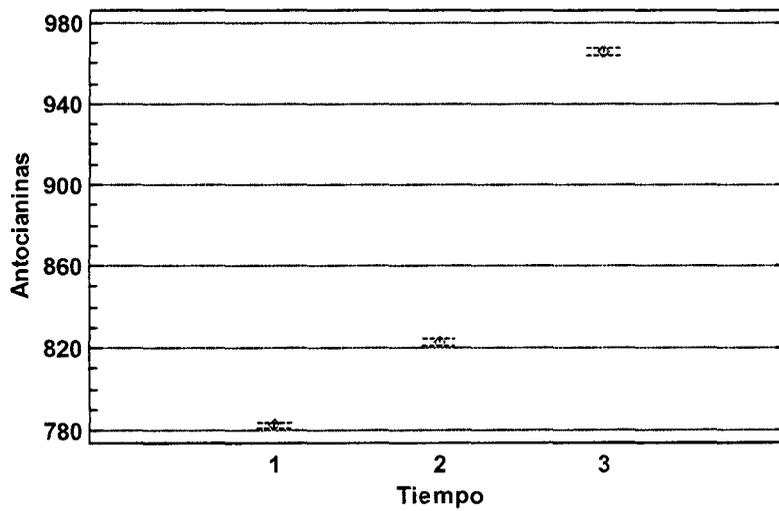
Dispersión por Código de Nivel



Dispersión de la temperatura por cantidad de antocianinas.

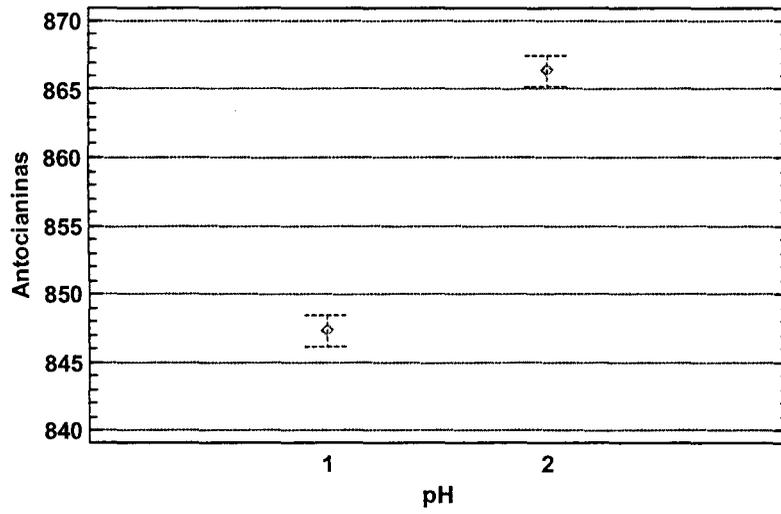
**GRAFICAS DE MEDIAS Y TUKEY CON RESPECTO AL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS Y LOS FACTORES EN ESTUDIO.**

Medias y 95.0% de Tukey HSD



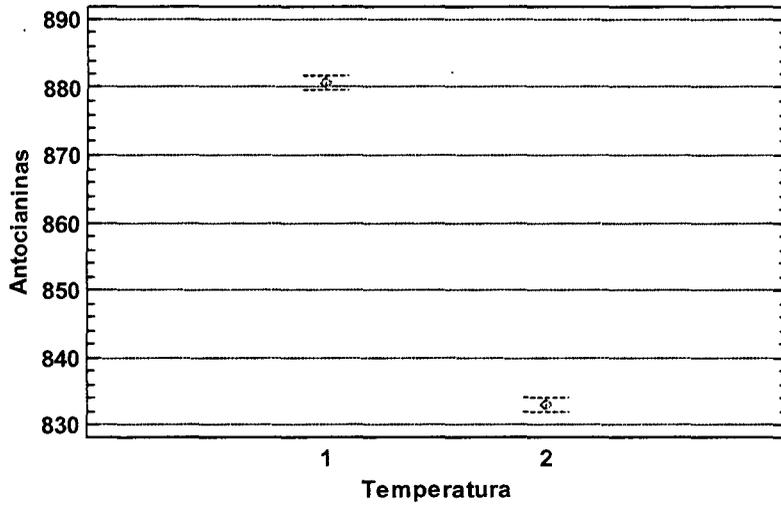
Medias y Tukey del tiempo por cantidad de antocianinas.

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Medias y Tukey del pH por cantidad de antocianinas.

Medias y 95.0% de Tukey HSD



Medias y Tukey de la temperatura por cantidad de antocianinas.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- ❖ El análisis fisicoquímico de la materia prima con que se trabajó es humedad 56.11%, potencial de iones hidrógeno 3.01, sólidos solubles totales 10.25%, acidez titulable 2.86 %, índice de madurez (SST/ACIDEZ TITULABLE) 3.59; características que influyen en el trabajo de investigación.
- ❖ Se determinó la extracción de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) con el solvente etanol al 95% de pureza, acidificado con HCl 0.1N, a pH 2 y pH 4, con tiempos de 8, 16 y 24 horas, a temperaturas de 2°C y 20°C, siendo óptimo la extracción a un tiempo de 24 horas, pH de 4 y temperatura de 20°C obteniéndose un contenido de 1234.38 mg/100g en base húmeda.
- ❖ Se determinó el contenido de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) por el método del pH diferencial, realizándose las lecturas a 515nm con buffer 0.025M Cloruro de Potasio (pH 1) y 0.4M Acetato de Sodio pH 4.5; y 700nm con buffer 0.025M Cloruro de Potasio (pH 1) y 0.4M Acetato de Sodio pH 4.5; en el espectrofotómetro, obteniéndose los picos más altos en absorbancia de 0.596A y 0.188A respectivamente perteneciente a 515nm; 0.097A y 0.093 respectivamente perteneciente a 700nm.
- ❖ La variable tiempo es el factor que más significancia muestra en la presente investigación con un valor P de 0.0024, con un 95% de confiabilidad. De la interacción entre dos factores los que presentan mayor significancia son el tiempo y la temperatura con un valor P de 0.0085. Siendo el tratamiento 12 el más adecuado para la presente investigación.

## 5.2. Recomendaciones

- ❖ Realizar un estudio sobre el contenido de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) en diferentes solventes y con diferentes Potenciales de iones hidrogeno.
- ❖ Realizar la identificación de que tipos de antocianidinas existen en el fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) por HPLC.
- ❖ Cuantificar el contenido de antocianinas del fruto de tankar (*Berberis boliviana L.*) a temperaturas mayores a 20°C.
- ❖ Usar Potencial de iones hidrogeno(pH) de extracción de antocianinas en rangos de 3,5 a 5 para el solvente acidulado y su influencia en la extracción de antocianinas.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

1. ABDEL-AAL E.S. y HUCL P. (2003). Composition and Stability of Anthocyanins in Bluegrained Wheat. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, p. 2174-2180.
2. ÁLVAREZ, R. S. (1988). *El Manzano*. 5ª Ed. Aedos S. A. Ministerio de Agricultura, Pesca y alimentación. Madrid, España. p. 431.
3. ALBI, M.A.; GUTIÉRREZ, F. (1991). Parámetros para evaluar el estado de maduración y la calidad de frutos y hortalizas en “El etileno en la maduración y post recolección de frutos y hortalizas”. España.
4. AGUILAR, E. (2002). Inducción de la copolimerización de antocianinas monoméricas de fresa (*Fragaria ananassa*) en sistemas modelo. Tesis de Maestría. Departamento de Química y Biología. Universidad de las Américas, Puebla.
5. ANDERSEN, O. M. (1987). Anthocyanins in Fruits of *Vaccinium uliginosum* L. (Bog Whortleberry). *J. Food Sci.* p. 665 - 666.
6. ANDERSEN, O. M. (2000). Anthocyanins. En: *Separation of Acylated Anthocyanin Pigments by High Speed CCC* (K. Torskaangerpoll, E. Chou and O. M. Andersen, eds.), *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* p.1791-1799.
7. ANDERSEN, O. M. and FRANCIS, G. W. (2004). Techniques of pigment identification. En: *Plant Pigments and their Manipulation*, Davies, K., Ed., Blackwell Publishing: London, p. 293-341
8. ANDERSEN, O. M. and M. JORDHEIM. (2006). The anthocyanins. In: *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. Andersen O. M. and K. R. Markham (Eds.). CRC Press. p. 452-471.

