

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS

“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN DE
ANTOCIANINAS EN MASHUA NEGRA (*Tropaeolum tuberosum*) Y EVALUACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES”

PRESENTADO POR
DANTE DAVALOS CHIPA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

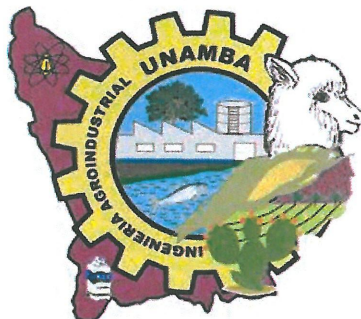
ABANCAY- PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



TESIS:

“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS
EN MASHUA NEGRA (*Tropaeolum tuberosum*) Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES”

Presentado por: **Bach. DANTE DAVALOS CHIPA**, para optar el título de:
INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Sustentado y aprobado el 13 de agosto del 2019 ante el siguiente jurado:

Presidente:

Dra. Guadalupe Chaquilla Quilca

Primer Miembro:

Ing. Lourdes Salcedo Sucasaca

Segundo Miembro:

Ing. Héctor Junior Bazán Juro

Asesor (es) :

Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz

Dr. Melquiades Barragán Condori

AGRADECIMIENTOS

“Una acción vale más que mil palabras”

A mi hermosa Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac la cual llevo en el corazón siempre, que me dio todo y me abrió sus puertas del conocimiento. A mi maravillosa Facultad de Ingeniería Agroindustrial nido de muchos que como yo eligieron esta extraordinaria carrera y que con mucho orgullo, amor, pasión y respeto representaré.

Muy particularmente agradezco a mi asesor Doctor Melquiades Barragán Condori por ser un gran científico, un colosal guía para el asesorado, un gran apoyo en los momentos difíciles del proyecto, porque nunca escatimó esfuerzo y tiempo para corregir y mejorar este trabajo, por sus valiosos conocimientos siempre al servicio del tesista, por ser firme en los momentos que se requería. Pero sobre todo porque me demostró en el trayecto de esta tarea que parecía no tener fin, que es un gran profesor y excelente ser humano.

Al ing. Ricardo Paredes Quiroz por su apoyo oportuno e incondicional, sus aportes para corregir y mejorar el presente trabajo de investigación.

A mis amigos por haberme apoyado en cada una de mis etapas en la facultad, y por haberme motivado a siempre seguir adelante.

Dante Dávalos Chipa.



DEDICATORIA

A mis padres Vicente y Carmen quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, honradez y valentía de no temer las adversidades.

A mis hermanos Valdomiro, Ronald, Chelita y Banessa por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A Carla Taipe Carrasco: Quien en el camino iluminó mi vida, a través de su apoyo, consejos, amor y paciencia me ayudo a no decaer cuando todo parecía complicado e imposible de concluir.

A ellos este trabajo de investigación, que sin ellos, no hubiese podido ser.

Dante Dávalos Chipa.



ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	4
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problema específico	5
1.3. OBJETIVOS.....	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específico	5
1.4. JUSTIFICACIÓN	6
1.5. DELIMITACIÓN	7
CAPÍTULO II	8
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	8
2.2. MARCO TEÓRICO	11
2.2.1. Mashua, ñu o hizaño.....	11
2.2.2. Clasificación taxonomica	12
2.2.3. Descripción botánica	12
2.2.4. Morfología.....	12
2.2.5. Generalidades de cultivo	14
2.2.6. Composición química de mashua.....	14
2.2.7. Valor nutritivo de mashua.	15
2.2.8. Alimentos funcionales.....	16
2.2.9. Colorantes naturales	17
2.2.10. Las antocianinas	17
2.2.11. Métodos de extracción de antocianinas.....	24
2.2.12. Caracterización de antocianinas	26
2.2.13. Cuantificación de antocianinas.....	29
2.2.14. Carotenoides.....	30
2.2.15. Capacidad antioxidante	32
2.2.16. Métodos de evaluación de capacidad antioxidante	33
2.2.17. Radicales libres	35



2.2.18.	Compuestos fenolicos	35
2.2.19.	Métodos de cuantificación de polifenoles totales.....	37
2.2.20.	Metodología de la superficie de respuesta	38
2.3.	MARCO CONCEPTUAL	41
CAPÍTULO III.....		43
DISEÑO METODOLÓGICO		43
3.1.	Definición de variables:.....	43
3.2.	Operacionalización de variables.....	43
3.3.	Formulación de hipótesis	44
3.3.1.	Hipótesis general	44
3.3.2.	Hipótesis específicos	44
3.4.	TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	44
3.4.1.	Método de investigación	44
3.5.	POBLACIÓN Y MUESTRA	44
3.5.1.	Población.....	44
3.5.2.	Muestra.....	44
3.6.	PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	45
3.6.1.	Elección de la especie	46
3.6.2.	Selección y limpieza de la materia prima.....	46
3.6.3.	Extracción del pigmento:	47
3.6.4.	Filtración del extracto acuoso.....	48
3.6.5.	Centrifugado del extracto acuoso	48
3.6.6.	Cuantificación del total de antocianinas mediante el método del pH diferencial (método de Giusti y Wrolstad.....	48
3.6.7.	Identificación por hplc-liquido.....	49
3.6.8.	Capacidad antioxidante método TEAC DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....	50
3.6.8.	Análisis de polifenoles totales (PFT):	51
3.7.	MATERIAL DE INVESTIGACIÓN	52
3.8.	PLAN DE TRATAMIENTO DE DATOS.....	55
3.8.8.	Tecnicas estadísticas	55
CAPÍTULO IV		59
RESULTADOS Y DISCUSIONES		59
4.6.	EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A DIFERENTES CONDICIONES	59
4.6.8.	Atributos de la Superficie de Respuesta.....	60

4.7.	OPTIMIZACIÓN DE LA RESPUESTA	61
4.7.8.	Análisis de Varianza para CAT	61
4.7.9.	Coefficiente de regresión para CAT	63
4.7.10.	Resultados estimados para el contenido total de antocianinas	64
4.7.11.	Camino de máximo ascenso para CAT	65
4.8.	PERFIL CROMATOGRAFICO DE ANTOCIANINAS	66
4.8.8.	Identificación de antocianidina predominante en mashua negra	68
4.9.	DETERMINACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	69
4.10.	DETERMINACION DE POLIFENOLES TOTALES	69
4.11.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
4.11.8.	Determinación de parámetros óptimos de extracción de antocianinas de mashua negra. ...	70
4.11.9.	Perfil Cromatográfico de antocianinas	71
4.11.10.	Determinación de la capacidad antioxidante	72
4.11.11.	Determinación de polifenoles totales	73
CAPÍTULO V		74
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		74
5.1.	CONCLUSIONES	74
5.2.	RECOMENDACIONES	75
BIBLIOGRAFÍA		76
ANEXOS		85



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: <i>Planta de mashua</i>	12
Figura 2: <i>Tallo y hojas de mashua</i>	13
Figura 3: <i>Flor de mashua</i>	13
Figura 4: <i>Tubérculo de mashua</i>	14
Figura 5: <i>Estructura general de la antocianina, núcleo flaván</i>	19
Figura 6: <i>Estructura de antocianina, catión flavilio</i>	19
Figura 7: <i>Estructura de las diferentes antocianinas</i>	20
Figura 8: <i>Relación de absorbancia y longitud de onda en antocianinas</i>	21
Figura 9: <i>Separación por RP-HPLC de Jugo de Grosella Negra</i>	29
Figura 10: <i>Estructura de algunos carotenoides importantes</i>	31
Figura 11: <i>Método del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)</i>	33
Figura 12: <i>Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu</i>	38
Figura 13: <i>Representación gráfica de un diseño central compuesto</i>	40
Figura 14: <i>Diagrama de secuencia de procesos para la obtención y evaluación del pigmento de mashua negra</i>	45
Figura 15: <i>Diagrama de secuencia de procesos para evaluación HPLC y compuestos bioactivos de mashua negra</i>	46
Figura 16: <i>Muestra de tubérculos en mashua negra</i>	46
Figura 17: <i>Extracción de pigmentos en tubérculos en mashua negra</i>	47
Figura 18: <i>Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH</i>	50
Figura 19: <i>Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.</i>	52
Figura 20: <i>Diagrama de Pareto en orden decreciente de importancia</i>	63
Figura 21: <i>Superficie de respuesta estimada para CAT</i>	64
Figura 22: <i>Contornos de superficie de respuesta estimada para CAT</i>	65
Figura 23: <i>Perfil Cromatográfico de antocianinas en mashua negra</i>	67
Figura 24: <i>Perfil cromatográfico de la mashua negra comparado con cromatogramas de uva</i>	68
Figura 25: <i>Perfil cromatográfico de la mashua negra comparado con cromatogramas de fresa</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Clasificación taxonómica de la mashua (<i>Tropaeolum tuberosum</i>)	12
Tabla 2: Composición química de mashua	15
Tabla 3: Métodos de extracción de antocianinas.....	25
Tabla 4: Representación esquemática de la operacionalización de variables de la investigación.....	43
Tabla 5: Representación de Diseño experimental con variables y niveles	55
Tabla 6: Diseño experimental de optimización.	56
Tabla 7: Relación de factores de la investigación	57
Tabla 8: Diseño técnico de la investigación	58
Tabla 9: Concentración de antocianinas en extractos de mashua negra	59
Tabla 10: Atributos de la superficie de respuesta	60
Tabla 11: Optimización de las antocianinas totales (CAT)	61
Tabla 12: Tabla ANOVA de análisis de varianza	62
Tabla 13: Coeficiente de regresión estimada para CAT	64
Tabla 14: Trayecto máximo de ascenso o descenso de CAT	65
Tabla 15: Capacidad antioxidante TEAC DPPH (umol trolox/g)	69
Tabla 16: Contenido de polifenoles totales PFT (mg ácido gálico /g)	69



ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1: Diferencia en el valor “a” (variación en la lectura de absorbancias a ph 1 y ph 4.5).....	85
Anexo 2: Matriz de correlación para los efectos estimados.....	86
Anexo 3: Gráfico de probabilidad normal para CAT	86
Anexo 4: Curvas estándares.....	87
Anexo 5: Representación gráfica de los procesos.....	88



**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN DE
ANTOCIANINAS EN MASHUA NEGRA (*Tropaeolum tuberosum*) Y EVALUACIÓN DE
LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y POLIFENOLES TOTALES”**

Esta publicación está bajo una Licencia Creative Commons:



INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una creciente demanda en el uso de colorantes de origen natural en remplazo de los colorantes artificiales utilizados en la industria procesadora de alimentos; productos como el maíz morado, camote, manzana, fresa, cebolla, entre otros contienen el colorante antocianina, que puede ser extraído utilizando métodos de extracción adecuados; esta realidad ha generado el interés por investigar sobre los colorantes naturales y los métodos de extracción a utilizar, así como su aplicación en la industria de alimentos

En el Perú existen productos naturales que, en la mayoría de los casos, son consumidos solo a nivel local o regional, entre ellos podemos encontrar: frutos, raíces, tubérculos, entre otros, con nombres tan llamativos y con altos valores nutricionales, terapéuticos y/o funcionales.

Dentro de estos productos andinos se encuentra la mashua, la cual es considerada uno de los tubérculos más importantes después de la papa, olluco y oca. El valor nutritivo de la mashua reside en su contenido de carbohidratos y su valor funcional en su contenido de compuestos fitoquímicos tales como: los compuestos fenólicos, glucosinolatos y vitamina C; además este tubérculo es tradicionalmente empleado por la medicina folklórica contra problemas renales (1).

Estudios recientes indican que la mashua es fuente importante de compuestos fenólicos antioxidantes que ofrecen al producto una elevada capacidad antioxidante, en especial los de coloración morada, la cual es comparada con la que presenta el arándano (*Vaccinium myrtillus*) que es considerada una de las frutas con mayor capacidad antioxidante (2).

Estudios epidemiológicos han sugerido que estos compuestos, entre los que se encuentran las antocianinas, podrían tener un efecto protector contra muchas enfermedades degenerativas (3). Al proporcionar al cuerpo una protección antioxidante. Dietas ricas en antioxidantes están asociadas con un menor riesgo de padecer patologías cardiovasculares, neurodegenerativas, cáncer e incluso el envejecimiento, todas ellas vinculadas al estrés oxidativo (4).

El tubérculo que se estudió en la presente investigación “mashua negra” (*Tropaeolum tuberosum*), presenta en su composición antocianinas, capacidad antioxidante y polifenoles, las cuales posterior a la extracción pueden ser utilizados como aditivos en la industria alimentaria o farmacéutica, que en gran medida depende del conocimiento que se disponga sobre sus componentes bioactivos, físico químicos, características nutricionales que le otorgara la calidad de alimento funcional. Por esta razón es importante que se realicen este tipo de investigaciones para que tubérculos como la mashua no tan comercializados dejen de ser considerados como cultivos marginales.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar los parámetros óptimos de extracción de antocianinas obtenidas de mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*), determinar el contenido de polifenoles totales y evaluar su capacidad antioxidante. Para la optimización del proceso de extracción de las antocianinas se empleó la metodología de superficie de respuesta compuesto central no aleatorio con tres factores: Temperatura extracción (20 a 60°C), tiempo extracción (180 a 300 minutos) y concentración de solvente etanol acidificado (pH 3 a 4). La optimización del modelo mostró que las condiciones de extracción óptimas son: solvente acidificado (pH 3.317), tiempo de proceso de 264.564 minutos y temperatura de 37.769 °C, el cual presentó los mayores contenidos de antocianinas, alcanzando 170.36 mg cianidina 3-glucosido/100g, el contenido de fenoles totales, es de 10.66±0.624 mg ácido Gálico/gr evaluados por el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante de 42.76±2.92 µmol equivalente de Trolox/g determinados por el método de DPPH, respectivamente.

Palabras clave: Antocianinas, actividad antioxidante, mashua negra, fenoles totales, antioxidantes.



ABSTRACT

The objective of this research was to determine the optimal parameters of anthocyanin extraction obtained from black mashua (*Tropaeolum tuberosum*), determine the total polyphenol content and evaluate its antioxidant capacity. For the optimization of the anthocyanin extraction process, the non-randomized central composite response surface methodology was used with three factors: Extraction temperature (20 to 60 ° C), extraction time (180 to 300 minutes) and acidified ethanol solvent concentration (pH 3 to 4). The optimization of the model showed that the optimal extraction conditions are; acidified solvent (pH 3,317), process time of 264,564 minutes and temperature of 37,769 ° C, which presented the highest anthocyanin contents, reaching 170.36 mg cyanidine 3-glucoside / 100g, the total phenolic content, is 10.66 ± 0.624 mg Gallic acid / g evaluated by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant activity of 42.76 ± 2.92 μ mol equivalent of Trolox / g determined by the DPPH method, respectively.

Key words: Anthocyanins, antioxidant activity, black mashua, total phenols, antioxidants.



CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, estos pigmentos naturales son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales, cereales y tubérculos. El interés por estos pigmentos se han incrementado en los últimos años, debido no solamente al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel en la reducción de diversas enfermedades, la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles totales, que a diferencia de los colorantes sintéticos que pueden provocar reacciones alérgicas, irritabilidad y en algunos casos llegar a generar el cáncer, los colorantes naturales se presentan como una opción que proporcionan soluciones de valor ante una creciente demanda en favor de las etiquetas limpias.

Mientras la industria alimentaria moderna genera cada vez más productos artificiales, cientos de productos naturales que crecen en los Andes y Selva peruanos, con excelentes propiedades benéficas para la salud del hombre, son desconocidos fuera de los estrechos límites de sus valles y ríos, desperdiciándose de esta manera el potencial alimentario en la salud humana y la medicina.

En el Perú, existen una gran variedad de alimentos con alto contenido de antocianinas, uno de ellos es la mashua negra (*Tropaelum tuberosum*), cuya producción anual en nuestro país es de alrededor de 31,500.00 toneladas entre sus distintas variedades, de los cuales Apurímac representa el 15% (5). La variedad de mashua Cheara o negro es el de mayor importancia por su alto contenido de antocianinas y antioxidantes en su composición. No obstante, su extracción se realiza generalmente por el método de solventes tóxicos, como el acetato de sodio, cloroformo, benceno, etc. los cuales no son aceptados como aditivos en la industria de los alimentos por no ser de grado alimentario y perjudicial en la salud humana.

En la literatura autores tales como (Temoche, 2003; Ríos, 2004; Campos et al., 2006; Chirinos, et al., 2007); han hecho evaluaciones del contenido de antocianinas, el potencial antioxidante y polifenoles totales de diversos genotipos, clones y/o cultivares de mashua, sin embargo el problema principal se basa en que no se cuenta con información precisa sobre los parámetros óptimos de extracción de antocianinas ni de la composición de sus componentes bioactivos de los tubérculos de mashua negra materia de estudio del presente trabajo de investigación ya que la actualidad existe una demanda considerable de colorantes naturales alternativos a los colorantes sintéticos, como el rojo N° 2, N° 40 que debido a su toxicidad en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos se viene reemplazando por colorantes naturales.

1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA

En la extracción de antocianinas con etanol acidificado (ácido cítrico), la temperatura, el pH y el tiempo, son factores que determinan el contenido total de antocianinas en los tubérculos de mashua, Los mismos que son parámetros para optimizar el proceso de extracción, determinar la cantidad total de antocianinas y evaluar los compuestos bioactivos.

1.2.1. PROBLEMA GENERAL

La escasa información de procesos tecnológicos de extracción del colorante y poca información sobre las propiedades funcionales de la mashua, son limitantes para obtener nuevos productos como es el caso de “antocianinas” a partir de la mashua, con características aceptables.

¿Cuáles son los parámetros óptimos de extracción de antocianinas, la cantidad de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en Mashua (*Tropaeolum tuberosum*)?

Para el estudio de extracción de las antocianinas partir de mashua se considerará 3 variables: (Temperatura, tiempo y pH).

1.2.2. PROBLEMA ESPECÍFICO

En ese sentido, bajo la problemática abordada se plantean los siguientes problemas:

- ¿Cuál es la temperatura, pH y tiempo óptimo que permite la extracción de antocianinas en tubérculos de mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*)?
- ¿Cuál es la cantidad de polifenoles totales en el extracto óptimo de antocianinas en tubérculos en tubérculos de mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*)?
- ¿Cuál es la capacidad antioxidante en el extracto óptimo de antocianinas en tubérculos en tubérculos de mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*)?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar los parámetros óptimos de extracción de antocianinas (Temperatura, tiempo y pH), el contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante en tubérculos de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*).

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO

- Determinar la temperatura, pH y tiempo óptimo que permite el mayor rendimiento en la extracción de antocianinas de los tubérculos de mashua negra.

- Determinar la capacidad antioxidante en el extracto óptimo de antocianinas en tubérculos de mashua negra
- Evaluar la cantidad de polifenoles totales en extracto óptimo de antocianinas en tubérculos de mashua negra.

1.4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos tiempos la demanda de antocianina a nivel mundial, obtenida a partir de fuentes naturales, se calcula entre 1200 y 1300 toneladas por año. Los principales países consumidores son Japón y Estados Unidos y en menor escala Francia, Inglaterra, Alemania, España, Bélgica, etc. La producción global de antocianinas está orientada a las empresas productoras de bebidas, saborizantes de yogur, golosinas y otros.

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), es un tubérculo andino del Perú con un alto contenido de antocianinas en su composición estructural. Las propiedades funcionales de este tubérculo pigmentado como colorantes naturales y antioxidantes se presentan como sustancias útiles para la industria alimentaria, debido a la preocupación que va aumentando la seguridad toxicológica de sus contrapartes sintéticas, los cuales tienen efectos colaterales, dañinos para la salud. En los últimos años se ha generado un interés por el estudio de antioxidantes de origen natural, los cuales se encuentran en una gran variedad de alimentos (6).

La promoción en la producción y el desarrollo comercial de papas nativas ha mostrado interés a partir del año 1993, con proyectos propuestos por el ministerio de agricultura y el INIA, como INCOPA, CAPAC-Perú, T'ikapapa, entre otros que promueven su consumo, transformación y comercialización. Sin embargo se esto ha generado la pérdida de interés por otros cultivos tales como el olluco, la oca y en especial la mashua, producto que entre algunos de sus genotipos pigmentados contiene gran cantidad de colorantes, compuestos polifenólicos que poseen propiedades antioxidantes con efectos anticancerígenos, previene el envejecimiento, el estrés oxidativo celular, mejora la agudeza visual y ejerce una acción protectora del sistema cardio vascular (7).

En la actualidad se está restringiendo el uso de colorantes sintéticos debido a sus posibles efectos adversos sobre la salud por el cual existe el interés del uso de colorantes naturales en alimentos en bebidas, jarabes, jugos de frutas, gelatinas, mermeladas, helados, dulces de pasta y yogures, así como en pasta dental, productos farmacéuticos, cosméticos y otros similares (8). Las antocianinas son pigmentos vegetales con gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos debido a su

hidrosolubilidad que facilita su incorporación en diferentes alimentos; por tanto, es de gran importancia conocer los aspectos bioquímicos que enmarcan estos pigmentos (8).

La presente investigación se enfocará en estudiar los parámetros óptimos para la extracción de colorantes de la mashua negra (*Tropaeolum tuberosum*), con el uso de solventes orgánicos permitidos en la industria de los alimentos. Así, el presente trabajo permitiría mostrar desde el punto de vista tecnológico reducir los costos y tiempos de extracción, maximizar la producción y los márgenes de ganancias generados, reducirá la contaminación ambiental ya que durante el proceso de extracción no se utilizaron reactivos tóxicos para la salud del consumidor y para el medio ambiente. Además, esto logrará no solo incrementar la cantidad de compra sino que al mismo tiempo la mashua negra logrará obtener una posición competitiva y la apertura de nuevos mercados, permitiendo así la recuperación de la biodiversidad de este cultivo.

1.5. DELIMITACIÓN

Categoría: Extracción y caracterización de pigmentos

Sub- categoría: Antocianinas, antioxidante y polifenoles.

Área: Agroindustrial-Química.

Línea de investigación: Caracterización, desarrollo de procesos e innovación en la agroindustria.

Sub-Área: Extracción de antocianinas como colorante.

Espacial: El espacio geográfico en el cual se desarrolló la investigación es en los laboratorios de Química, Procesamiento de Productos Agroindustriales, UNAMBA Apurímac y el laboratorio de análisis químico de la UNSAAC del Cusco.

Temporal: La investigación formulada en el presente proyecto de investigación no presenta una delimitación temporal específica que restrinja o influya en los resultados; debido a que la naturaleza de la investigación y los resultados de optimización no se circunscriben a un periodo temporal, porque su evaluación y resultados están sujetos a la variedad del tubérculo (mashua negra), utilizado en el estudio.

CAPÍTULO II

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

- En la investigación realizada por Roxana Chirinos y David Campos, 2006 denominada *“Optimización de las condiciones de extracción de antioxidantes y compuestos fenólicos de tubérculos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)”* (9). Las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos, antocianinas, flavanoles y actividad antioxidante ORAC para dos genotipos mashua se determinaron utilizando el método convencional líquido-sólido. El contenido fenólico y la actividad antioxidante se vieron afectados por el tipo de disolvente, el nivel de pH, la relación disolvente-agua y el tiempo de extracción. En general, no se observaron diferencias significativas en la recuperación fenólica total y los valores de ORAC cuando se usó metanol al 90% o metanol / acetona / agua (45/45/10), ambos con HCl al 0.1%. Por el contrario, la solución de metanol al 90% con HCl al 0.1% extrajo el nivel más alto de antocianinas, mientras que la mezcla solvente extrajo el nivel más alto de flavanoles. Los extractos purificados de los genotipos de mashua presentaron contenidos totales de fenólicos y ORAC dentro de los rangos de 14.4-18.7 mg de equivalentes de ácido gálico / g de materia seca de mashua (DM) y 221–359 mol de equivalentes trolox / g mashua DM, respectivamente. Los perfiles fenólicos de HPLC-DAD obtenidos para los extractos fenólicos purificados para ambos genotipos mashua mostraron diferencias en las proporciones (% de área total a 280 y 520 nm) dependiendo de los solventes seleccionados en este estudio. Se observó un total de nueve picos a 280 nm para ambos genotipos de mashua. Los perfiles de HPLC a 520 nm mostraron que los picos 2-8 son antocianinas. Los datos espectrales DAD-UV / visible para los picos 1 y 9 mostraron absorbancias máximas a 215.0 / 231.0 / 279.4 nm y 253.0 / 287.0 nm, respectivamente. Los picos 1 y 9 corresponden a fenómenos de los tipos de flavanol y ácido benzoico. El alto contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante que se encuentran en los extractos purificados para ambos genotipos de mashua indicaron que los extractos de mashua podrían considerarse como una fuente potencial de nutraceuticos en el futuro.
- En la investigación *“Capacidad Antioxidante, Compuestos Fenólicos, Carotenoides y Antocianinas de 84 Cultivares de Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón)”*, realizada por Huamán, 2016 (10), Se evaluó la capacidad antioxidante hidrofílica, el contenido de compuestos fenólicos, de antocianinas y de los carotenoides de 84 cultivares de mashua procedentes de Cusco. Los resultados indican que los cultivares de mashua presentan una amplia y considerable capacidad antioxidante hidrofílica medida por tres métodos de ensayo diferentes: ABTS, FRAP y ORAC, encontrándose resultados que varían entre (20.6 - 128.2; 22.7 - 173.2 y

35.1 - 158.8 $\mu\text{mol TE/g}$ respectivamente). El contenido de compuestos fenólicos varió entre 5.5 y 16.7 mg Ac. Gálico Eq./g determinados por el método de Folin Ciocalteu, el contenido de antocianinas fue determinado por el método de pH diferencial, en la que se mezcló un gramo de muestra con 10 ml de una solución alcohólica-ácida, la cual estuvo compuesta por HCl 1.5 N y etanol al 95% en una relación 15:85 (v/v), el cual se dejó en maceración por 24 horas a 4 °C, los resultados fluctuaron entre 9 y 268 mg cianidina-3-glucósido(CGE)/100g dependiendo del genotipo y la intensidad en la coloración del tubérculo de mashua.

- En el estudio **“Perfiles fenólicos de tubérculos mashua andino (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). Identificación por HPLC-DAD y evaluación de su actividad antioxidante”**, de Roxana Chirinos y David Campos, 2007 (11), se realizó una cromatografía líquida cualitativa de alto rendimiento con detección de matriz de diodos (HPLC-DAD) para caracterizar compuestos fenólicos de no-antocianina en tres genotipos de mashua de diferentes colores. Los compuestos fenólicos se analizaron separándolos en cuatro fracciones principales: la fracción I obtenida por medio de una partición líquido-líquido con acetato de etilo y las fracciones II, III y IV obtenidas por elución en una columna Sephadex LH-20. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman que los tubérculos de mashua constituyen una fuente prometedora de fenólicos antioxidantes y podrían considerarse potencialmente como un alimento funcional con efectos beneficiosos para la salud. Además reporta la presencia de 8 picos predominantes. Pico 1 correspondió a ácido gálico y la presencia de 11 antocianinas diferentes. Los dos pigmentos principales (56.4-73.0% del rango de área total al 520 nm) se identificaron como delfinidina 3-glucósido-5 acetil-ramósido y delfinidina 3-soprósido-5 acetil-ramósido
- En la investigación denominada **“Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos”**, (12). Realizado en la Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER) de Argentina, realizado con arándanos de la variedad O’Neal procedentes de la Provincia de Entre Ríos (Argentina). se investigó la influencia de variables del proceso de extracción sólido-líquido de antocianinas de arándanos realizadas en dos series experimentales. La primera, en la que se estudiaron las variables temperatura, tiempo y pH, y una segunda en la que, a partir de los resultados obtenidos en la primera, se estudió la proporción materia prima/solvente y el tiempo de extracción. Así, se obtuvo una combinación de variables que maximizó su recuperación: etanol acidificado con ácido cítrico al 1% como solvente de extracción. De la proporción materia prima/solvente 1:3 kg/kg, temperatura 36 ± 1 °C y tiempo de extracción 2 h, fue de la que se obtuvo mayor concentración de antocianinas totales (92.1 ± 2.8 mg cianidina-3-glucósido/100 gr) evaluado por el método de pH

diferencial, el contenido de fenoles totales de 1424 ± 67 mg GAE/100 mL y la actividad antioxidante de 5730 ± 103 y 4872 ± 124 mg EAA/100 mL, medidos por los métodos ABTS y DPPH, respectivamente.