9. AOAC. (1998). Official Methods of Analysis 16th. Edition. Association of Analytical Chemistry, Arlington, Washington D.C.
10. ARENAS *et al.* (1995). Determinación por Hple de los Azúcares en los frutos de Guayaba (*Psidium Guajava L.*) de una plantación comercial del municipio Mara. *Rev. Fac. Agron.* p. 467 - 483.
11. ARENAS, I. y LÓPEZ, J. (2004). Espectrofotometría de absorción. (En línea). Cuernavaca, México. Universidad Nacional Autónoma de México.
12. ÁVALOS, G. A y E. PÉREZ, U. C. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Serie Fisiología Vegetal-Reduca Biología* p. 119-145.
13. ASEN, S; STEWART, R.N. and NORRIS, K.H. (1972). Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry.* p. 1139-1145.
14. BADUI, S. (1988). *Química de los alimentos*, Ed. Alhambra, p. 274-284, Distrito Federal, México.
15. BADUI, S. (1999). *Química de los Alimentos*. Ed. Longman. México. p. 648 p.
16. BADUI, S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta edición, Pearson education, México.
17. BAKKAR *et al.* (1999). Effect of enzymes during vinification on colour and sensory properties of port wines. *American Journal of Enology and Viticulture.* p. 271-276.
18. BARRIOS *et al.* (2010). Chemical analysis and screening as anticancer agent of anthocyanin-rich extract from uva caimaroná (*Pourouma cecropifolia Mart.*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* p. 2100-2110.

19. BAUBLIS, A.; SPOMER, A. and BEBBER M., D. (1994). Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of Food Science*: Vol.59 (6). p. 1219-1221.
20. BEZAR H. J. (1982). Konini, speciality bread wheat. *N.Z. Wheat Rev*, p. 62-63.
21. BORS, W; HELLER, W; CHRISTA, M y C. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *MethodsEnzymol*. p. 186:343-355.
22. BOULTON, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the colour of red wine: A critical review. *Am. J. Enol.Vitic*. p. 52,67-85.
23. BRIDLE, P. and TIMBERLAKE C., F. (1997). Anthocyanins as natural food colours selected aspects. *Food chem*.
24. BROUILLARD, R. (1982). Chemical structure of anthocyanins. En: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P., Ed., Ac. Press, Nueva York.
25. CABEZAS *et al.* (2009). Tablas peruanas de composición de alimentos, Centro nacional de alimentación y nutrición instituto nacional de salud. Lima, Perú.
26. CABEZUDO, G. (1973). Extracción de colorantes a partir de Achiote. Tesis para optar el título de Ing. en industrias alimentarias. UNAL-LIMA.
27. CACACE, J. E. and MAZZA G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science*. p. 240–248.
28. CAMIRE E., M.; CHAOVANALIKIT A., D. and BRIGGS, J. (2002). Blueberry and Grape Anthocyanins as Breakfast Cereal Colorants. *J. Food Sci.*, p. 438-441.
29. CARLOS A., M. (2008). Microeconomía, Producción de antocianinas. Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

30. CASTAÑEDA, O. A.; M. de L. PACHECO H.; M. E. PÁEZ H.; J. A. RODRÍGUEZ; C. A. GALÁN V. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. p. 859-871.
31. CHANDRA, A.; NAIR, M., y LEZZONI, A. (1992). Evaluation and Characterization of Anthocyanin Pigments in Tart Cherries (*Prunus cerasus* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. p. 867-898.
32. CHEFTEL, J. C. (1991). High pressure applications in food technology. *Industries Alimentaireset Agricoles*, p. 141-153.
33. CLIFFORD, M. N. (2000). Anthocyanins nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, p. 1063–1072.
34. COULTATE, T. P. (1984). *Food: The chemistry of its components*. Burlington House, London: The Royal Society of Chemistry, p. 113.
35. CUEVAS, E., ANTEZANA, A. y WINTERHALTER, P. (2008). Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (*Zea mays*) boliviano”. Universidad Mayor San Simón de Cochabamba, Cochabamba, Bolivia.
36. DAVIES, K. M. (2009). Modifying anthocyanin production in flowers. In: *Anthocyanins: Biosynthesis, Functions, and Applications*. Gould K., K. Davies, C. Winefield. Ed. Springer. New York. EUA. p. 49-83.
37. DEL CARPIO J., C.; SERRANO F., C. y GIUSTI, M. (2005). Estudio del colorante de los frutos de *Berberis Boliviana* L (Cheqche). Cusco. Escuela de Post Grado, Maestría en Ciencias, mención Química, Especialidad Productos Naturales, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. p. 118.
38. DEL VALLE *et al.* (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntiaficusindica*) and its application to extend strawberry (*Fragariaananassa*) shelf life. En: *Food Chemistry*. Vol. 91(4), pp.751-756.

39. DELGADO V., F. and PAREDES L., O. (2003). Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, Boca Raton, Florida.
40. DELGADO *et al.* (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Food Sci. Nutr. p. 173-289.
41. DELPECH, R. (2000). The Importance of Red Pigments to Plant Life: experiments with anthocyanins. Journal of Biological Education, p. 206-210.
42. DUEÑAS M., N. (1992). Botánica Fanerogámica, Investigación realizada en la facultad de biología de la UNSAAC.
43. EINBOND *et al.* (2004). Anthocyanin antioxidants from edible fruits. Food Chem. p. 23-28.
44. FENNEMA, O. (1985). Introducción a la ciencia de los alimentos. Ed. Reverte S.A, Vol. 2, Barcelona, España.
45. FENNEMA, O. (1993). Química de los Alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España. p. 1095
46. FENNEMA, O. (2000). Química de los alimentos. Ed. Acribia S.A, Zaragoza, España, p. 1095.
47. FENNEMA, O. R. (1996). Food Chemistry. Tercera edición. Marcel Dekker.
48. FERRER, A.; REMÓN, S.; ORIA, R., (2001). Mantenimiento post cosecha de la calidad del melocotón. Grupo de investigación en Tecnología Poscosecha de la Universidad de Zaragoza. Horticultura profesional N°117.
49. FLORES, J. and D., HEATHERBELL. (1984). Optimizing enzyme and prepress mash treatment for colour and juice extraction from strawberries. Fluessiges Obst. p. 320-324.