- En la investigación denominada **“Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (*Solana melonera L.*)”**. (13). Realizada a extractos de piel y pulpa se le realizaron análisis fisicoquímicos, contenido en fenoles y antocianos. Para la optimización del proceso de extracción de las antocianinas se empleó la metodología de superficie de respuesta con tres factores: concentración de solvente etanol acidificado 1% ácido ortofosfórico (50 a 90% v/v), temperatura extracción (30 a 60°C) y tiempo extracción (4 a 12 horas). La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó empleando el método ABTS (6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina). La optimización del modelo mostró que las condiciones de extracción con 50% de solvente acidificado, tiempo de proceso de 4 horas y temperatura de 30 °C presentó los mayores contenidos de antocianinas, alcanzando 62 mg/100g en cascara de berenjena. La interacción tiempo de extracción y temperatura afecta la capacidad antioxidante de extractos de berenjena, de forma tal que su incremento provoca una disminución significativa en la actividad antioxidante.
- En la investigación denominada **“Actividad antioxidante de *Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón (mashua)* y su aplicación como colorante para yogur”** (14). Se realizó la extracción de antocianinas por el método de solventes y evaluado por de pH diferencial. En la extracción se utilizaron tubérculos (4 kg) que fueron triturados y homogeneizados con una solución de extracción de ácido clorhídrico 1,5 N y etanol al 96% (15:85 v/v). La mezcla obtenida se puso en maceración por 72 horas a 4°C, en un frasco de color ámbar, con agitación diaria, posterior filtración y concentración en un evaporador rotatorio a 40°C. El contenido de AT y PT en los extractos analizados fueron $192.63 \pm 1,28$ mg de cianidina-3-glucósido/100g peso fresco y de 314.12 ± 1.23 mg de ácido gálico/100g PF, respectivamente. La capacidad antioxidante equivalente al trolox obtenida fue de $15.8 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g}$ PF, aplicando el ensayo DPPH, y 17.0 ± 0.2 $\mu\text{mol/g}$ PF con ABTS.
- En la investigación denominada **“Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays L.*) Método de extracción”**, (15). Realizado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. Las antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de los extractos de corontas de maíz morado fueron evaluados en la investigación. Las extracciones se realizaron en soluciones etanólicas al

20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo ambos en 4 niveles, bajo determinadas condiciones de tiempos de extracción (30, 60, 120 y 240 min.) y temperaturas de extracción (25, 60, 75 y 90 °C). El resultado determinado por el contenido de antocianinas según el método de pH diferencial indica que la extracción de antocianinas en soluciones de etanol al 20 % y pH 2 de corontas de maíz morado se realizan eficientemente a la temperatura de 75 °C y tiempos entre los 120 y 240 minutos donde se alcanzaron los 35.23 mg/g coronta y 37.13 mg/g corontafenoles totales expresados como GAE entre 23.43 y 76.97 mg GAE/g de coronta, y DPPH remanente entre los 17.06 y 68.80 %. El análisis de regresión lineal indica dependencias altamente significativas entre la actividad antioxidante y fenoles totales ($r^2= 0.9974$).

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. MASHUA, AÑU O HIZAÑO

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), es uno de los tubérculos más importantes después de la papa, olluco y oca; se cultiva en los valles húmedos de la zona andina de Perú, Colombia, Argentina, Ecuador y Bolivia (16). Mencionan que la planta hereditaria es de la Meseta Peruano - Boliviano. Pero ahora puede encontrarse en lugares tan lejanos como Canadá, Europa y Nueva Zelanda. Entre los tubérculos andinos, la mashua es de mayor rendimiento, se encuentra entre 9 y 70 TM/ha (17). Crece en alturas de 3000 a 4000 msnm, pero la planta produce sus mejores cosechas y alto rendimiento entre 3500 y 3800 msnm (18). Los rendimientos de la mashua supera a la papa de dos por uno y crece en suelos pobres y sin fertilizantes (19).

2.2.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

La Mashua tiene la siguiente clasificación taxonómica: (20).

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*)

Nombre botánico	<i>Tropaeolum tuberosum</i>
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Brassicales</i>
Familia	<i>Tropaeolaceae</i>
Género	<i>Tropaeo/um</i>
Especie	<i>Tuberosum</i>

2.2.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Es una planta herbácea de 20 a 80 cm de alto, de tallos aéreos, cilíndricos y delgados de 2 a 4 mm de diámetro, ramificados de color púrpura. Tiene hojas de color verde oscuro brillante en el haz y verde claro en el envés, las flores son solitarias de diferentes colores que van de anaranjadas o rojizas (18).

2.2.4. MORFOLOGÍA

Las plantas de mashua es un cultivo anual de porte erecto y semi postrado que está formado de raíz, tallo, hojas, flores y frutos.



Figura 1: Planta de mashua (5).

- a) **Tallos:** Los tallos son de forma cilíndrica; su crecimiento es recto o en posición semi postrada y presenta ciertas ramificaciones de color violeta oscuro (5).
- b) **Hojas:** La Mashua tiene hojas delgadas con forma redondeada de color verde oscuro brillante en el haz y un poco más claras en el envés, lo que les permite tener un follaje compacto. Las hojas tienen una forma redondeada. (5).



Figura 2: Tallo y hojas de mashua (5).

- a) **Flores:** Las flores son de varios colores que van desde las tonalidades amarillas o anaranjadas hasta un rojo oscuro, con cinco sépalos rojos y cinco pétalos amarillos. Tienen entre 8 y 13 estambres y el tiempo en que las flores permanecen abiertas es entre 9 y 15 días (5).



Figura 3: Flor de mashua (5).

- c) **Tubérculos:** Son cónicos, alargados y de yemas profundas; miden entre 5 y 15 cm de largo y poseen una textura arenosa debido al elevado contenido de carbohidratos y agua. Sus colores son

variados, tales como el amarillo, anaranjado, blanco, rojo, morado, gris y negro. Su sabor es picante (5).



Figura 4: *Tubérculo de mashua* (5).

2.2.5. GENERALIDADES DE CULTIVO

- a) Suelos:** Los sectores más adecuados para el cultivo de la mashua, se encuentran desde los 2400 a 3 700 metros sobre el nivel del mar, especialmente donde predominan los suelos negro-andinos. Este cultivo prefiere suelos profundos y con un buen contenido de materia orgánica (5).
- b) Clima:** El área adecuada para el cultivo de la mashua, es la misma que se requiere para el cultivo de la papa, es decir con una temperatura media anual que fluctúe entre los 6° y 14° Celsius, con una precipitación lluviosa de alrededor de 700 a 1200 milímetros anuales (7 000 a 12 000 metros cúbicos de agua por ciclo) (5).

2.2.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MASHUA

Debido a la cantidad de agua variable entre especies, 86% y 92% (21). Es necesario expresar los valores en base a la materia seca, o presentar de manera simultánea el contenido de humedad (7). Señalan que muchos datos publicados carecen de utilidad, porque se ha omitido este importante aspecto.

Es importante señalar que otros factores aparte de la variabilidad genética como son las prácticas culturales, el clima y el tipo de suelo, pueden influir en las características del material en estudio (7). La composición química se muestra en la tabla 02.

Tabla 2: Composición química de mashua (22).

Parámetro	Unidad	Valor
Humedad	g	85.26
Cenizas	g	0.5
Proteína	g	0.7
Fibra dietética	g	2.9
Carbohidrato total	g	10.6
Carbohidrato disponible	g	7.7
Grasas totales	g	0.1
Ca	mg	0.006
Fe	mg	0.37
Zn	mg	0.28
Energía	Kcal/100g	32.00
Vitamina C	mg	42.06
Tiamina	mg	0.02
Rivoflavina	mg	0.03
Niacina	mg	0.82
Vitamina A	mg	0.012

2.2.7. VALOR NUTRITIVO DE MASHUA.

Este tubérculo posee un alto contenido en carbohidratos y calorías, y relativamente alto en proteínas y fibras. Además, es rico en vitaminas A y C. La mashua se la consume como complemento nutricional con otros tubérculos como las ocas, mellocos y papas, además posee varios aminoácidos esenciales para el cuerpo humano (23).

La mashua en comparación con la jícama, el miso y la achira presenta un mayor contenido de proteína, los carbohidratos como el azúcar y almidón se distribuyen equitativamente, es rica en caroteno que fortalece el sistema inmunológico, ayudando a su vez a aumentar las defensas (23).

2.2.8. ALIMENTOS FUNCIONALES

Los alimentos funcionales son aquellos que contienen componentes biológicamente activos que ejercen efectos beneficiosos y nutricionales básicos en una o varias funciones del organismo y que se traducen en una mejora de la salud o en una disminución del riesgo de sufrir enfermedades (24) (25). El término Alimento Funcional fue propuesto por primera vez en Japón en la década de los 80's con la publicación de la reglamentación que se refiere a aquellos alimentos procesados los cuales contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano, más allá de su contenido nutricional (26).

2.2.8.1. APLICACIÓN DE LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

- a) **Regulación de los procesos metabólicos básicos:** Una alimentación balanceada influye en todos los procesos metabólicos debido a que esto se expresa en función de su aporte energético y a su contenido de hidratos de carbono, grasas y proteínas. Esto es muy importante para distintas enfermedades crónicas, como la obesidad y la diabetes tipo 2, el cual se asocian con enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial respectivamente (27).
- b) **Defensa contra el estrés oxidativo:** Los estudios científicos han demostrado que los radicales libres se encuentran relacionados en diferentes procesos bioquímicos que causan daño celular (27). El campo de radicales libres ha sido objeto de expansión masiva en los últimos años. Nuevas datos indican que la generación biológica y la reactividad de los oxidantes se aprovechan para regular numerosos procesos fisiológicos (28).
- c) **Fisiología cardiovascular:** Las enfermedades cardiovasculares están siendo originadas por varios factores que pueden tener relación con la grasa ingerida. La respuesta clínica se produce a largo plazo, aunque el problema se puede iniciar en la infancia (29). Las enfermedades los lípidos de la dieta. Pueden estar libres o esterificados, unidos a otras moléculas o formando compuestos más complejos (29). Este tipo de ácidos tienen propiedades curativas y determinadas funciones fisiológicas y actividades biológicas que van más allá de su papel establecido con el crecimiento, el desarrollo y otras funciones normales del cuerpo. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICL) se han ganado un espacio en el mercado considerablemente alto como un suplemento dietético o nutracéutico (30). Los AGPICL son componentes dietarios que participan en múltiples procesos fisiológicos, donde cumplen un rol estructural en los fosfolípidos de las membranas celulares y son sustratos para la síntesis de diversos mediadores fisiológicos (29).

- d) Fitoesteroles:** Los fitoesteroles son un tipo de compuestos naturales derivados de las plantas, comparten similitud estructural con el colesterol que es el esteroles predominante en animales incluyendo seres humanos. Estos a su vez se clasifican como lípidos funcionales (31). Las mejores fuentes alimenticias se encuentran en los aceites vegetales incluyendo las nueces y el aceite de oliva, así como los granos enteros y las legumbres (32).

Estos componentes estructurales y funcionales de las membranas celulares de las plantas, son uno de los componentes de la dieta que tienen la capacidad de hacer la absorción del colesterol ineficiente. Muchos ensayos clínicos han demostrado que los fitoesteroles incorporados en diversos alimentos a dosis de aproximadamente 2 g. día⁻¹ reduce sistemáticamente los niveles de colesterol LDL en casi un 9% (33).

2.2.9. COLORANTES NATURALES

Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las que afectan a los colorantes artificiales (34).

En sentido estricto, solo sería natural el color que un alimento tiene por sí mismo. Esto puede generalizarse a los colorantes presentes de forma espontánea en otros alimentos y extraíbles de ellos, pero puede hacer confusa la situación de aquellas sustancias totalmente idénticas pero obtenidas por síntesis química. También la de colorantes obtenidos de materiales biológicos no alimentarios, insectos, por ejemplo, y la de aquellos que pueden bien añadirse o bien formarse espontáneamente al calentar un alimento, como es el caso del caramelo (34).

2.2.10. LAS ANTOCIANINAS

Las antocianinas representan un grupo muy amplio de compuestos fenólicos vegetales, estos son los pigmentos hidrosolubles rojos, azules y púrpuras de las flores, frutas y verduras. Estas poseen una estructura básica en común, químicamente son glicósidos de las antocianinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico (34).

La estructura química básica de estas agliconas es el ión *flavilio*, también llamado 2-fenil-benzopirilio (35).

Que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión (34).

Las antocianinas son compuestos fenólicos, de la familia de los flavonoides, colorantes naturales ampliamente distribuidos en frutas, bayas y flores, ofreciendo atractivos colores, como naranja, rojo y

azul. Estos pigmentos son solubles en agua y esta propiedad facilita su incorporación en numerosos sistemas alimentarios acuosos. Estas cualidades hacen que las antocianinas sean colorantes naturales atractivos (36).

El interés por los pigmentos antociánicos en investigaciones científicas se han incrementado en los últimos años, debido no sólo al color que confieren a los productos que las contienen sino en la reducción de las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes, efectos antiinflamatorios, mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo; estos efectos terapéuticos positivos, están principalmente asociados con sus propiedades antioxidantes (36).

Las antocianinas representan los principales pigmentos solubles en agua pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, el cual consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos (36).

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, la delfinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas (34).

2.2.10.1. Estructura química

La estructura básica de las antocianinas es el 2-fenilbenzopirilo de la sal de flavilio (figura 5). Las antocianinas existen como glucosidos de polihidroxi/polimetoxi derivados de la sal. Difieren en el número de grupos hidroxilo y/o metoxilo presentes, sitio, tipo y numero de uniones de los azucars a la molécula, además del tipo y numero de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a los azucars. Los azucars más comunes son glucosa, galactosa, arabinosa y xilosa. Estos azucars puedes encontrarse en forma de di y trisacáridos formados por la combinación de las mismas. Los ácidos mayormente encontrados son el ácido cafeico, p-cumárico, sináptico, p-hidrixibenzoico, ferúlico, malónico, succínico y acético (37).

Cuando el azúcar es hidrolizado de la antocianidina, el producto es una aglicona denominada antocianidina, de las cuales existen diversa en la naturaleza. Las antocianidinas más importantes son 6 (figura 7): pelargonidina, clanidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvinidina. Cada una de ellas genera una intensidad de rojo diferente. El incremento de color es originado por la presencia de grupos auxóchromos, los cuales se caracterizan por ser electrodonadores, y cuando están en contacto con la antocianina producen el efecto mencionado (38).

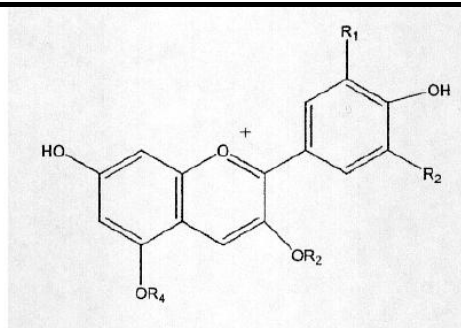
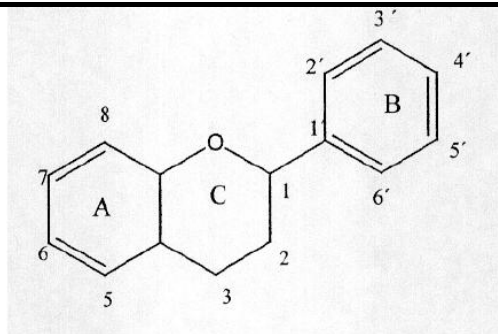


Figura 5: Estructura general de la antocianina, núcleo flaván (37).

Figura 6: Estructura de antocianina, catión flavilio (38)

Debido a la poca solubilidad de las antocianinas en agua, estas no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glicosilada (antocianidinas). En esta estructura encontramos que el grupo hidroxilo de la posición 3 está siempre glicosilada, lo que le dará estabilidad y solubilidad al cromoforo. En cuanto a los residuos de glucosa, estos siempre estarán acilados en su posición 6 (39).

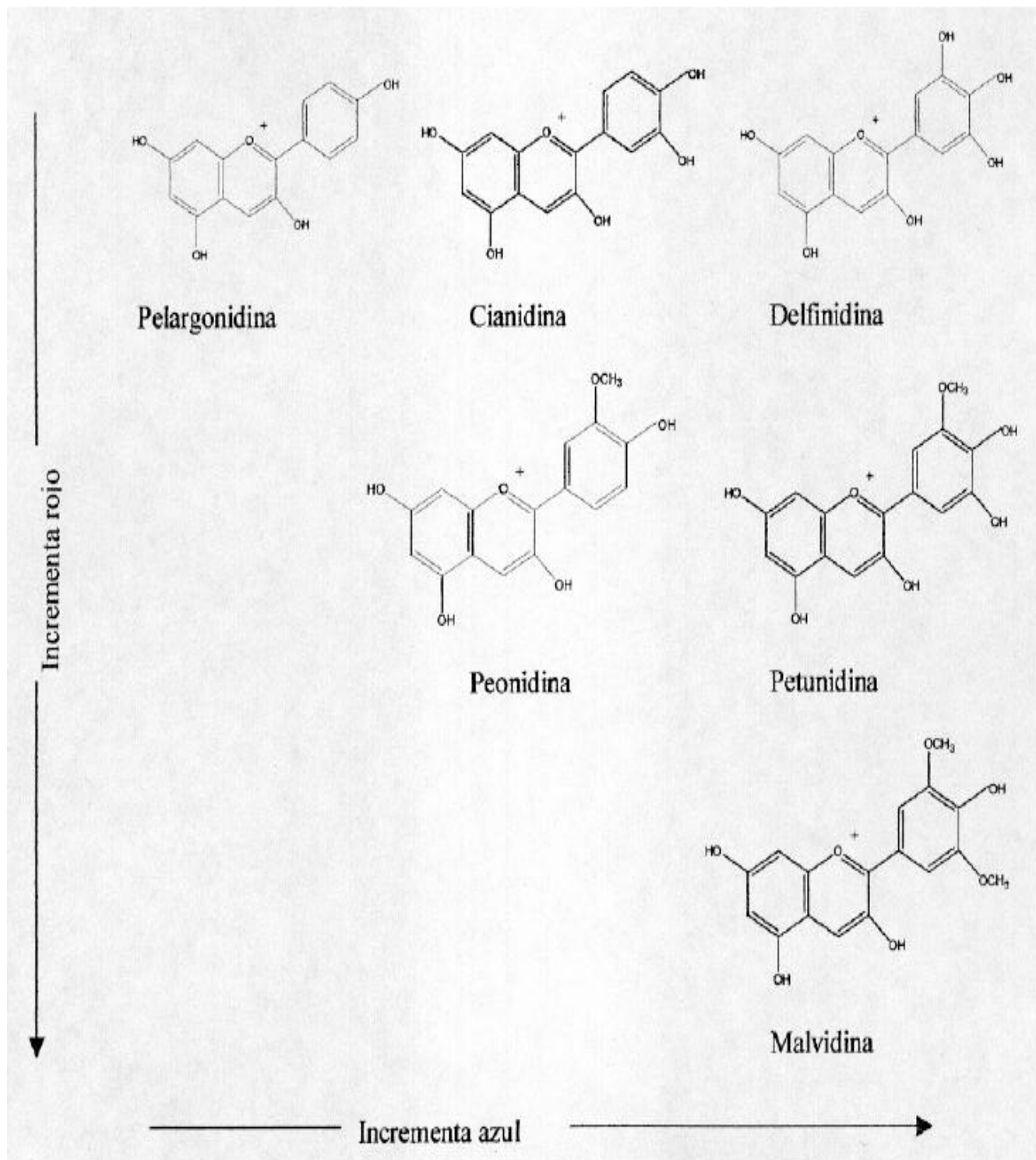


Figura 7: Estructura de las diferentes antocianinas (38).

2.2.10.2. Estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas son sustancias relativamente estables únicamente en medio ácido. Se degradan cambiando el color, por el pH, el calor, oxígeno, luz, hidrólisis de gliconas, sulfitos, ácido ascórbico, degradación enzimática y no enzimática (40).

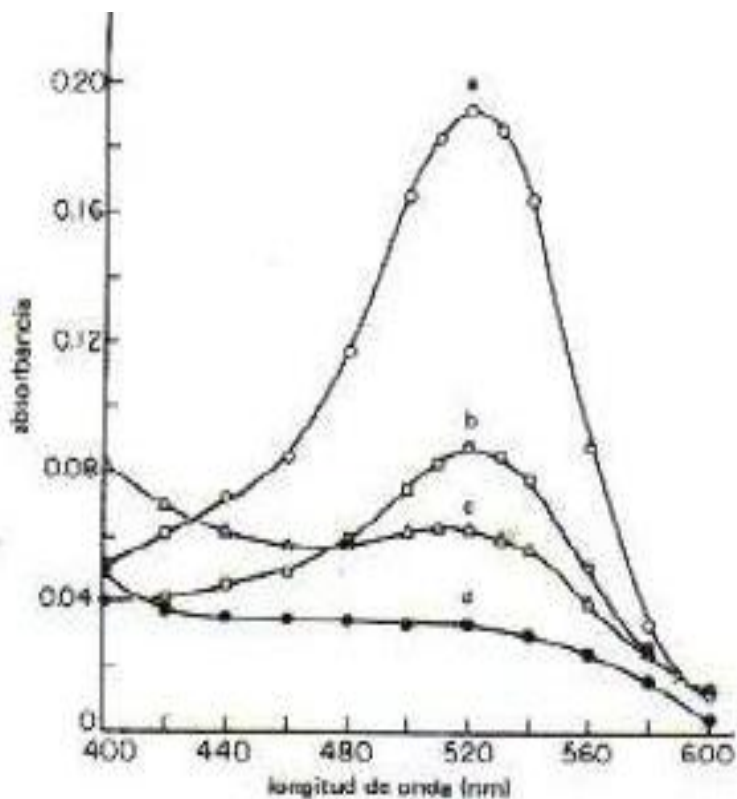


Figura 8: Relación de absorbancia y longitud de onda en antocianinas (34).

- a) **pH:** Este parámetro es uno de los principales factores del medio que hace que la molécula pueda mantener su color. En condiciones ácidas conserva un color intenso, ya que existirá un equilibrio entre las cuatro estructuras de la misma (41). La protonación de la base quinoidal azul origina al catión flavilio rojo, que al hidratarse produce la pseudobase carbinol incolora, la cual existe un equilibrio con su chalcona incolora también (41).

En soluciones muy ácidas ($\text{pH} < 0.5$) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de pH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base incolora del carbinol incolora. Entre pH 4 y 5.5 habrá poco color, ya 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 (41) (40). Con esto se sabe que una de las desventajas de las

antocianinas como colorantes de alimentos es la ausencia de color a soluciones ligeramente ácidas o neutras (41).

- b) **Temperatura:** La estabilidad de la antocianina está directamente relacionada con la temperatura, las conversiones estructurales de las antocianinas son relaciones endotérmicas. Resisten bien los procesos térmicos a alta temperatura –corto tiempo. Por efecto del calor (a temperatura por encima de 60 °C) se degradan según una cinética de primer orden. En general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidrolizadas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (38).

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 (34).

Las antocianinas también cambian de color cuando forman complejos con otros compuestos fenólicos (proantocianidinas, catequinas, taninos y flavonoides) o con algunos polisacáridos, ya que se favorece un desplazamiento de la absorción a longitudes de onda mayores (34).

- c) **Luz:** Se ha reconocido que la luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución de hidroxilo en C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación. Sin embargo, la copigmentación puede retrasar esta fotodegradación, cuando esta se presenta con flavonas pilihidroxiladas, isoflavonas y auronas asulfonadas (42).
- d) **Oxígeno:** El oxígeno molecular hace muy susceptible a la molécula insaturada de la antocianina. Las antocianinas son rápidamente oxidadas y degradadas cuando estas se encuentran principalmente en su forma quinoidal (40). Por lo tanto la remoción de dicho oxígeno genera una prevalencia más amplia del color, por lo que el procesamiento de los alimentos con antocianinas se lleva a cabo bajo condiciones de vacío o nitrógeno (38).
- e) **Metales:** los complejos con metales son características de cada una de las plantas, con los cuales se determina un espectro de colores único de cada una de ellas. Iones metálicos tales como el aluminio, estaño y hierro pueden formar complejos con las antocianinas que contengan grupos hidroxilo en el anillo fenólico. El acomplejamiento puede formar efectos batocrómicos hacia el azul con el hierro y aluminio (38).

Se ha demostrado que el acomplejamiento con metales puede incrementar y estabilizar el color de las antocianinas en los alimentos, pero los mismos pueden también provocar pérdidas del color, ya que considerando la habilidad de los metales como cobre y hierro de actuar como catalizadores redox generan un resultado neto negativo (39).

- f) **Azúcares:** los azúcares a altas concentraciones estabilizan a las antocianinas (43). Esto es debido a que a altas concentraciones se tiene una baja actividad de agua, que es uno de los factores de degradación de las antocianinas, por el ataque nucleofílico al catión flavilio que ocurre en el C-2 tomando la base carbinol incolora, por otro lado, cuando los azúcares están en bajas concentraciones no tendrán efecto sobre la actividad del agua, provocando que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleren la degradación de las antocianinas (44).
- g) **Agua:** El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación (43).

Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las antocianinas (45).

Dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas, resulta conveniente su eliminación para disminuir las probabilidades de ataque nucleofílico al catión flavilio (43).

2.2.10.3. Importancia y propiedades de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos considerados fisiológicamente activos y/o promotores de la salud desde que su contribución a la buena salud y la reducción de enfermedades crónicas ha sido científicamente documentada. Entre las principales propiedades destacan:

a. Propiedades anticancerígenos.

Según los estudios de la Universidad del Estado de Ohio (EE.UU.), la antocianina juega un rol importante en la prevención de la degeneración de células de órganos en mamíferos y humanos. En combinación con el ácido elálgico desarrolla una potencia preventiva contra ciertos tipos de cáncer (46).

b. Actividad antioxidante

Es evidente que las antocianinas encontradas en frutas y verduras, tienen propiedades antioxidantes potentes en el combate de los radicales libres (46). Compararon las propiedades antioxidantes de las antocianinas con antioxidantes ampliamente conocidos y encontraron mayor capacidad en comparación a la vitamina E, ácido ascórbico y B-caroteno. El tipo y la pigmentación tienen gran influencia en el contenido de actividad antioxidante (47).

c. Prevención de otras enfermedades

Su labor fundamental es la protección de los capilares de la retina, desempeñando un papel fundamental en la conservación de la buena vista, facilita la regeneración de la purpura retiniana, mejora la visión nocturna y la agudeza visual. Además parecen tener propiedades antivirales, hemostáticas, por lo que pueden desempeñar un papel positivo en las infecciones y la detención del sangrado. Protegen el corazón de las enfermedades cardiovasculares (47).

d. Propiedades farmacológicas

Las antocianinas poseen conocidas propiedades farmacológicas utilizadas para la terapia de un amplio espectro de enfermedades. Las investigaciones realizadas con extractos de *Vitis vinífera* ricos en antocianinas, han mostrado efectos antiinflamatorios y actividad anti edema (48).

En la actualidad no se ha reportado toxicidad de antocianinas, por lo que se consideran inofensivas para la salud, siendo una alternativa potencial como un aditivo seguro y afectivo, además de su poder terapéutico (49).

Las antocianinas son consideradas como colorantes potenciales en la industria alimentaria, sin embargo, no han sido extensivamente usadas por su inestabilidad inherente, baja fuerza tintorial, propiedades organolépticas del material vegetal, así como también la dificultad de la purificación, su limitada disponibilidad comercial y la posible precipitación de combinación de antocianinas con proteínas (48).

2.2.11. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas: por tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de solventes ácidos como se muestra en el siguiente cuadro (50).

Tabla 3: Métodos de extracción de antocianinas (50).

MÉTODO	CARACTERÍSTICAS
0.001% HCl en metanol	Este método 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 etanol.
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 ₂	La extracción es mejor que la obtenida por el uso de la extracción tradicional los cuales implica sistemas de etanol ácido acético: agua.

También para la extracción de estos pigmentos se ha utilizado la maceración del tejido en ácido fórmico-metanol 2 a 10%, ácido clorhídrico 1 a 3% o ácido trifluoro acético-metanol 0.5 a 3% (51). Otro método de extracción utilizado es la extracción mediante una solución de agua acetona (30.70 v/v), el cual se agrega la muestra y es re-extraída con la misma hasta obtener una sustancia clara, realizando filtrados combinados llevándolos a una pera de decantación agregándose cloroformo, es recolectada la porción acuosa y colocada en un rotavapor Buchi a 40°C durante 5 a 10 minutos, hasta evaporar la acetona residual (52)

De las técnicas fotoquímicas, como las cromatografías en papel (CP), capa fina (CCP), columna (CC) y gas líquido (CGL) el color y comportamiento en las cromatografías (polaridad) proporcionan datos relevantes para su separación e identificación (valores de Rf). Para completar la identificación existen técnicas físicas como la espectrofotometría de ultravioleta – visible (UV-Vis), espectrofotometría de masas, resonancia magnética nuclear y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): y en otras menos usadas como polarografía y ESR (Electron Spin Resonance). (51)

2.2.12. CARACTERIZACIÓN DE ANTOCIANINAS

Los análisis de antocianos se realizan frecuentemente por técnicas cromatográficas, como la cromatografía líquida de alta resolución con detección por fotodiodos (HPLC-DAD). Por el alto precio de los reactivos necesarios y el tiempo de análisis de muestra, cercano a los 75 minutos, como por la necesidad de personal experto en la técnica (50). Teniendo en cuenta que esta técnica presenta varias ventajas, el fenómeno de absorción es más intenso por lo que se requieren muestras menores, el equipamiento es más sencillo y de uso más flexible y por último no presenta interferencias con otros fenómenos físicos (por ejemplo, la fluorescencia).

Esta técnica también presenta una mejor relación señal/ruido ya que la luz no pasa por un monocromador, se miden todas las frecuencias a la vez lo que da mucha mayor rapidez, puede tener una resolución de menos de 0.01 cm^{-1} , y los espectros pasan necesariamente por una computadora lo que facilita el análisis y manejo espectral (50).

Actualmente los espectrofotómetros FT-IR han desplazado a espectrofotómetros con monocromador (dispersivos).

- a. **Métodos espectrales.** Una antocianina pura en metanol tiene dos absorciones máximas importantes, una en el espectro visible en el rango de 465 a 550 nm y una pequeña en la región ultravioleta cerca de los 275 nm. La absorción máxima en el espectro visible da una clara indicación de su patrón hidroxilado de una antocianidina derivada de una antocianina. Por ejemplo, la pelargonidina tiene un máximo en 520 nm, la cianidina de 535 nm y la delphinidina a 546 nm. La introducción de una molécula de azúcar en la posición 3 de la antocianidina tiene un cambio hipsocrómico en el espectro (53).

Las dos clases más comunes de antocianinas, la -3- y 3,5-diglucósido, tienen similar espectro de absorción máximo pero muestran diferencias de intensidad en el rango de los 400 a 460 nm. De este modo, -5- y 3,5-glucósidos tienen solo un 50% de absorción a 440 nm cuando se compara con su correspondiente -3-glucósido. Los pigmentos que contienen azúcares en las posiciones 5,7 y 3,7 tienen diferentes absorciones máximas y pueden ser fácilmente distinguidos. El espectro de una antocianina acilada muestra dos picos en la región ultravioleta debido a la superposición de la absorción del grupo acilado. La presencia de un nuevo pico entre los 310 a 350 nm indica la acilación aromática (53). Los métodos espectrales no son considerados suficientes para la absoluta caracterización de la naturaleza de las antocianinas y la posición de la glucosilación. Otros análisis químicos son necesarios para establecer la estructura de la antocianina.