50. FRANCIS J., F. (1987). Lesser-known food colorants. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), J. Food Sci., p. 458-465.
51. FRANCIS, F. (1989). Food Colorants: Anthocyanins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p. 273 – 301.
52. FRANCIS J., F. (1993). Pigmentos y Otros Colorantes. En: Química de los Alimentos (O. R. Fennema, ed.), Acribia, Zaragoza, p. 615.
53. FULEKI, T. and FRANCIS, F.J. (1968). Quantitative methods for anthocyanins. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberries. J. Food Sci. p. 72-78.
54. GARCÍA V., C.; ZAFRILLA, P. and TOMÁS B., F. A. (1998). The Use of Acetona as Extraction Solvent for Strawberry Fruit Anthocyanins. *En*: C. García-Viguera, P. Zafrilla, F. Romero, P. Abellán, F. Artés y F. A. Tomás-Barberán. Color Stability of Strawberry Jam as Affected by Cultivar and Storage Temperatura. Journal of Food Science. p. 243-247.
55. GARCÍA, F. and CRUZ R., L. (1993). The natural xanthophylls pigment industry. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), J. Food Sci., p. 458-465.
56. GARZÓN, G. (2008). “Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión”, Acta Biológica Colombiana, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. p. 27-36.
57. GASIOROWSKI, K.; SZYBA, K.; BROKOS, B.; KOCZYNSKA B. (1997). Jankowiak-Wodarczyk and Oszmiaski M. Antimutagenic Activity of Anthocyanins Isolated from Aronia melanocarpa Fruits.

58. GEANKOPLIS C., J. (1998). Procesos De Transporte Y Operación Unitarias. The Ohio State University Cia Editorial Kontinental S.A. de Cv México.
59. GEANKOPLIS, CHRISTIE J. (2004). Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias. Tercera Edición, Compañía Editorial Continental, México. 800 – 822 pp.
60. GIUSTI, M. M. y WROLSTAD, R. E. (2001). Anthocyanins.. Characterization and Measurement with UV-Visible Spectroscopy. In: Current Protocols in Food Analytic Chemistry, Wrolstad, R. E., John Wiley y Sons: New York.
61. GHISELLI, A.; NARDINI, M.; BALDI, A. and SCACCINI, C. (1998). Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. J Agric Food Chem. p. 361-367.
62. GROSS, J. (1987). Pigments in Fruits. Academic Press, London. p. 59-85.
63. HAMILTON L. and SIMPSON S. (1985). Cálculos de Química Analítica. New York: McGraw-Hill, p.328.
64. HARBONE, J. B. and HALL, E. (1976). Plant polyphenols. XIII. The systematic distribution and origin of anthocyanins containing branched trisaccharides. Phytochem. p. 453-463.
65. HARBORNE B., J. (1986). Flavonoids: Advances in Research since. En: Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.
66. HARBORNE, J. B. and WILLIAMS, C. A. (1988). Flavone and Flavonol Glycosides. En: Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.
67. HARBORNE, J. B. (1998). The chromatographic identification of anthocyanin pigments. J. Chromatogr. p. 473-488

68. HARBORNE, J. B. and WILLIAMS, C. A. (1995). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod Rep.* p. 639-657.
69. HENDRY A., G. (1992). Natural Pigments in Biology. En: *Natural Food Colorants* (G. A. Hendry and J. D. Houghton, ed.), Blackie and Son Ltd., Glasgow. p. 1-38.
70. HERNÁNDEZ, M. A. (2003). Estabilización de antocianinas extraídas de rosas rojas por medio de la copigmentación para su uso como colorantes naturales en la industria alimenticia y farmacéutica. Tesis de Licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ciencias Departamento de Química y Biología.
71. HRAZDINA, G. (1982). The flavonoids. *Advances in research.* Champman and Hall, Londres, New York. p. 135-188.
72. HULME A., C., (1971). *The Biochemistry of Fruits and Their Products*, vol II, Academic press, New York.
73. HUTCHINGS J. H. (1999). *Food Color and Appearance*. 2nd ed. Gaithersburg, Md.: Aspen Publishers, Inc.
74. HYODO, H. (1971). Phenylalanine ammonia-lyase in strawberry fruits. *Plant Cell Physiol.* p. 989-991.
75. IBARZ, A. y BARBOSA C., G.; (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Editorial Mundi Prensa S.A, Barcelona, España.
76. JACKMAN L., R. and SMITH L., J. (1992). Anthocyanins and Betalains. En: *Natural Food Colorants* (G. A. Hendry and J. D. Houghton, eds.), Blackie and Son Ltd., Glasgow. p. 192.
77. KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I., HEINONEN, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, p. 4076-4082.

78. KOIDE *et al.* (1997). Antitumor Effect of Anthocyanins Fractions Extracted from Red Soybeans and Red Beans in vitro and in vivo. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), J. Food Sci., p. 363-368.
79. KONG, J.; L. CHIA; N. GOH; T. CHIA and R. BROUILLARD. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. p. 923-933.
80. KÜHNAU, J (1976). The Flavonoids: a class of semi essential food components: their role in human nutrition. *World Rev NutrDiet*. p. 117-190.
81. KUSKOSKI *et al.* (2003). Characterization of anthocyanins from fruits of baguacu (*Eugenia Umbelliflora* Berg) J. Agric. Food Chem. p.5450-5454.
82. KUSKOSKI *et al.* (2005). Aplicación de Diversos Métodos Químicos para Determinar Actividad Antioxidante en Pulpa de Frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Champinas*, p. 726-732.
83. LAGUADO, N., Marín., Arenas, L. de M., Castro, C. (1998). Relationship among ripen indexes of guava (*Psidium guayava* L.) var.Dominicana Roja fruits. *Fac. Agron. (LUZ)*. p. 422-428
84. LAGUADO, E. PÉREZ, C. ALVARADO y MARÍN (1997). Características fisicoquímicas y fisiológicas de frutos de guayaba de los tipos Criolla Roja y San Miguel procedentes de dos plantaciones comerciales. p. 4-6
85. LAURO, G. J. (1991). A primer on Natural Colors. En: Anthocyanin Pigment Composition of Red-fleshed Potatoes (L. E. Rodriguez-Saona, M. M. Giusti and R. E. Wrolstad, eds.), J. Food Sci. p. 458-465.
86. LOCK S., O. (1997). Colorantes Naturales, Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima., 277. p. 95-118.

87. LONGO, L. and G., VASAPOLLO. (2006). Extraction and identification of anthocyanin from *Smilax aspera* L. berries. Food Chemistry. p. 226-231.
88. MARKAKIS, P. (1982). Anthocyanins as Foods Colors. Academic Press, N.Y USA.
89. MATTOO *et al.* (1975). Chemical changes during ripening senescence. p. 103 – 127.
90. MAZZA, G. and BROUILLARD, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. Food Chemistry 25. p. 207-225.
91. MAZZA, G. and MINIATI, E. (1993). Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains. Boca Raton-Florida: CRC Press. p. 131-216.
92. MAZZA, G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. p. 341-371.
93. MENDOZA M., CARMEN GABRIELA (2012). Las antocianinas del maíz: Su distribución en la planta y producción. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
94. MERCADANTE A., Z. and BOBBIO. (2008). Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicochemical Properties. *In: Food Colorants: Chemical and Functional Properties.* Socaciu C. (Ed.). CRC Press LLC. USA. p. 241-268.
95. MING *et al.* (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. p. 923-933.
96. MIYAZAWA *et al.* (1999). Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin- 3, 5-Diglucoside, Into Rats and Humans. J Agric Food Chem; 47. p. 1083-1091.

97. MOYER, R. A. *et al.*, (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem.*, p. 519–525.
98. MOORE A., B.; FRANCIS F., J. and CLYDESDALE. (1982). *J. Food Protect.* p. 738.
99. NICOLINI, G. and F. MATTIVI. (1997). Red grapes vinification with exogenous pectolytic enzymes: trials. *Enotechnico*. p. 65–71.
100. OSORJO *et al.* (2010). Microencapsulation by spray-drying of anthocyanin pigments from corozo (*Bactris guineensis*) fruit. *J. Agric. Food Chem.* p. 6977-6985.
101. OTTERSÄATER, G. (1999). *Coloring of Food, Drugs and Cosmetics*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.
102. PALAMIDIS, N. and MARKAKIS, P. (1975). Stability of Grape Anthocyanin in a Carbonated Beverage. *J. Food Sci.* p. 1047.
103. PERDOMO E., E. (2008). Tesis para obtener el título profesional de químico farmacobiólogo Calcio y choque térmico: evaluación de la calidad química de guayaba (*Psidium guajava*). Mexico. p. 90
104. PETERSON, J. and DWYER, J. (1998). Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. En: *Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (Zea mays L.) Color Extract* (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), *J. Food Sci.*, p. 363-368.
105. PIERPOINT S. W. (1983). Reaction of phenolic compounds with proteins and their relevance to the production of leaf protein. En: *Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology* (J. F. Francis ed.), John Wiley and Sons, Inc. p. 1872.