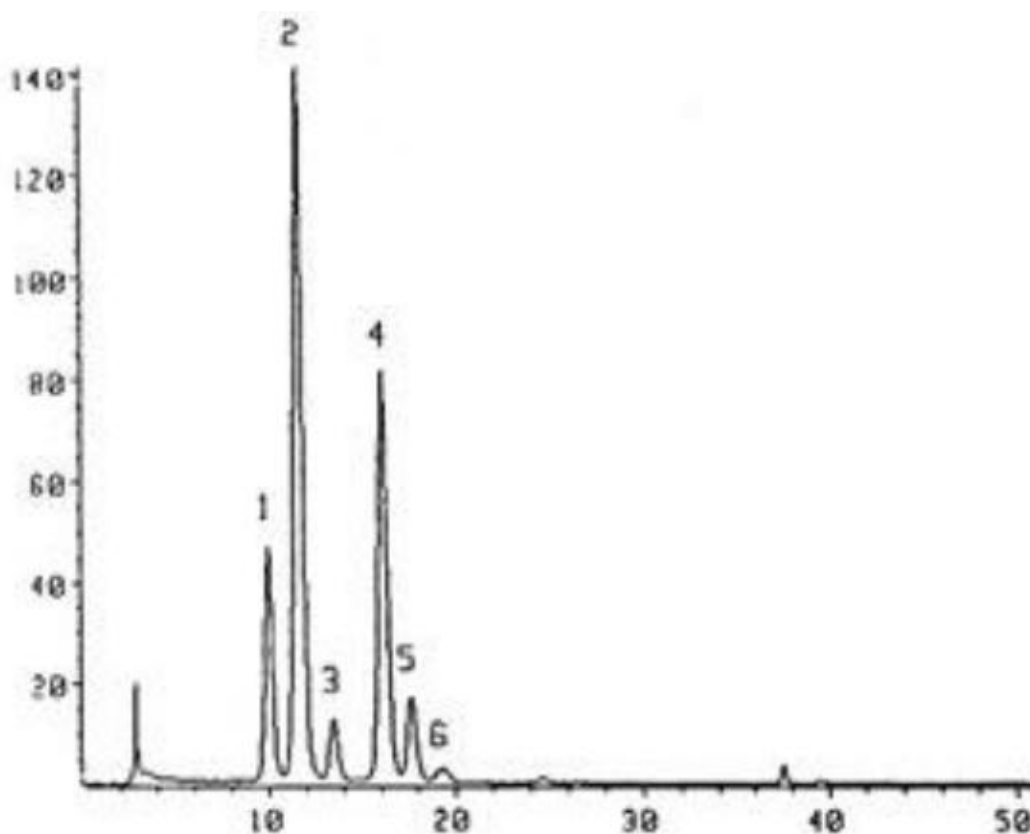
b. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Desde el trabajo de Mnaley y Shubiak 1975, quienes fueron los primeros en aplicar la HPLC a análisis de antocianinas, numerosas técnicas de HPLC han sido desarrolladas para la separación y cuantificación de antocianinas y antocianidinas. Hoy en día la HPLC ha llegado a ser el método de elección debido a que esta ofrece la ventaja de ser un método rápido, sensitivo y cuantitativo. La cuantificación de cromatogramas es, sin embargo, complicado por la falta de disponibilidad de estándares puros de antocianinas. Aunque en el pasado algunos estándares de antocianinas han estado comercialmente disponibles, en muchos casos el aislamiento preparativo de antocianinas puras es todavía necesario. Dicho de otra manera, esto es una práctica común que solamente un estándar de antocianina es usado (malvidina 3-glucósido) y que todos los otros picos de antocianinas son cuantificados en contra de este estándar. Como hay diferencias considerables en los valores cuantitativos de absorbancia y la absorción máxima, esta práctica dará ligeramente resultados incorrectos (54). La separación por HPLC de antocianinas ha sido llevada a cabo casi exclusivamente en columnas C18. Ocasionalmente columnas de sílice enlazadas con octil (C8) y hexil (C6) han sido también usadas. El promedio de diámetro de partícula de los empaques para HPLC es típicamente entre 3 y 10 μm , con 5 μm siendo el más frecuentemente usado. En la RP-HPLC las antocianinas eluyen de acuerdo a sus polaridades (delfinidina<cianidina<petunidina<pelargonidina<peonidina<malvidina). Sistemas solventes para análisis de antocianinas por HPLC siempre incluyen un ácido para alcanzar valores bajos de pH (< 2.0), el cual asegura que la mayoría de las antocianinas están presentes en forma del catión rojo flavilium. El ácido fórmico (hasta 10%) es más ampliamente usado. Este es, sin embargo, bastante corrosivo y el ácido perclórico y el ácido trifluoroacético son igualmente agresivos. Comúnmente alternativas usadas son el ácido acético 15%, el ácido fosfórico 3-4%, el buffer de fosfatos. Esto debe, sin embargo, ser considerado que el uso prolongado de solventes más ácidos que pH 2 pudieran resultar en una pobre reproducibilidad y corta vida de uso de la columna debido a la pérdida de fases de enlace de la superficie del soporte de sílice de la fase estacionaria (54).

Las eluciones de antocianinas son monitoreadas con sistemas de detección UV-Vis o matriz de fotodiodo. Usualmente la longitud de onda de detección es fijada en el rango de entre 510 y 545 nm. Dependiendo de la sensibilidad del sistema detector y del pigmento antocianina, un límite de detección de 0.5-1.0 mg/L de antocianina puede ser asumido generalmente. La identificación de antocianinas puede ser llevada a cabo por cromatografía de conocimiento, estándares disponibles o basados en tiempos de retención, los cuales son comúnmente comparados con datos de la literatura. Por escaneo del espectro de absorción en línea, detección de matriz de fotodiodo hacen una caracterización estructural adicional de posibles pigmentos. Químicamente las antocianinas pueden

ser identificadas por hidrólisis ácida y la subsecuente determinación de la antocianidina y el azúcar mayoritario o por una hidrólisis alcalina suave y la subsecuente determinación del componente acil. Además de la elucidación de la estructura, especialmente para antocianinas aciladas, puede ser confirmada por espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos y espectroscopia NMR (54).

Cuando las muestras contienen altas cantidades de material de interferencia (azúcares, coloides) un procedimiento de limpieza de muestra es recomendado. Una preparación de muestra con cartuchos de extracción de fase sólida (C18) fue encontrado a ser bastante útil y efectivo. Previo al análisis por HPLC todas las muestras deben ser filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 μm o más pequeño (54).

Para demostrar el potencial de esta técnica una separación por RP-HPLC de jugo de grosella negra es mostrado en la Figura 9. A pesar de los altos costos de adquisición y mantenimiento, la técnica por RP-HPLC probablemente permanecerá como el mejor método calificado para análisis de antocianinas comparada con otros métodos, tiempos de análisis más cortos, mejor selectividad, alta versatilidad y mejor sensibilidad.



- Pico 1 = delphinidina 3-glocósido;*
Pico 2 = delphinidina 3-rutinósido;
Pico 3 = cianidina 3- glucósido;
Pico 4 = cianidina 3-rutinósido;
Pico 5 = pelargonidina 3-glucósido (= int. Std);
Pico 6 = pelargonidina 3-rutinósido (54).

Figura 9: Separación por RP-HPLC de Jugo de Grosella Negra.

2.2.13. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS

Considerando el pH como uno de los principales factores de medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH también varían y ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas. La concentración de antocianinas se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Teniendo en cuenta dos bandas de absorción de la región UV (260-280 nm) y la región visible (490-550 nm) para este tipo de compuestos. Los resultados se expresan con pigmentos de antocianinas manométricas, generalmente expresados como cianidina-3-glucosido (50).

El método de pH diferencial 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, el empleo de un agente blanqueador, bisulfito, y la medición por espectroscopia de UV-Vis. Este

último consiste en el uso de un agente blanqueador que decolorara a las antocianinas sin afectar a los compuestos interferentes. Se obtiene una medida de la absorbancia máxima en la región visible, seguida por la decoloración. Los agentes blanqueadores más empleados son sulfito de sodio y peróxido de hidrogeno (50).

2.2.14. CAROTENOIDES

Los carotenoides están ampliamente distribuidos entre las plantas, ciertas bacterias y animales, son pigmentos naturales sintetizados por las plantas y microorganismos fotosintéticos, algunos de los cuales, al igual que el caroteno, son precursores de la vitamina A. (55). Están presentes en forma de microcomponentes en frutas y verduras y son responsables de los colores amarillo, naranja y rojo. Al igual que en caso de los compuestos fenólicos, hay investigaciones que avalan que los carotenoides son responsables de las propiedades beneficiosas que presentan las frutas y verduras en la prevención de enfermedades humanas, incluyendo las enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas, además de ser importantes en la dieta como fuentes de vitamina A. (56).

Los carotenoides son compuestos liposolubles que se asocian con las fracciones lipídicas. Desde el punto de vista químico, los carotenoides son compuestos del tipo poliisoprenoides y se puede dividir en dos grupos principales: (a) carotenos o carotenoides hidrocarburos, ellos sólo se componen de átomos de carbono e hidrógeno y (b) xantófilas, que son derivados oxigenados de hidrocarburos que contienen al menos un oxígeno, tales como la hidroxilo, ceto, grupos de ácido epoxi, metoxi o carboxílicos. Su característica estructural es un sistema de dobles enlaces conjugados, lo que influye en sus propiedades químicas, bioquímicas y físicas (57).

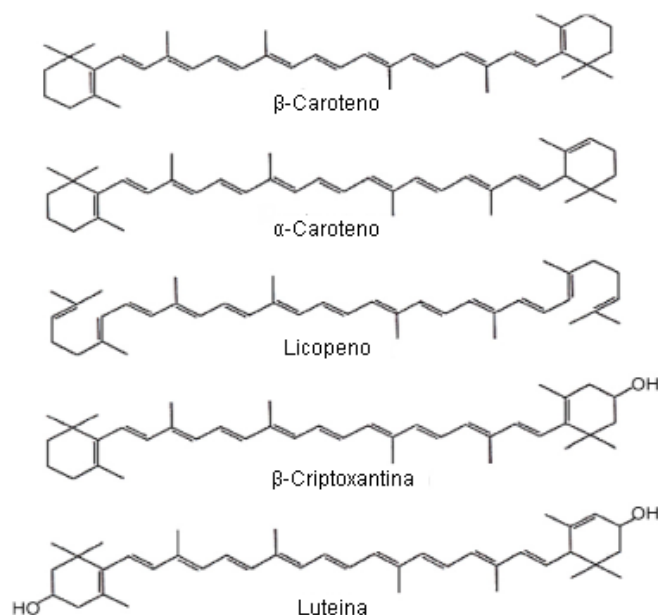


Figura 10: Estructura de algunos carotenoides importantes (57)

Las estructuras de algunos carotenoides comunes se muestran en la Figura 10; actualmente hay más de 800 carotenoides naturales conocidos, cada uno de los cuales pueden formar varios isómeros *cis-trans* y pueden ser objeto de nuevas modificaciones. Químicamente, la mayoría de los carotenoides son tetraterpenos C₄₀ (H), constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. A menudo, este esqueleto básico carbono C₄₀ está bien conservado, o se encuentra ligeramente modificado, por ejemplo, por ciclación en uno o ambos extremos. Sin embargo, las modificaciones son mucho más amplias, incluyendo isomerización, reordenación de los dobles enlaces, la introducción de oxígeno conteniendo grupos funcionales y su glicosilación o acilación (57).

Las acciones antioxidantes de los carotenoides se basan en sus propiedades de extinción del oxígeno singlete y su capacidad para atrapar los radicales piróxilos (56). La mejor acción antioxidante documentada de los carotenoides es su capacidad de extinguir al oxígeno singlete. Esto resulta en un carotenoide excitado, que tiene la capacidad para disipar energía recientemente adquirida a través de una serie de interacciones de rotación y de vibración, por lo tanto se produce la regeneración de los carotenoides a su forma original y así puede ser reutilizado para nuevos ciclos de extinción del oxígeno singlete. La actividad extintora de un carotenoide depende en gran medida del número de dobles enlaces conjugados de la molécula y se ve influenciada, en menor medida, por los grupos finales de carotenoides (cíclico o acíclico) o la naturaleza de los sustituyentes en los carotenoides que contienen grupos cíclicos

finales. El licopeno (once conjugados y dos dobles enlaces no conjugados) es uno de los extintores de oxígeno singulete más eficiente dentro del grupo de los carotenoides naturales (58).

La composición de carotenoides en las plantas puede verse afectada por muchos factores, es decir, cultivar, origen geográfico, el grado de madurez y las condiciones del proceso, de otro lado, la estabilidad de los carotenoides se ve afectada por diferentes tratamientos de secado (10), encontraron que sólo el 10 por ciento de pérdida de carotenoides se produjo cuando se sumergen en una solución de sulfito de sodio antes del secado con aire caliente. Sin embargo, una pérdida del 50 por ciento de los carotenoides se muestra para el tratamiento sin remojo. La estabilidad de carotenoides varía también con el procesamiento, el cocinado y esterilizado, y el tiempo de almacenamiento (59).

2.2.15. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La capacidad antioxidante (CAOX) de los alimentos depende de muchos factores, incluyendo las propiedades de los sustratos, las condiciones y etapas de la oxidación y, la localización de los antioxidantes en diferentes fases: hidrofílica o lipofílica (60). De otro lado la CAOX medida en una muestra también depende de la tecnología empleada, del generador de los radicales libres u agente oxidante que se utiliza en la medición y, de las condiciones de ensayo (61).

Se ha evaluado la capacidad de diferentes antioxidantes en numerosos estudios por diferentes métodos y en diferentes condiciones, pero muy a menudo hay una falta de correlación entre los resultados encontrados para las CAOX determinadas en el mismo material por diferentes ensayos y entre las capacidades determinadas por el mismo ensayo en laboratorios diferentes. Esto es comprensible, dada la presencia de varias especies activas, las características de la reacción y los mecanismos que están implicados en el proceso oxidativo, haciendo que no exista un método simple universal por el cual se puede evaluar con precisión la CAOX y cuantificarla (61).

Según Huang *et al.* (2005), los métodos para medir la CAOX se clasifican básicamente en dos grupos dependiendo del mecanismo de reacción así se tiene a los métodos basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) y métodos basados en la transferencia de electrones (TE). La mayoría de los ensayos basados en TAH aplica un esquema competitivo en el cual el antioxidante y el sustrato compiten por estabilizar a los radicales generados (ejemplo: radical peroxilo) a través de la donación de un átomo de hidrógeno. Los ensayos basados en la TE miden la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce (62); así, el grado de cambio de color se correlaciona con las concentraciones de antioxidantes de la muestra (63).

2.2.16. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

La cantidad de métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante son variados y acorde pasan los años se muestran métodos aún más sofisticados para la evaluación, a continuación se muestran 4 métodos más usados.

- a) **Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo):** La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es un radical libre estable en medio metanólico por tener un electrón desapareado sobre su molécula que no se dimeriza. La deslocalización del electrón intensifica su color violeta intenso, el cual absorbe a 515 nm al reaccionar con el sustrato antioxidante, por que éste le dona un átomo de hidrógeno y su color violeta se desvanece, este cambio de color en absorbancia es cuantificado como capacidad antioxidante TEAC DPPH después de 30 a 120 minutos de reacción redox (64).

El Fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al, DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (65).

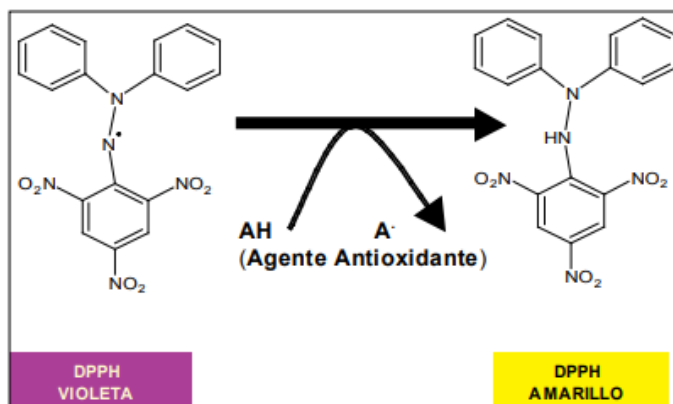


Figura 11: Método del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (65).

- b) **Método ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate):** El método de inhibición de radicales ABTS fue desarrollado por Rice-Evans y Miller en 1994 y fue luego modificado por Re *et al.*, en el año 1999. El método para la detección de la CAOX se informa como un ensayo de decoloración. El radical mono catión preformado el 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS•+) se genera por la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de donantes de hidrógenos antioxidantes (66).

El catión $ABTS^{\bullet+}$, que es intensamente coloreado, disminuye de color al reaccionar directamente con el antioxidante. La CAOX se mide como la capacidad de los compuestos de ensayo para disminuir el color al reaccionar directamente con los radicales $ABTS^{\bullet+}$ (67). y se mide espectrofotométricamente a 734 nm (68).

El trolox, un análogo hidrosoluble de la vitamina E, se utiliza como control positivo. La actividad se expresa en términos de la capacidad antioxidante equivalente trolox del producto (TEAC/g o L) (68).

- c) **Método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity):** La actividad antioxidante se cuantifica de acuerdo a la metodología descrita por Cao et al. (1993), la que posteriormente fue modificada por Ou et al. (2001). El método se basa en la medición de la fluorescencia de una molécula a la que se le somete a la acción de un generador de radicales libres (como el AAPH (2,2'-azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride)). A medida que la molécula fluorescente es atacada y dañada por los radicales peroxil va perdiendo su fluorescencia. La labor de los antioxidantes es la de proteger la molécula y cuanto más CAOX tiene un compuesto o alimento más se preserva la capacidad de emitir luz fluorescente de la molécula en cuestión. El grado de protección se mide con un medidor de fluorescencia (69).

Los valores de ORAC se expresan generalmente como equivalente Trolox. El ORAC ha sido adaptado para medir los antioxidantes lipofílicos, así como hidrofílicos y en la actualidad el ensayo ORAC se ha automatizado (70). En este ensayo los radicales peroxilo reaccionan con un agente fluorescente para formar un producto no fluorescente, el cual es cuantificado fácilmente por la fluorescencia. La CAOX se determina por una disminución de la frecuencia y la cantidad de producto formado en el tiempo (67).

- d) **Método FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma):** Benzie y Strain (1996), indican que un potente antioxidante de radicales libres a menudo actúa como un potente agente reductor tal es el caso del principio del método FRAP. El ensayo FRAP, se presenta como un método que evalúa la reducción del ión férrico a ferroso, a pH bajo, provocando la formación de un complejo coloreado ferroso-tripiridyltriazine (Fe^{II} -TPTZ) a partir del complejo férrico-tripiridyltriazine (Fe^{III} -TPTZ), formando un color azul intenso con un máximo de absorción a 593 nm. Las condiciones del ensayo favorecen la reducción del complejo y, por lo tanto, el desarrollo de color, siempre que un agente reductor (antioxidante) esté presente (71).

El cambio de absorbancia es lineal en un amplio rango de concentraciones con soluciones que contengan una mezcla de antioxidantes, incluyendo el plasma, y con soluciones que contienen un antioxidante en forma purificada. El ensayo FRAP es económico, los reactivos son fáciles de preparar, los resultados son altamente reproducibles y el procedimiento es sencillo y rápido (71).

2.2.17. RADICALES LIBRES

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus (72).

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar (73).

2.2.18. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana. Dentro de la clasificación general se encuentran los fenoles, ácidos fenólicos y flavonoides, que constituyen un amplio grupo de sustancias químicas consideradas metabolitos secundarios de la planta, con diferentes estructuras químicas y propiedades. Existe un interés en estudiarlos debido a sus propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones para la salud humana (73).

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, por lo que la obtención y preparación de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo incluso englobarlos dentro de los llamados alimentos

funcionales. Esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (74).

Los Polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas; se encuentran en muchas plantas, algunas de uso común y por sus propiedades antioxidantes merecen mayor atención (75).

Los Polifenoles son fitoquímicos, es decir, compuestos que abundan en los alimentos vegetales naturales con propiedades antioxidantes. Se han identificado más de 80 000 polifenoles, que se encuentran en alimentos como el té, vino, chocolate, frutas, vegetales y aceite de oliva extra virgen, por nombrar algunos (75).

Los compuestos fenólicos en los alimentos y productos nutraceuticos se originan a partir de la fenilalanina y, en menor medida en algunas plantas, también a partir de tirosina (75) (19). Químicamente, los compuestos fenólicos pueden ser definidos como sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, incluyendo sus derivados funcionales. Su presencia en los tejidos animales y otros materiales es generalmente debido a la ingestión de alimentos de origen vegetal.

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas y caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles son generalmente subdivididos en taninos hidrolizables, que son ésteres de ácido gálico de glucosa y otros azúcares; y fenilpropanoides, como la lignina, flavonoides y taninos condensados. Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que comparten la característica de poseer en su estructura varios grupos bencénicos sustituidos por funciones hidroxílicas. Los polifenoles son importantes para la fisiología de las plantas pues contribuyen a la resistencia de microorganismos e insectos y ayudan a preservar su integridad por su continua exposición a estresantes ambientales, incluyendo radiaciones ultravioletas y relativamente altas temperaturas. En el ser humano, parte de la actividad biológica de los polifenoles se debe a su capacidad de formar parte del sistema antioxidante celular (19).

2.2.18.1. TIPOS DE POLIFENOLES

Los polifenoles pueden separarse en otras cuatro categorías, con subgrupos adicionales con base en el número de anillos de fenol que contengan y según los elementos estructurales que unan a estos anillos entre sí.

Como regla general, los alimentos que contienen mezclas complejas de polifenoles con niveles más altos en las capas externas de las plantas, que en las internas, son: (75).

- **Flavonoides:** que tienen propiedades tanto antioxidantes como antiinflamatorias, se encuentran en las frutas, vegetales, leguminosas, vino tinto y té verde.
 - Flavonas
 - Flavonoles
 - Flavononas
 - Isoflavonas
 - Antocianidinas
 - Chalconas
 - Catequinas
- **Estilbenos:** que se encuentran en el vino tinto y en los cacahuates (el resveratrol es el más conocido)
- **Lignanos:** se encuentran en semillas como la linaza, leguminosas, cereales, granos, frutas, algas y ciertos vegetales
- **Ácidos fenólicos:**
 - Ácidos hidroxibenzoicos, que se encuentran en el té.
 - Ácidos hidroxicinámicos, presentes en la canela, en el café, moras azules, kiwis, ciruelas, manzanas y cerezas. (75).

2.2.19. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

- a) **Método de Folin Ciocalteu:** El ensayo Folin-Ciocalteu se utiliza como medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles (76).

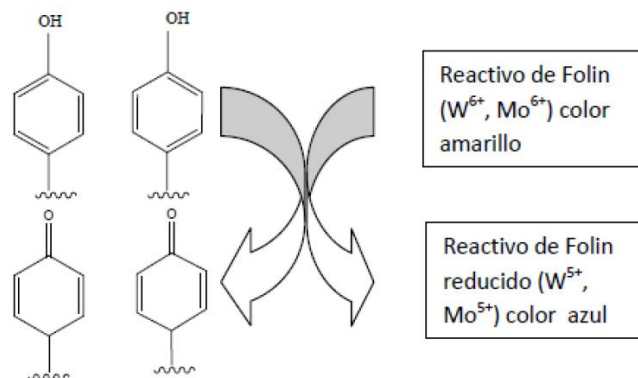


Figura 12: Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu (76).

2.2.20. METODOLOGÍA DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, siendo el objetivo optimizar esta respuesta (77).

El método de superficie de respuesta permite formular y desarrollar productos, habiendo demostrado ser una excelente herramienta para simplificar diseños experimentales, permitiendo trabajar simultáneamente con varias variables (78). La MSR permite seleccionar previamente un número discreto de factores que se saben que son los que más influyen en una función objetivo, que para el caso de la industria alimentaria pueden ser en el producto y en su aceptación global. A partir de la variación de estos factores y siguiendo diseños experimentales adecuados, se obtienen datos cuantitativos de la variable respuesta (aceptación) que, ajustados a un modelo matemático, proporcionan una ecuación multivariante que resume los resultados del estudio y permite predecir las respuestas para valores que no fueron determinados en el experimento (79).

Según Elías (80), la optimización mediante superficies de respuesta le permite al tecnólogo de alimentos minimizar los costos, maximizar las ganancias, reducir el empleo de ingredientes o preservantes costosos, incrementar las características deseables del alimento sin comprometer su inocuidad durante el desarrollo de un nuevo producto o para el mejoramiento de uno existente, tal como fue empleada en la presente investigación.

2.2.20.1. OPTIMIZACIÓN DE UNA SUPERFICIE DE RESPUESTA

En la fase inicial del estudio de una superficie de respuesta se trata de identificar la región de respuesta óptima y para ello se utilizan experimentos factoriales completos 2^k (número de niveles por cada factor) o fraccionarios $2k-p$, con el fin de estimar las respuestas medias para un modelo lineal o de primer orden.

Se recomienda generalmente agregar dos o más observaciones en el nivel medio de cada uno de los factores para estimar el error experimental y tener un mecanismo de evaluación con el fin de establecer si el modelo lineal es apropiado (77).

Ya identificada la región de respuesta óptima, los diseños factoriales completos o fraccionarios a dos niveles no son suficientes, pues se requieren al menos tres niveles para cada factor y el diseño debe de tener $1+2k+k(k-1)/2$ puntos distintos para estimar los parámetros de un modelo de regresión cuadrática. Sin embargo utilizar factoriales 3^k requiere un número de combinaciones de tratamientos poco práctico, pues si se tienen $k=2$, factores se necesitarían 9 combinaciones de tratamientos y agregar un factor más, esto es, tener un diseño factorial 3^3 requiere 27 combinaciones de tratamientos (77).

Existen varias clases de diseños desarrollados para la aproximación a una superficie de segundo orden, que no requieren tantas combinaciones de tratamientos como los diseños factoriales 3^k y donde cada uno de ellos posee ciertas características y propiedades. Entre estos están los diseños centrales compuestos propuestos por Box y Wilson, citado por Montgomery (77), que no crecen tanto como los diseños factoriales 3^k , y los diseños Box- Behnken.

2.2.20.2. DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

El diseño central compuesto es el experimento diseñado de superficie de respuesta que más se utiliza. Los diseños centrales compuestos son un diseño factorial o factorial fraccionado con puntos centrales, ampliado con un grupo de puntos axiales (también denominados puntos de estrella) que permiten estimar la curvatura. Puede utilizar un diseño central compuesto para: (77)

- Estimar eficientemente los términos de primer orden y segundo orden.
- Modelar una variable de respuesta con curvatura al agregar puntos centrales y axiales a un diseño factorial previamente ejecutada.

Los diseños centrales compuestos son especialmente útiles en los experimentos secuenciales, porque frecuentemente permiten ampliar experimentos factoriales anteriores al agregar puntos axiales y centrales. (77)

Cuando es posible, el diseño central compuesto tiene las propiedades convenientes de bloques ortogonales y rotabilidad.

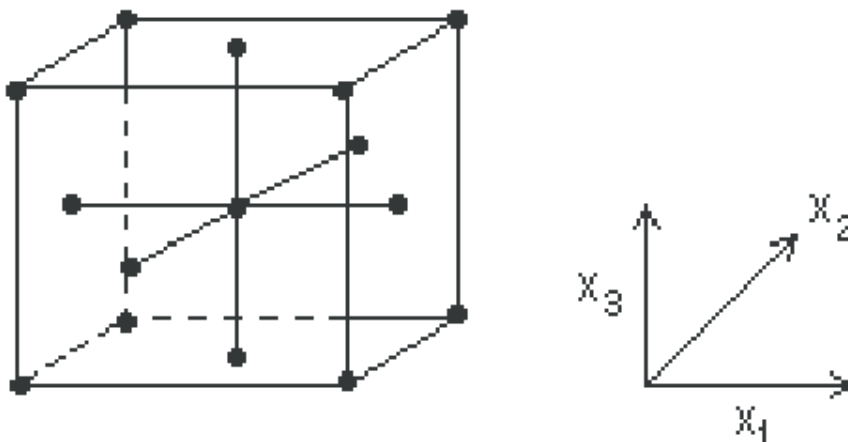


Figura 13: Representación gráfica de un diseño central compuesto (77)

a) Bloques ortogonales

Con frecuencia, los diseños centrales compuestos se ejecutan en más de un bloque. Los diseños centrales compuestos pueden crear bloques ortogonales, lo que permite estimar los términos del modelo y los efectos de bloque de manera independiente y minimizar la variación en los coeficientes de regresión (77).

b) Rotabilidad

Los diseños rotables ofrecen varianza de predicción constante en todos los puntos que están equidistantes del centro del diseño (77).

2.3. MARCO CONCEPTUAL

- **Optimizar:** Es un verbo que designa la acción de buscar la mejor forma de hacer algo. Como tal, es un verbo transitivo que se conjuga como “realizar”. obtener los mejores resultados posibles obtenidos por medio de una actividad o estrategia.
- **Parámetro:** Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación. Variable que, en una familia de elementos, sirve para identificar cada uno de ellos mediante su valor numérico.
- **Solvente:** Dicho de una sustancia: Que puede disolver y producir con otra una mezcla homogénea.
- **Etanol:** En el campo químico, el etanol es un compuesto químico, mejor conocido como alcohol etílico que en situaciones de temperatura normal se caracteriza por ser un líquido incoloro e inflamable en punto de ebullición de 78 grados centígrados. Desde la antigüedad el etanol era utilizado creándolo a partir de la fermentación y disolución combinada de azúcares y levadura que luego eran sometidos a destilación.
- **Ácido cítrico:** Es un ácido orgánico tricarbóxico, presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Su fórmula molecular es $C_6H_8O_7$.

Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchos alimentos como las conservas de vegetales enlatadas.

En bioquímica aparece como un metabolito intermediario en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, proceso realizado por la mayoría de los seres vivos.

- **Azúcar reductor:** Monosacárido o disacárido que puede ceder electrones a otras moléculas y puede por tanto, actuar como agente reductor. La presencia de un grupo cetona (-CO-) no aldehído (-CHO) libre permite a la mayoría de los monosacáridos y polisacáridos actuar como azúcares reductores. Los azúcares reductores se pueden detectar por el test de *Benedict. Comparar con azúcares no reductores.
- **pH:** Medida de acidez o alcalinidad de una disolución. El pH indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en determinadas disoluciones. La sigla significa potencial de hidrógeno o potencial de hidrogeniones. Esta expresión es útil para disoluciones que no tienen comportamientos ideales, disoluciones no diluidas.

- **Tiempo:** Es una magnitud física con la que medimos la duración o separación de acontecimientos. El tiempo permite ordenar los sucesos en secuencias, estableciendo un pasado, un futuro y un tercer conjunto de eventos ni pasados ni futuros respecto a otro. En mecánica clásica a esta tercera clase se llama "presente" y está formada por eventos simultáneos a uno dado.

Su unidad básica en el Sistema Internacional es el segundo, cuyo símbolo es (s) (debido a que es un símbolo y no una abreviatura, no se debe escribir con mayúscula, ni como "seg", ni agregando un punto posterior).

- **Temperatura:** Magnitud referida a las nociones comunes de calor medible mediante un termómetro. En física, se define como una magnitud escalar relacionada con la energía interna de un sistema termodinámico, definida por el principio cero de la termodinámica. Más específicamente, está relacionada directamente con la parte de la energía interna conocida como energía cinética, que es la energía asociada a los movimientos de las partículas del sistema, sea en un sentido traslacional, rotacional, o en forma de vibraciones. A medida que sea mayor la energía cinética de un sistema, se observa que este se encuentra más «caliente»; es decir, que su temperatura es mayor.

CAPÍTULO III DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. DEFINICIÓN DE VARIABLES:

En la investigación “Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de tubérculos mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón)”, realizado por Chirinos *et al.* (9), se determinó que los factores que afectan significativamente la extracción de antocianinas y compuestos fenólicos de los diferentes genotipos de mashua son el nivel de pH, tiempo de extracción relación, tipo de disolvente y la relación de la misma, además de que la temperatura afecta degradando los componentes en mención. Por lo cual, para el presente trabajo de investigación se tomará Temperatura, Tiempo y la variación de pH como variable independiente y la cantidad de antocianinas como variable dependiente, usando como solvente extractor etanol acidificado con ácido cítrico.

a) VARIABLE INDEPENDIENTE:

Se considera como variables independientes los siguientes factores de extracción.

- Temperatura (T°)
- Tiempo (min)
- Variación de pH

b) VARIABLE DEPENDIENTE:

Se considera como variable dependiente la Cantidad de antocianinas totales obtenidas de la extracción (CAT), la capacidad antioxidante y polifenoles totales en el extracto óptimo.

3.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Tabla 4: Representación esquemática de la operacionalización de variables de la investigación

Variables	Nombres de variables	Indicadores	Índices
Variables independientes	Temperatura	T	°C
	Potencial de hidrogeniones	pH	Acido - Alcalino
	Tiempo	t	Minutos
Variable dependiente	Contenido de antocianinas totales	CAT	(mg cianidina 3 – glucósido/100 g)
	* Actividad antioxidante	CAOX	TEAC DPPH (umol trolox/g)
	* Polifenoles totales	PFT	(mg ácido gálico /g)

* Se evaluará al extracto óptimo.

3.3. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

3.3.1. HIPÓTESIS GENERAL

Hi: los parámetros de extracción (Temperatura, Tiempo y pH), influyen en el rendimiento de antocianinas de tubérculos de mashua negra (*Tropaelum tuberosum*), así como la capacidad antioxidante y polifenoles totales.

3.3.2. HIPÓTESIS ESPECIFICOS

- Si los tubérculos de mashua negra (*Tropaelum tuberosum*), contienen antocianinas entonces es posible determinar los parámetros óptimos de temperatura, pH y tiempo para su extracción.
- Si los extractos óptimos tubérculos de mashua negra (*Tropaelum tuberosum*), contienen compuestos bioactivos entonces es posible determinar su capacidad antioxidante.
- Si los extractos óptimos tubérculos de mashua negra (*Tropaelum tuberosum*), contienen compuestos bioactivos entonces es posible evaluar la cantidad de polifenoles totales.

3.4. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El tipo de investigación es aplicada con un diseño de Investigación experimental porque contribuye a optimizar el proceso de extracción de antocianinas y nivel de estudio explicativo correlacional, en el diseño de la investigación se observa el efecto causado por la variable independiente (T, pH, tiempo) sobre la variable dependiente y su posterior evaluación del producto optimizado

3.4.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

El método a emplear en el presente estudio es hipotético-deductivo, porque durante la prueba experimental se podrá evaluar los efectos de la variable independiente mediante la observación directa a fin de verificar que dichos efectos cubran las expectativas a las hipótesis planteadas. Durante la ejecución de este proyecto de investigación se usará diversos equipos, materiales y reactivos de laboratorio.

3.5. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.5.1. Población

La población en esta investigación son los tubérculos de mashua (*Tropaelum tuberosum*), variedad Cheara o negro en una cantidad de 10 kg recolectado en la feria dominical del Arco-Tamburco, proveniente de la comunidad de Kishuará distrito de Huancarama provincia de Andahuaylas.

3.5.2. Muestra

La muestra se extrajo de los tubérculos de mashua variedad Cheara o negro, de acuerdo al estado de madurez principalmente se seleccionó los tubérculos de color negro ya que en ella se encuentra la mayor

cantidad de antocianinas, se efectuaron los análisis en una sola variedad por lo se considera una población uniforme.

3.6. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

En el siguiente diagrama de secuencia de procesos se presenta el procedimiento del trabajo de investigación.

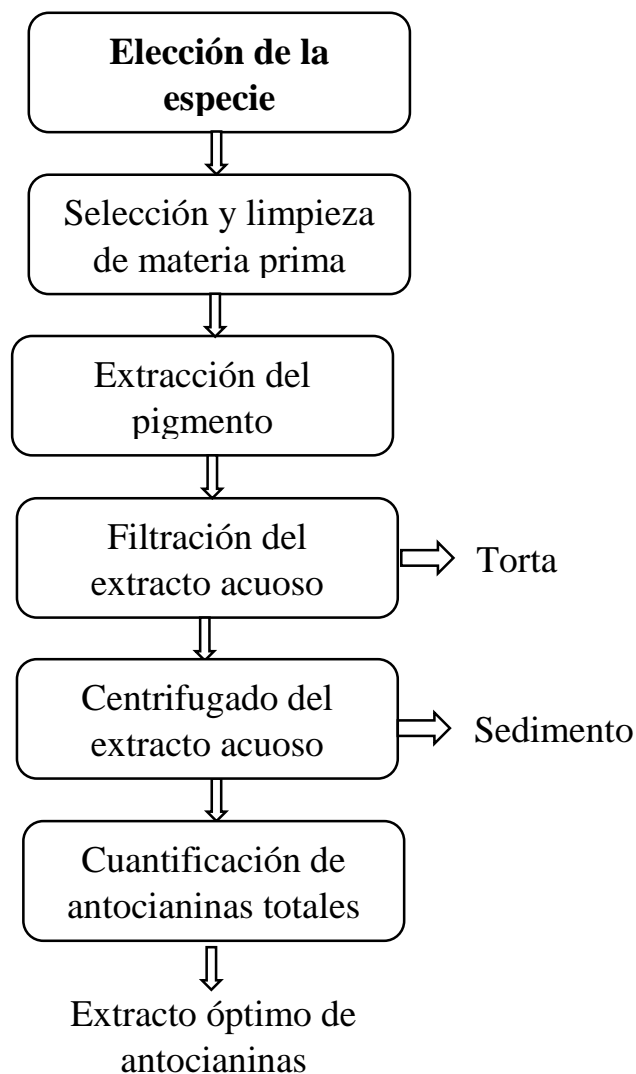


Figura 14: Diagrama de secuencia de procesos para la obtención y evaluación del pigmento de mashua negra

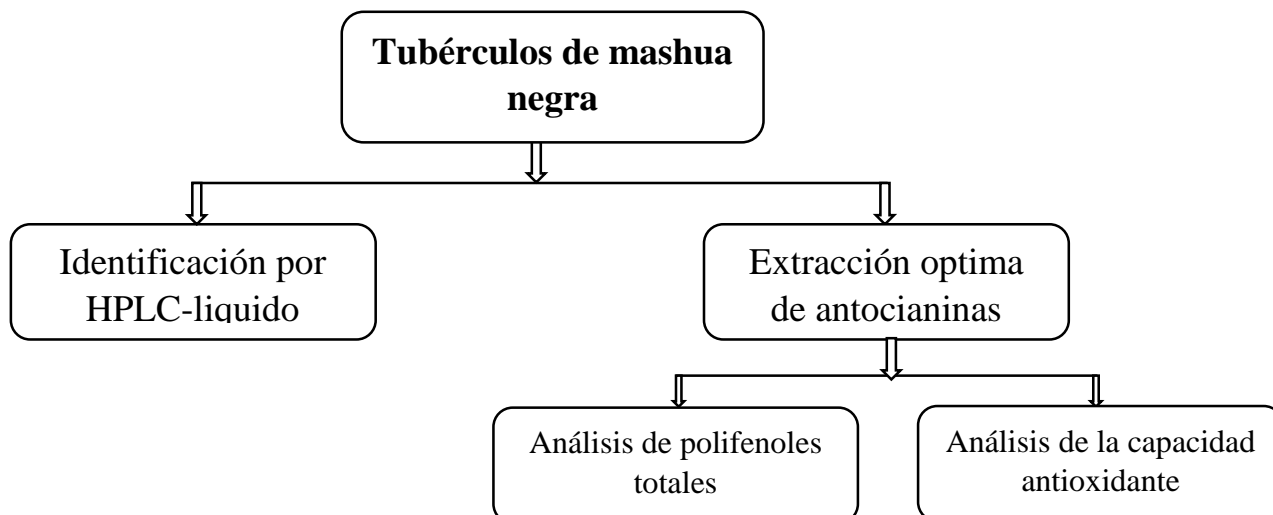


Figura 15: Diagrama de secuencia de procesos para evaluación HPLC y compuestos bioactivos de mashua negra

3.6.1. ELECCIÓN DE LA ESPECIE

La especie seleccionada fueron tubérculos de mashua negra recién cosechados y sin soleado., el cual fue recolectado en la feria dominical del Arco-Tamburco, proveniente de la comunidad de Kishuará distrito de Huancarama provincia de Andahuaylas.

3.6.2. SELECCIÓN Y LIMPIEZA DE LA MATERIA PRIMA.

La muestra previamente seleccionada de acuerdo a la variedad Cheara o negro, fue lavada a chorro continuo con agua potable, con la finalidad de eliminar la presencia de material solido (tierra y piedrecillas) y secado a temperatura ambiente apartada de la luz del sol.



Figura 16: Muestra de tubérculos en mashua negra

3.6.3. EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO:

Los tubérculos de mashua negra fueron congelados a -20°C y triturados en una extractora giratoria marca OSTER, modelo SKU. 592187 para así lograr obtener una masa pastosa homogénea.

La extracción de las antocianinas se realizó de la siguiente forma: bajo condiciones de oscuridad, en un frasco de vidrio forrado con papel aluminio, se mezcló 1 gramo de muestra con 20 ml de una solución alcohólica-ácida, la cual estuvo compuesta por ácido cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ y etanol en una relación 1:20 (g/ml), respectivamente. Luego, el conjunto se homogenizó, rotuló y llevó a los tratamientos establecidos en el diseño experimental de optimización que se representa en la tabla 6.

- Los tratamientos térmicos de extracción se llevaron a cabo en baño maría marca MEMMENT, tipo WNE14 controlable y programable, sin embargo para alcanzar los tratamientos térmicos establecidos en los puntos axiales del diseño experimental (6.36414°C y 73.6359°C), se utilizó una refrigeradora con control de temperatura marca BOSCH, modelo KDN42BW121/03 y una Mufla marca VENTICELL, tipo L SIS-B2V/VC 111 programable. En todos los tratamientos los frascos fueron rotulados y cubiertos con papel aluminio para evitar la incidencia de la luz.
- Las soluciones acidas fueron preparadas con la adición de ácido cítrico a una solución de etanol químicamente puro controladas por un pH-metro marca SI ANALYTICS, modelo Lab 850 en agitación constante y refrigerados inmediatamente a 6°C .



Figura 17: *Extracción de pigmentos en tubérculos en mashua negra*

3.6.4. FILTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

Después del proceso de extracción del pigmento, se procedió a filtrar al vacío los frascos de extracto acuoso utilizando doble papel filtro whatman # 40, para separar las partes sólidas del extracto acuoso, eliminando así la torta sólida que son componentes no deseables y dejando solo el extracto.

3.6.5. CENTRIFUGADO DEL EXTRACTO ACUOSO

Luego, el extracto acuoso se llevó a la centrifugadora, donde se centrifugó a 4200 rpm por un tiempo de 10 minutos, el cual con un movimiento de rotación origina una fuerza giratoria que produjo la separación de los sólidos que pudieron haberse filtrado y de esta manera obtener un extracto más limpio por diferencia de densidades, en la parte superior del tubo se encontró el pigmento (sobrenadante) debido a que tiene menor densidad y en la parte de abajo el sedimento lo cual se elimina con otras sustancias con mayor densidad.

3.6.6. CUANTIFICACIÓN DEL TOTAL DE ANTOCIANINAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL PH DIFERENCIAL (Método de Giusti y Wrolstad (81).)

Los extractos obtenidos fueron diluidos independientemente en los buffers a pH 1.0 y pH 4.5 y se los dejó reposar por 10 min bajo oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se calibró el espectrofotómetro con el buffer de pH uno y se leyó todos los tubos que contenían este buffer a 520 y 700 nm; luego se procedió a calibrar el equipo con el buffer pH 4.5 y se leyó todos los tubos que contenían este buffer a 520 y 700 nm.