106. PRIOR, L.-R. (2004). Absorption and metabolism of anthocyanins: Potential Health Effects. In: Phytochemicals Mechanisms of Action. Meskin, M. S., W.R. Bidlack, A. J. Davies, D. S. Lewis, R. K. Randolph (eds.). CRC Press LLC. USA. p. 1-19.
107. QUINTERO, R.; MARIANO, G. y LÓPEZ, A.; (2002). Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa, México, México.
108. QUINTERO, H. C. M. (2004). Efecto de la copigmentación sobre el color y estabilidad de pigmento en un sistema modelo (bebida), usando antocianina de rábano. Tesis de Licenciatura en Quimicofarmacobiología. Universidad de las Américas Puebla.
109. RAGHVENDRA, V. *et al.*, (2011). Chemical and potential aspects of anthocyanins-a water-soluble vacuolar flavonoid pigments. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, p. 28-33.
110. RAMÍREZ T *et al.* (2001). Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. Free Radic Biol Med 31. p. 1033-1037
111. REIN, M. (2005). Copigmentation Reactions and Color Stability of Berry Anthocyanins. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Food Chemistry Division. Tesis.
112. RODRIGUEZ, L. and WOLSTRAD, R. (2001). Extraction, Isolation, and Purification of Anthocyanins. Current Protocols in Food Analytical Chemistry.
113. SALISBURY, B. F.; W. C., ROSS (1998). Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamericana, México. p. 200 - 202.

114. SCALVER, A.; MANACH, C. and MORAND, C. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 287-306.
115. SCHNETZLER K., A. and BREENE W., M. (1994). Food uses and amaranth product research: a comprehensive review. En: *Production and Properties of Spraydried Amaranthus Betacyanin Pigments* (Y. Z. Cai and H. Corke, eds.) *J. Food Sci.*, p. 1248-1252.
116. SHAHIDI F., y NACZK M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing., Inc. p. 247-260.
117. SILVA M., A. (2004). "Tesis Efecto de la temperatura sobre la calidad química de frutos de guayaba en tres estados de maduración" Esc. Q.F.B. UMSNH.
118. SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C. E. and PEREIRA C. B. (2004). Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus L. Hybrids*) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. p. 8021-8030.
119. SOWBHAGYA, H. B. and V. N., CHITRA. (2010). Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. p. 146-161.
120. SWAIN, T. (1986). Plant flavonoids in biology and medicine. *Progress in clinical and biological research*, Ed V. Cody, E. Middleton Jr. and J.B Harborne.
121. TAKEDA, K.; HARBORNE, J. B.; SELF, R. (1986). Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the compositae. *Phytochem.* p. 1337-1342.
122. TERAHARA *et al.* (1986). Anthocyanins acylated with malic acid in *Diantheyophyllus* and *D. Deltoids*. *Phytochem.* p. 1715-1717.

123. --- TIMBERLAKE, C. F. (1980). Anthocyanins Occurrence, Extraction and Chemistry. Food Chem. p. 69-80.
124. TRENDS IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY (2005). Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. Department of Food Science and Technology, Wiegand Hall, Oregon State University Vol 16(1). p. 423-428.
125. ULLAURI, P., (2010). Transporte de masa en extracción fase sólido-líquido. Editorial Reciteia, Cali, Colombia.
126. URUETA P., R. M., (2004). Tesis Calidad de frutos de Guayaba (*Psidium guajava*) En estado Verde De Maduración Almacenados En Frigorífico: Efecto del choque térmico y calcio en postcosecha. Esc. Q.F.B. UMSNH.
127. WALFORD J. (1980). Developments in Food Colors. Applied Science Publishers (Ed). London. p. 116-142.
128. WAYNER, D.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; LOCKE, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. ebs Lett. p. 33-37
129. WESCHE E. P. and MONTGOMERY M. W. (1990). Strawberry Polyphenol Oxidase: it's Role in Anthocyanin Degradation. Journal of Food Science. p. 731-734, 745.
130. WILLSTÄTTER, R. and EVEREST, A. E. (1913). Justus Liebigs. Ann. Chem. p. 189-232.
131. WINKEL S., B. (2001). Flavonoids Biosynthesis. A colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology and Biotechnology. Plant Physiology, p. 485-493.

132. WONG, D.-(1995). Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría. Ed. Acribia, S. A. España. p. 476.
133. WROLSTAD, R. E. (2000). Anthocyanins. In F. J. Francis, & G. J. Lauro (Eds.), Natural Food Colorants (p. 237–252). New York: Marcel Dekker. Cap.11.
134. WROLSTAD, R. E. (2004). Anthocyanin Pigments bioactivity and Coloring Properties. J Food Sci. p. 419-425.
135. XIA, J; ALLENBRAND, B. and SUN, GY. (1998). Dietary Supplementation of Grape Polyphenols and Chronic Ethanol Administration on LDL Oxidation and Platelet Function. Life Sci. p. 383-390.
136. YANG, Z.; Z. CHEN; S. YUAN; W. ZHAI; X. PIAO and X. PIAO. (2009). Extraction and identification of anthocyanin from purple corn (*Zea mays* L.) International Journal of Food and Science and Technology. p. 2485-2492.
137. YUFERA, E.P. (1979). Química agrícola III. Alimentos. Ed. Alhambra S.A. 1ed, España. p.320.
138. ZAPATA, R. (1978). Extracción de colorante a partir de Achiote. Tesis para optar el título de Ing. en industrias alimentarias. UNAL-LIMA.
139. ZHAO *et al.* (2004). Effects of commercial anthocyanin rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. En: Effects of Extraction Conditions on Improving the Yield and Quality of an Anthocyanin-Rich Purple Corn (*Zea mays* L.) Color Extract (P. Jing and M. M. Giusti, eds.), J. Food Sci., p. 363-368.

## DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

### 1.1. Principio

El principio operacional del método de determinación de humedad utilizando estufa se basa en la pérdida de peso de la muestra por evaporación del agua, incluye la preparación de la muestra, pesado, secado, enfriado y pesado nuevamente de la muestra.

Para esto se requiere que la muestra sea térmicamente estable y que no contenga una cantidad significativa de compuestos volátiles.

No obstante, antes de utilizar este procedimiento deben estimarse las posibilidades de error y tener en cuenta una serie de precauciones:

### 1.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Placa petri
- Estufa
- Desecador de vidrio
- Pinzas de metal
- Balanza digital

### 1.3. Procedimiento

Se pesó una placa petri y se anotó dicho peso, se taro la balanza, luego se pesó 10 gramos de fruto fresco en dicha placa petri, las mismas que fueron introducidas a una estufa a temperatura de 40 a 50°C hasta obtener un peso constante, se tomó todos los datos. Por las diferencia de pesos se realizó en cálculo del porcentaje de humedad mediante la siguiente formula.

$$\%H = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

Dónde:

%H = Porcentaje de humedad en el fruto fresco del Tankar

$W_1$  = Peso de la muestra fresca (10g)

$W_2$  = Peso de la muestra seca

## ANEXO N°02

### DETERMINACIÓN DEL pH

#### 3.1. Principio

Sorensen en 1909, introdujo el término pH como forma conveniente para expresar la concentración de  $H^+$ , por medio de una función logarítmica.

El término pH puede definirse así:  $pH = \log \frac{1}{H^+}$

El pHmetro es un sensor utilizado en el método electroquímico para medir el pH de una disolución. La determinación de pH consiste en medir el potencial que se desarrolla a través de una fina membrana de vidrio que separa dos soluciones con diferente concentración de protones. En consecuencia se conoce muy bien la sensibilidad y la selectividad de las membranas de vidrio delante el pH.

Una celda para la medida de pH consiste en un par de electrodos, sumergidos en la disolución en la que queremos encontrar el pH.

La precisión en la medida del Ph debe ser de 0.05 unidades.

#### 3.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Piton
- Papel Watman #01
- Potenciómetro

### **3.3. Procedimiento**

Se utilizó un potenciómetro digital calibrado a 20 °C. Se dejó que el electrodo del potenciómetro se atempere antes de usar de acuerdo a las instrucciones de manufactura, el otro detalle a tomar en cuenta fue el calibrar dicho equipo, para ello se utilizó una solución buffer pH 4.002 a temperatura ambiente, una vez calibrado se enjuagó el electrodo con agua destilada y se realizó la medición del pH del zumo del fruto fresco del tankar, registrando dichos valores.

## ANEXO N°03

### DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES (°BRIX)

#### 2.1. Principio

Un grado Brix es 1 gramo de sacarosa disuelto en 100 gramos de solución, así se representa la densidad que tiene, a 20°C. Así pues, se dice que un zumo tiene una concentración de sólidos solubles disueltos de un grado Brix, cuando su índice de refracción es igual al de una solución de sacarosa al 1 % (p/v).

A menudo Brix se conoce como el "azúcar" o contenido de sacarosa de la planta, pero esta es una visión muy simplista e incompleta. Aunque un alto valor Brix ciertamente indica el contenido de azúcar, en realidad se refiere a los sólidos solubles totales en el jugo o la savia de la planta. El total sólidos solubles en frutas y verduras se refiere no sólo a la sacarosa (azúcar), sino también a la fructuosa, vitaminas, minerales, aminoácidos, proteínas, hormonas y otros sólidos. Cuanto mayor sea el valor Brix más valor nutritivo tiene el fruto. Los grados Brix son, por tanto, un índice comercial, aproximado, de esta concentración que se acepta convencionalmente como si todos los sólidos disueltos fueran sacarosa.

#### 2.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Pitón
- Papel toalla
- Refractómetro

### **2.3. Procedimiento**

Se utilizó un refractómetro calibrado a 20°C. Se tomó frutos al azar, uno en uno se fue realizando la medida de % de sacarosa con el refractómetro, este proceso consistió en sacar el zumo del fruto, solo una a dos gotas, estas gotas se pusieron en el prisma del refractómetro que consta solo de un lente, para ello el refractómetro tiene que estar en posición horizontal, se cubrió con la tapa y se hizo la observación respectiva para cada fruto tomado al azar, es bueno recalcar que las gotas deben cubrir todo el prisma y así fue, la parte blanca indica que hay presencia de azúcar; mientras que la parte azul indica que no hay la presencia de este. La escala del refractómetro va de 0% a 50% de °Brix.

## ANEXO N°04

### DETERMINACIÓN DE LA ACIDEZ TOTAL

#### 4.1. Principio

La acidez total se considera como la suma de los ácidos valorables cuando se lleva una muestra a pH 7 por adición de una solución alcalina valorada. El dióxido de carbono no se considera comprendido en la acidez total. En la determinación de la acidez en alimentos vegetales mediante volumetrías ácido-base, los resultados que se obtienen corresponden a la suma de los ácidos minerales y orgánicos, aunque de manera general en el caso de las frutas y hortalizas, estos ácidos son el cítrico, málico, oxálico y tartárico. La acidez se valora con NaOH y se expresa en gramos del ácido x/100 ml de zumo, x viene a ser el ácido que predomina en dicho fruto o también se puede expresar en porcentaje.

#### 4.2. Materiales y equipos de laboratorio

- Frutos frescos del tankar
- Vaso precipitado 100ml
- Pitón
- Papel Watman #01
- Potenciómetro

#### 4.3. Procedimiento

Se tomó 1ml de jugo de tankar en un vaso precipitado o matraz de 250ml, se aforó a 100ml con agua destilada, se agregó 2 a 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1N, se tomó como dato el gasto del hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N. Los resultados se reportaron en porcentaje de ácido cítrico.

$$\text{Acidez titulable} = \frac{V_1 \times N \times \text{me}}{V} \times 100$$

Dónde:

$V_G$  = Volumen del gasto del NaOH (ml)

$V_m$  = Volumen de la solución de la muestra (ml)

N = Normalidad de la solución del NaOH

me = Mili equivalente del ácido en el cual se expresa la acidez (ácido cítrico)

## ANEXO N°05

### EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

#### 5.1. Metodología

Para realizar la extracción del pigmento (antocianinas) del fruto de tankar se utilizó un solvente que no es toxico y fácil de separar del producto extraído, es etanol; las antocianinas son solubles en este solvente y mucho más efectivo con un pH acido, este método fue propuesto por Fuleki, y Francis, 1968.

#### 5.2. Procedimiento

Para la extracción de antocianinas se utiliza la metodología propuesta por Fuleki, y Francis, 1968; con algunas modificaciones.

Se pesó 15g de la muestra seca (tankar) en un recipiente (vaso de plástico) con fondo, se adicionó 50ml de una solución de extracción, que consiste en HCl 0.1N:Etanol 96%, es decir etanol acidificado a pH 2 y a pH 4, ya incorporada la muestra con el solvente, se trituro con un pitón hasta obtener pequeñas partículas del fruto, así facilitar la extracción (no se realizó el licuado del fruto por que la semilla es un problema, si se licuara la semilla junto con el fruto estos interferirían en el momento del análisis y eso no es favorable, se pudo haber retirado la semilla antes del licuado pero estos frutos son pequeños y se requiere de tiempo).

El vaso con la muestra y la solución acida deben reposar en tiempos de 8 horas, 16 horas y 24 horas, a temperaturas de 2°C y 20°C, según el diseño de la investigación, así comprobar los mejores parámetros de extracción y cuantificación. Una vez transcurrido el tiempo se realizó el filtrado de cada experimento con un papel filtro Whatman N°1, utilizando un embudo de vidrio o plástico, matraz erlenmeyer de 250ml, todo esto para

separar la parte sólida (cáscara y semillas), y obtener solo la parte líquida, el extracto del pigmento (antocianina).

De cada muestra filtrada se obtuvo 40ml de extracto líquido aproximadamente, se fue vertiendo en pequeños envases de plástico con tapa, con capacidad aproximada de 50ml, se realizó el rotulado de cada muestra con sus respectivos datos, se guardó en refrigeración (evitando algún cambio desfavorable por la exposición a la luz y otros factores ambientales) hasta realizar las lecturas correspondientes en el espectrofotómetro.

## ANEXO N°06

### CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

#### 6.1. Metodología

El contenido de antocianinas en el fruto de tankar se realizó mediante el método de pH-diferencial propuesto por Fuleki y Francis (1968) basado en las diferencias de absorbancia de las antocianinas a pH 1 y pH 4.5, permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias mediante el uso de sistemas tampón.

La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4.5. El pH diferencial es un método basado en esta reacción, y permite una rápida y exacta medida de la antocianina total, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes.

#### 6.2. Procedimiento

Se realizó 12 experimentos con 3 repeticiones cada uno, de cada muestra se tomó una alícuota de 5ml del extracto se diluyó en un erlenmeyer de 500ml con agua destilada, aforándolo a 300ml, teniendo un factor de dilución de 60, de esta dilución se tomó 5ml de alícuota y 1ml de buffer KCl a pH 1 por separado y se ingresó a un tubo de ensayo, se agitó; de igual modo se tomó 5ml de la dilución y 1ml de buffer acetato de sodio a pH 4.5, se ingresó a un tubo de ensayo y se agitó, ambas diluciones se encuentran listas para realizar la lectura, se tomó dos cubetas del espectrofotómetro y se ingresó uno para cada uno de las soluciones preparadas. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro a dos rangos el primero para determinar la máxima absorbancia realizando un barrido espectral (400nm a 700nm), siendo la máxima absorbancia 515nm y el segundo a

700nm (lectura de grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes), se registraron los datos y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar el contenido de antocianinas en el fruto del tankar expresado en mg/100g.

Cabe resaltar que la absorbancia debe ser menor a 1 (esto es para cumplir la ley de Lambert y Beer).

La siguiente formula fue propuesta por Fuleki y Francis, (1968); a lo largo de los años este método fue adaptado o recopilado por diferentes autores e investigadores como Giusti y Wrolstad, (2001) y hasta modificado por otros.

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4.5}}$$

$$\text{Contenido de antocianinas} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) \text{ b. h.} = \frac{\frac{A \times V_{\text{Ec}} \times V_{\text{Ed}} \times \text{PM} \times 100}{V_{\text{Alq}} \times m \times 1}}{\frac{\epsilon}{10}}$$

$$\text{Contenido de antocianinas} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) \text{ b. h.} = \frac{A \times V_{\text{Ec}} \times V_{\text{Ed}} \times \text{PM} \times 100 \times 10}{V_{\text{Alq}} \times m \times 1 \times \epsilon * 1}$$

$$\text{Factor de dilución (FD)} = \frac{V_{\text{Ed}}}{V_{\text{Alq}}}$$

$$\text{Contenido de antocianinas} \left( \frac{\text{mg}}{100\text{g}} \right) \text{ b. h.} = \frac{A \times V_{\text{Ec}} \times \text{FD} \times \text{PM} \times 1000}{m \times \epsilon \times 1}$$

Dónde:

$A_{\lambda \text{ vis-máx.}}$  = Absorbancia máxima de la antocianina.

$A_{700\text{nm}}$  = Absorbancia, grado de degradación del compuesto y lectura de corrección debido a sustancias interferentes.

$A$  = Absorbancia total o densidad óptica del extracto diluido.

$V_{Ec}$  = Volumen del extracto concentrado.

$V_{Alq.}$  = Volumen de la alícuota del primer concentrado para tener una segunda dilución.

$PM$  = Peso Molecular de la antocianina que predomina en la muestra, ya que no se conoce exactamente cual predomina, generalmente se trabaja en función de la cianidina-3-glucosido (449.2g/mol).

$FD$  = Factor de dilución (vol. total/vol. del extracto).

$m$  = masa de la muestra que fue triturada.

100 = Factor de corrección para que el resultado sea expresado en 100 gramos de muestra.

$\epsilon$  = Absortividad molar o coeficiente de extinción molar que predomina en la muestra (26900).

10 = Constante para corregir el coeficiente de extinción molar de modo que el resultado sea expresado en mg de Antocianina/ 100gramos de muestra.

b.h. = Expresado en base húmeda.

## ANEXO N°07

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES BUFFER pH 1 y pH 4.5

#### 7.1. Preparación de la solución buffer de cloruro de potasio (KCl) 0.025M / HCl pH 1

Se pesaron 1.864 g de cloruro de potasio y se mezclaron en 980 ml de agua destilada en un erlenmeyer, removiéndose constantemente con una bagueta.

Posteriormente con el uso de un potenciómetro se ajustó el pH a 1 con HCl (37.5%) concentrado y finalmente se aforó a 1L con agua destilada.

#### 7.2. Preparación de la solución buffer de acetato de sodio (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na) 0.4M/HClpH4.5

Se pesaron 32.816 g de acetato de sodio y se mezclaron en 980ml de agua destilada en un erlenmeyer; removiéndose constantemente con una bagueta.

Posteriormente con el uso de un potenciómetro el pH se ajustó a 4.5 con HCl (37.5%) concentrado y se aforó a 1L con agua destilada.

##### a. Cálculo para el buffer Cloruro de Potasio (KCl)

$$M = \frac{\text{Número de moles de soluto}}{V}$$

$$M = \frac{W/PM}{V}$$

$$W = V \times PM \times M$$

$$W = 0.025M \times 74.55 \times 1L$$

$$W = 1.864 \text{ g}$$

Dónde:

V = Volumen del solvente (L)

M = Molaridad

W = Peso de la muestra (g)

PM = Peso molecular

**b. Cálculo para el buffer Acetato de Sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ )**

$$M = \frac{\text{Número de moles de soluto}}{V}$$

$$M = \frac{W/PM}{V}$$

$$W = V \times PM \times M$$

$$W = 0.4M \times 82.04 \times 1L$$

$$W = 32.816 \text{ g}$$

## ANEXO N°08

### PREPARACIÓN DEL ÁCIDO CLORHÍDRICO AL 0.1N PARA ACIDIFICAR EL SOLVENTE DE EXTRACCIÓN (ETANOL AL 96%)

En una probeta de 1000ml se ingresó 700ml de agua destilada, con una pipeta de 10ml se tomó 9.73ml de ácido clorhídrico (37.5%) concentrado, se añadió a la probeta que contenía el agua, se agitó cuidadosamente y se aforo a 1000ml.

#### a. Cálculo para el ácido clorhídrico 0.1N.

$$N = \frac{\text{Número equivalente gramo}}{V}$$

$$N = \frac{W}{V \times PE}$$

$$N = \frac{W \times \theta}{V \times PM}$$

$$W = \frac{N \times V \times PM}{\theta}$$

$$W = \frac{0.1N \times 1L \times 36.5}{1}$$

$$W = 3.65g$$

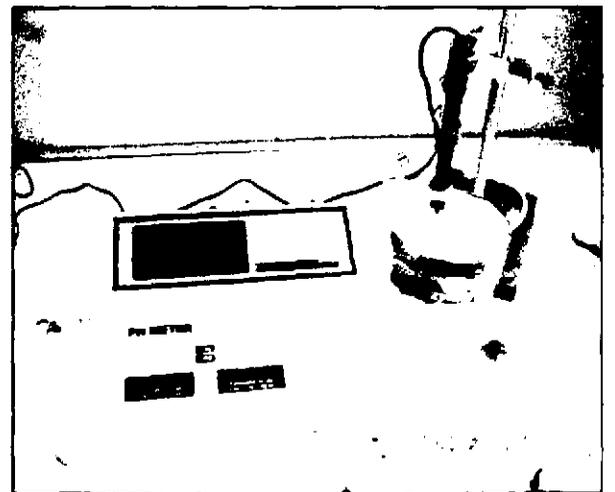
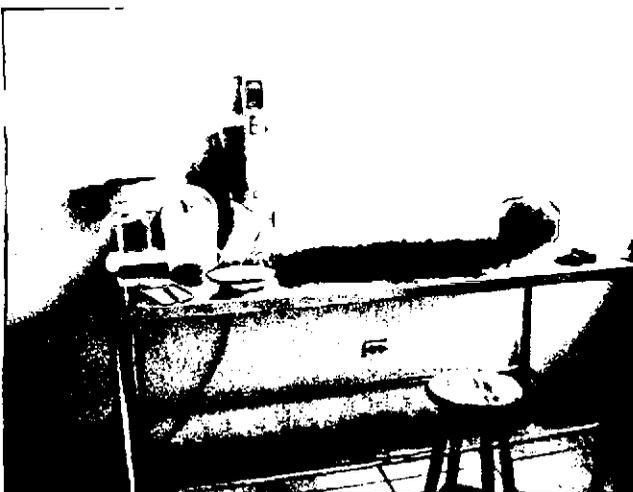
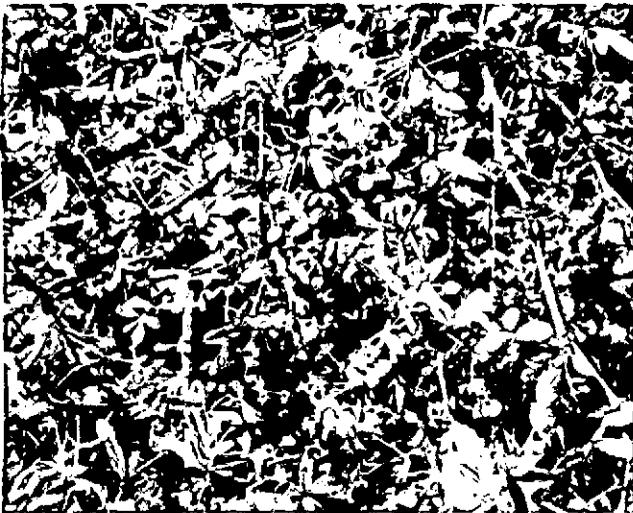
El ácido clorhídrico tiene 37.5% de pureza entonces:

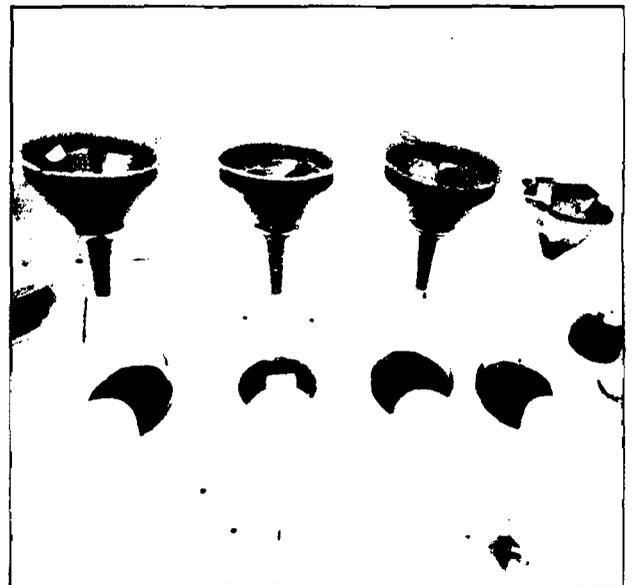
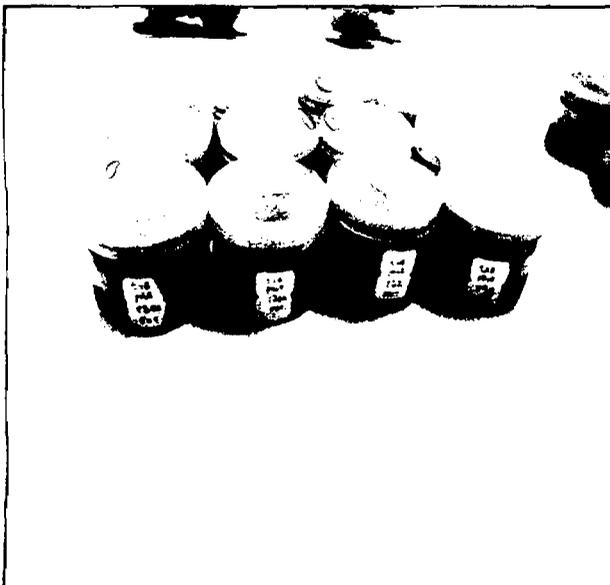
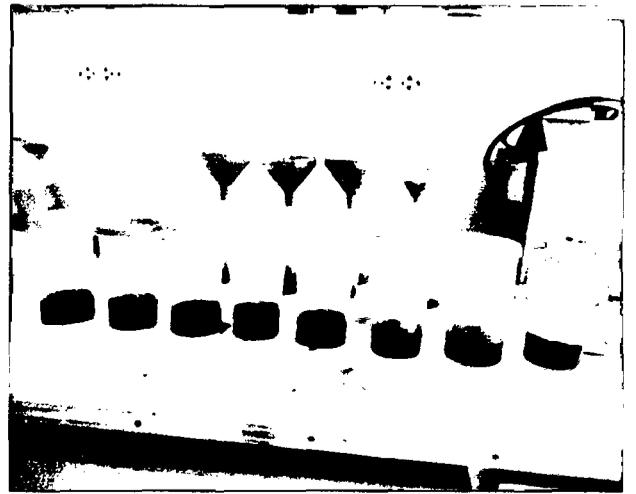
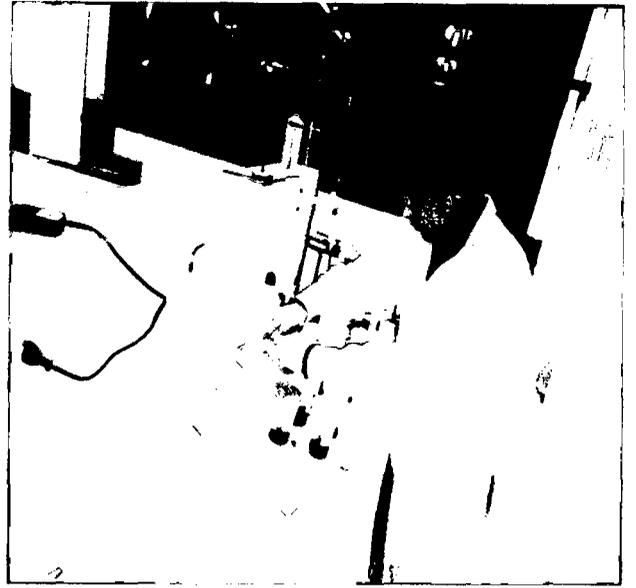
37.5g HCl ——— 100ml de Solución

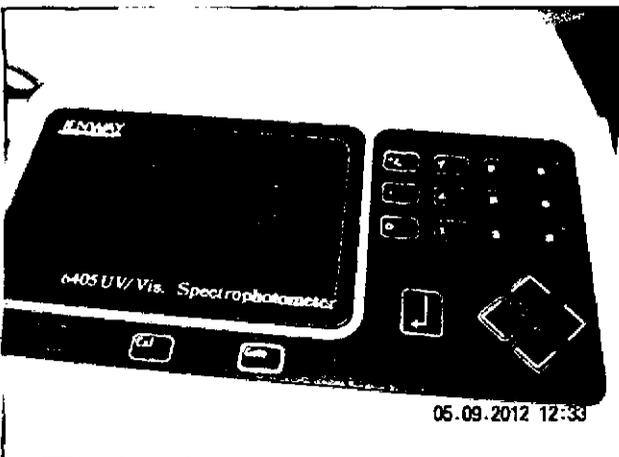
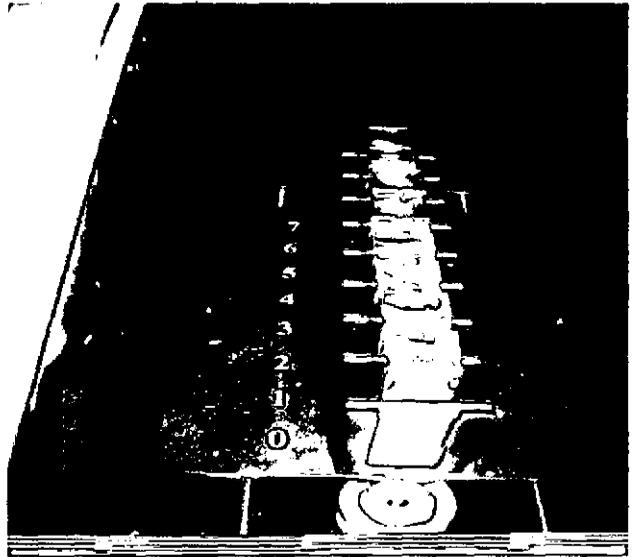
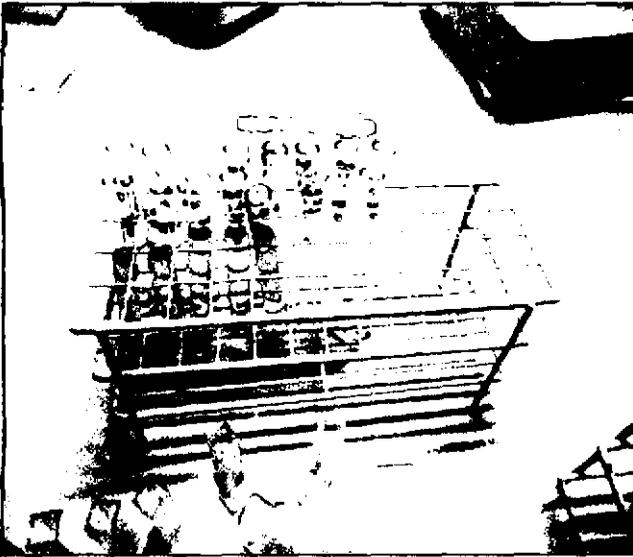
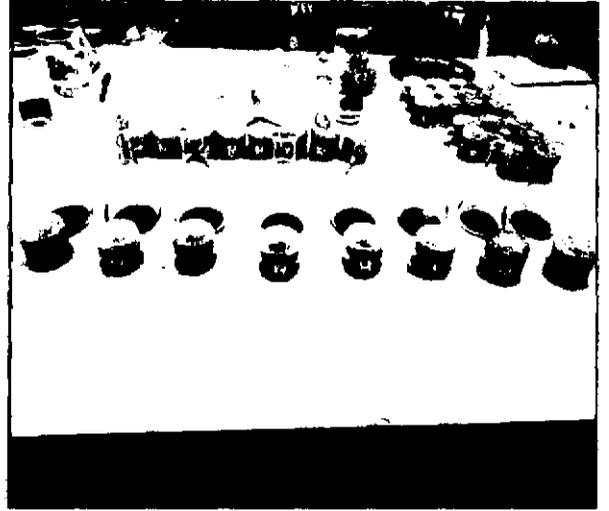
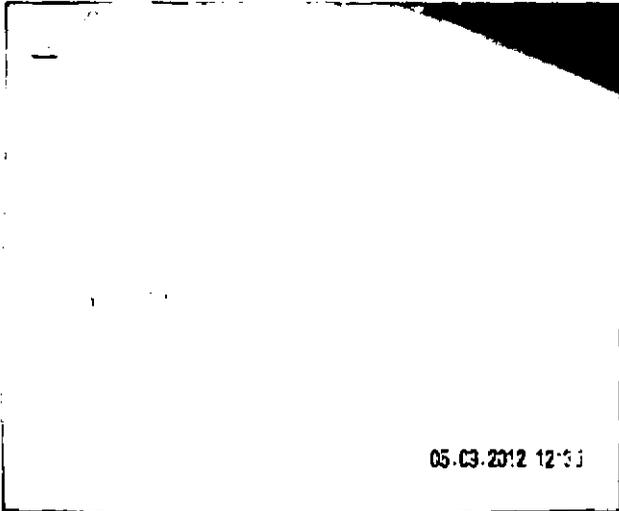
3.65g HCl ——— X

$$X = 9.73 \text{ ml}$$

ANEXOS 09







ANEXO 10

RESULTADO DE LAS LECTURAS DE LAS ABSORBANCIAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL FRUTO DEL TANKAR

N° de tratamiento	Variables de extracción			N° de repetición	Absorbancia (A)				Promedio de las absorbancias (A)
	Tiempo (t)	pH	Temperatura (°C)		λ máx (515nm)		λ (700nm)		
					Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	
1	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.345	0.112	0.063	0.055	0.225
2	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.355	0.116	0.056	0.054	0.237
3	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.271	0.082	0.047	0.042	0.184
4	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.292	0.085	0.047	0.046	0.206
5	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.34	0.108	0.054	0.051	0.229
6	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.351	0.118	0.058	0.056	0.231
7	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.319	0.093	0.051	0.05	0.225
8	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.392	0.126	0.066	0.061	0.261
9	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.586	0.179	0.078	0.077	0.406
10	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.596	0.188	0.097	0.093	0.404
11	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	1	0.535	0.134	0.061	0.061	0.401
12	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	1	0.595	0.185	0.07	0.072	0.412
<b>Total de ensayos</b>				<b>12</b>					

ANEXO 11

RESULTADO DE LAS LECTURAS DE LAS ABSORBANCIAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL FRUTO DEL TANKAR

N° de tratamiento	Variables de extracción			N° de repetición	Absorbancia (A)				Promedio de las absorvancias (A)
	Tiempo (t)	pH	Temperatura (°C)		λ máx (515nm)		λ (700nm)		
					Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	
1	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.325	0.099	0.051	0.049	0.224
2	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.341	0.106	0.042	0.045	0.238
3	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.269	0.086	0.049	0.049	0.183
4	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.296	0.085	0.048	0.046	0.209
5	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.338	0.109	0.055	0.054	0.228
6	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.344	0.112	0.058	0.056	0.23
7	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.317	0.09	0.055	0.051	0.223
8	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.362	0.098	0.042	0.04	0.262
9	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.565	0.166	0.069	0.074	0.404
10	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.555	0.154	0.057	0.062	0.406
11	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	2	0.535	0.129	0.056	0.052	0.402
12	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	2	0.548	0.134	0.08	0.077	0.411
<b>Total de ensayos</b>				<b>12</b>					

ANEXO 12

RESULTADO DE LAS LECTURAS DE LAS ABSORBANCIAS DE LAS ANTOCIANINAS DEL FRUTO DEL TANKAR

N° de tratamiento	Variables de extracción			N° de repetición	Absorbancia (A)				Promedio de las absorbancias (A)
	Tiempo (t)	pH	Temperatura (°C)		λ máx (515nm)		λ (700nm)		
					Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	Cloruro de Potasio pH 1 y 0.025M	Acetato de Sodio pH 4.5 y 0.4M	
1	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.315	0.092	0.048	0.048	0.223
2	t <sub>1</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.344	0.106	0.05	0.051	0.239
3	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.266	0.08	0.051	0.047	0.182
4	t <sub>1</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.31	0.1	0.056	0.053	0.207
5	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.325	0.098	0.044	0.047	0.23
6	t <sub>2</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.338	0.106	0.056	0.055	0.231
7	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.317	0.095	0.045	0.047	0.224
8	t <sub>2</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.376	0.112	0.054	0.053	0.263
9	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.532	0.125	0.054	0.052	0.405
10	t <sub>3</sub>	pH <sub>1</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.539	0.135	0.046	0.047	0.405
11	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>1</sub>	3	0.536	0.134	0.054	0.055	0.403
12	t <sub>3</sub>	pH <sub>2</sub>	T° <sub>2</sub>	3	0.556	0.142	0.054	0.049	0.409
<b>Total de ensayos</b>				<b>12</b>					