El contenido de antocianinas totales se determinó según el método de pH diferencial, el mismo que se basa en el cambio de coloración de las antocianinas de acuerdo al pH en la que se encuentran, quienes presentan más coloración en su forma oxonio a pH 1.0 (KCl 0.025 M) e incoloro en su forma hemiacetal a pH 4.5 (CH₃COONa 0.4 M), esta diferencia de color permite la cuantificación de antocianinas mediante la medida de sus absorbancias a diferentes longitudes de onda como son 520 y 700 nm respectivamente usando como blanco agua destilada (81). Las soluciones buffer empleadas para el ajuste del pH fueron:

- **Buffer a pH 1.0:** Se pesó 1.86 gramos de KCl, se disolvió en 980 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 1.0 con HCl concentrado y luego se enrazó a un litro con agua destilada.
- **Buffer a pH 4.5:** Se pesó 32.812 gramos de acetato de sodio, se disolvió en 980 ml de agua destilada y se ajustó el pH a 4.5 con HCl concentrado y luego se enrazó a un litro con agua destilada.

Los cálculos se efectuaron de acuerdo a lo establecido por Giusti y Wrolstad (81), el cual se basa en la aplicación de las siguientes formulas:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5} \dots \dots \dots Ecuación\ 1.$$

$$CAT\left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l} \dots \dots \dots Ecuación\ 2.$$

- Para convertir el CAT en (mg/100g) se usa la siguiente ecuación:

$$CAT\left(\frac{mg}{100g}\right) = \frac{A \times PM \times FD}{\epsilon \times l} * \left(\frac{V}{W}\right) * 1000 \dots \dots \dots Ecuación\ 3.$$

Dónde:

- A : Cambió en la absorbancia
 CAT : Contenido de antocianinas totales (mg/L)
 PM : Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol
 ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900 L/mol.cm
 l : Camino óptico de celda, 1 cm
 FD : Factor de dilución (volumen de aforo/volumen alícuota)
 V : Volumen de aforo de extracto (mL)
 W : Peso muestra (g)

3.6.7. IDENTIFICACIÓN POR HPLC-LÍQUIDO

La identificación por HPLC-liquido se llevó a cabo en los laboratorios la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría, mediante un Cromatógrafo Agilent serie 1200, Software: Chemstation V03.02. La fase móvil estaba compuesta de solvente (A) agua: ácido acético H₃PO₄ y solvente (B) Acetonitrilo (10%:5%:1%), con un sistema de Análisis gradiente 0 a 2 min 0% de B, a 10 min 15% de B, a 15 min 20% de B, a 17 min 50% de B hasta 100% de B en 18 min a una temperatura del horno de 30.0 °C y un tiempo de análisis de 18 minutos a la que se inyectó caudal de 0,5 ml/min y un volumen de 1.0 µL, el colorante cuya extracción se realizó con metanol a tubérculos de mashua negra congelados a -20°C en una relación de 1:10, posteriormente se filtró y concentró y se adicionó cloroformo para separar los componentes apolares que no son de interés en el presente estudio de investigación.

Se separaron utilizando una columna de HPLC de fase inversa en un módulo de separación Waters, equipado con un autoinyector, un detector de matriz de fotodiodos 996 (DAD) y el software Empower. Los datos espectrales se registraron de 200 a 700 nm durante todo el ciclo.

Los compuestos fenólicos se identificaron y cuantificaron comparando su tiempo de retención y los datos espectrales UV-visibles con los estándares inyectados previamente conocidos.

3.6.8. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MÉTODO TEAC DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).

La capacidad antioxidante de extractos de mashua fue evaluado por el método DPPH planteado por Brand – Williams (65), el mismo que fue evaluado en el extracto óptimo.

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de mashua, se han usado como patrón de referencia el Trolox, por lo que tanto los extractos como el estándar actuaron reduciendo el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

El procedimiento para evaluar la capacidad antioxidante fue, a 1.2 ml de solución de DPPH previamente ajustada a absorbancia de 0 a 700, se le adicionó 100 μ L del extracto acuoso de mashua negra, luego se agitó y se leyó la absorbancia inicial DPPH a 515 nm de longitud de onda y dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, luego se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 10S (Thermo Scientific) a 515 nm de longitud de onda.

La calibración fue hecha con una solución de trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametil-croman-2-carboxilico de EMD Chemicals Carbiochem USA) y la actividad antioxidante total fue expresada como micromoles de equivalentes trolox por gramo de mashua negra. Usando el solvente etanol como blanco.

Para el factor de dilución se tomó 500 μ L del extracto de mashua negra y se aforó en 1500 μ L de agua destilada; por lo que el factor de dilución es igual al $FD = (2000/500) = 4$.

Con respecto al radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Free radical Calbiochem Merck) se ha preparado a 50 μ m en 100 ml y de esta solución se ajusta a una absorbancia de 0.7 (\pm 0.02) con etanol (82), siendo la curva patron siguiente:

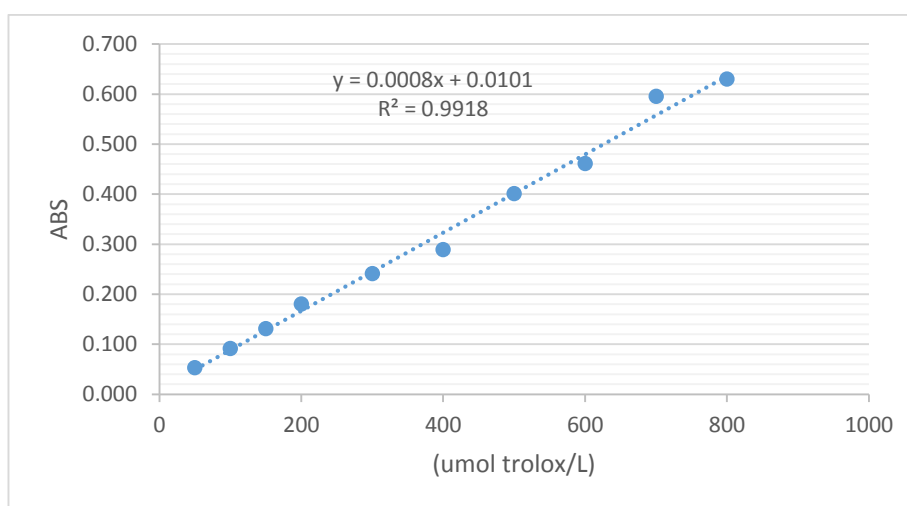


Figura 18: Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH

La capacidad antioxidante se calculó usando la curva estándar de Trolox determinados por Barragán Condori, 2017 (82). Que se usó como patrón de referencia el trolox desde 100 a 800 (umol/L) por lo que, tanto los extractos como el estándar actuaran reduciendo el radical DPPH (50 um) (65). Los resultados se expresan como (equivalente Trolox umol/g de muestra).

Se determinó por triplicado, considerando la absorbancia a 515 nm de longitud de onda.

Los cálculos se efectuaron con la siguiente ecuación.

$$TEAC\ DPPH \left(\frac{\text{umol trolox}}{\text{litro}} \right) = \left[\frac{\text{Abs. muestra} - A}{B} \right] * FD \dots \dots \dots \text{Ecuación 4.}$$

Donde Abs. _{Muestra}: absorbancia de la muestra

A intercepto

B pendiente

FD factor de dilución.

3.6.8. ANÁLISIS DE POLIFENOLES TOTALES (PFT):

El contenido de polifenoles totales se determinó según el método de Folin Ciocalteu con algunas modificaciones, el cual se basa en la oxidación de compuestos fenólicos con el reactivo Folin Ciocalteu formado por ácido fosfomolibdotúngstico (W^{+6} , Mo^{+6}) de color amarillo en medio ácido, el mismo que al ser reducido a (W^{+5} , Mo^{+5}) por los grupos fenólicos en medio básico, emite un complejo color azul, cuya intensidad medida en absorbancia a 765 nm, da como resultado el contenido total de polifenoles usando como patrón el ácido gálico.

Para esta determinación se mezclaron 100 μ L del extracto con 1.6 ml de agua y 100 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu, posteriormente se añadieron 200 μ L de una solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 (7%) para aforar a 2 ml, se tomó la lectura inicial previamente calibrado a 0 con (1.7 ml de agua y 100 μ L de reactivo de Folin Ciocalteu y 200 μ L de una solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 (7%) para aforar a 2 ml), se guardó por 30 min en oscuridad y luego se realizó la lectura de absorbancias a 765 nm. Para el contenido de polifenoles se usó como patrón de referencia el ácido gálico desde 0 a 5 (mg/L) cuyo R^2 fue 0.969 a partir de la curva de calibración $y = 2.701x - 0.0354$ (83) (82). Este procedimiento se efectuó por triplicado para cada muestra. Obteniéndose la absorbancia a 765 nm.

Para el factor de dilución se tomó 500 μ L del extracto de mashua negra y se aforó en 1500 μ L de agua destilada; por lo que el factor de dilución es igual al $FD = (2000/500) = 4$.

Los cálculos se efectuaron con la siguiente ecuación.

$$PFT \left(\frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{litro}} \right) = \left[\frac{\text{Abs.muestra} - A}{B} \right] * FD \dots \dots \dots \text{Ecuación 5.}$$

Dónde:

PFT	: Polifenoles totales
Abs _{muestra}	: Absorbancia de la muestra
A	: Intercepto
B	: Pendiente
FD	: Factor de dilución

a) Preparación de la curva de calibración

Se utilizó una solución estándar de ácido gálico del cual se tomaron volúmenes de 0; 50; 100; 150 y 200 μL y se completó el volumen de cada uno a 2000 μL con solución de Na_2CO_3 (7%), reactivo Folin (1N). Posteriormente se determinó la curva de calibración estándar del ácido gálico, a 765 nm, en un espectrofotómetro después de 30 min de reposo, en oscuridad a temperatura ambiente, efectuando con estos datos la curva de calibración el mismo que se presenta a continuación (82).

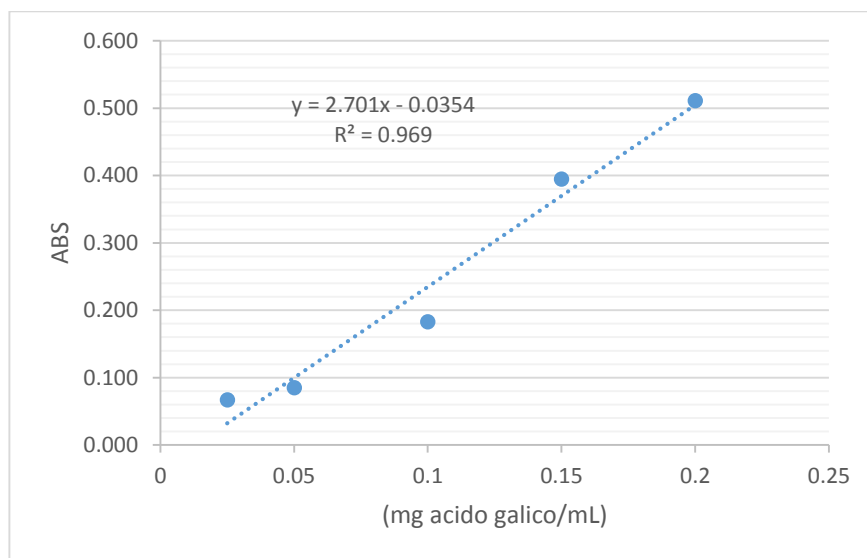


Figura 19: Curva de calibración de ácido gálico para la determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

3.7. MATERIAL DE INVESTIGACIÓN

a) Materia prima:

Para la preparación de la masa homogénea se empleó tubérculos congelados a -20°C de mashua negra fresca (*Tropaelum tuberosum*), la misma que se adquirió en la feria dominical del Arco-Tamburco, proveniente de la comunidad de Kishuará distrito de Huancarama provincia de Andahuaylas.

b) Material de vidrio

- Tubos de ensayo tapa rosca capacidad 20 ml.
- Matraz de Erlenmeyer
- Embudo de vidrio
- Mortero de porcelanato
- Frascos de vidrio con tapa hermética
- Vaso de precipitado con capacidad de 1000 ml y 100 ml
- Pipeta con capacidad de 10 ml, 5 ml, 1 ml.
- Decantador de cristal

c) Equipos

- Micro pipeta marca BOECO con escalas de 10 a 100 μm y 100 a 1000 μm .
- Baño maría marca MEMMENT, tipo WNE14 de temperatura máxima 95°C.
- Extractor marca OSTER, modelo SKU. 592187, tipo HEB69.
- Centrifuga marca CENTURION SCIENTIFIC, serie C2, modelo C 2006.
- Balanza analítica marca ENTRIS, modelo Entris 224-15 de capacidad máxima 220 gr.
- Rota evaporador marca BUCHI LABORTECHNIK A6, modelo CH-9230, tipo R-200V300, voltaje 280VAC.
- Espectrofotómetro marca THERMO SCIENTIFIC, modelo Genesys 10S UV-VIS spectrophotometer G10S, voltaje 240VAC.
- HPLC marca Agilent, serie 1200 Software, Chemstation V03.02, Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6 x 250mm, 5 μm , Pre Columna Zorbax Eclipse XDB-C18 4.6d x 12.5 mm x 5 μm .
- Congeladora marca MAXFRIO, modelo Maxfrio (MX) Max Lujo, voltaje 230VAC.
- Bomba de vacío marca VACUUBRAND, modelo ME2NT, capacidad 20/2.2 m³/h, 70 Mbar.
- pH-metro marca SI ANALYTICS, modelo Lab 850, tipo D-SS122
- Refrigeradora marca BOSCH, modelo KDN42BW121/03, voltaje 220VAC.
- Mufla marca VENTICELL, serie D132739, tipo L SIS-B2V/VC 111, voltaje 230 VAC.
- Destilador de agua marca ELGA, modelo Pc210EVBPM1, voltaje 155VAC.
- Agitador magnético marca CAT, modelo M6, serie 60266-00-0156, tipo D-79219 Staufen.

d) Reactivos

- Etanol al 95% (químicamente puro)
- Ácido cítrico al 80% m/m
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid) (Sigma Aldrich)
- Reactivo de DPPH (2,2- difenil- 1- picrylhydrazyl) (Merck).
- Buffer de disolución (pH 1 y pH 4.5)
- Folin Ciocalteu 2N (Merck).
- Ácido Acético : (Fermont)
- Acetonitrilo: H^3PO^4 (10%:5%:1%)
- Cloroformo $CHCl_3$ (1% en acetona- d_6 (99.9 átomo% D)
- Ácido fosfórico al 85% (Merck).
- Aceite de ácido glacial al 99.97%
- Metanol al 80%

e) Materiales para el procesamiento de datos

- Computadora marca HP.
- Hardware: Pentium IV.
- Software: Microsoft Office 2013.
- Programa Statgraphics centurión XVII

f) Otros materiales

- Bolsa de plástico
- Papel toalla
- Frasco descartable
- Cuchillos, cucharas, pinzas
- Puntas desechables de micropipeta
- Papel whatman N° 40
- Mesas de trabajo
- Marcadores de tinta indeleble

3.8. PLAN DE TRATAMIENTO DE DATOS

El diseño experimental del proceso de optimización de extracción de antocianinas de mashua (*Tropaeolum tuberosum*), se efectuó con tres variables que son Temperatura (T), pH y tiempo (t), El orden de los experimentos no ha sido aleatorizado para mantener un orden en el procedimiento.

3.8.8. TÉCNICAS ESTADÍSTICAS

Se usó el software estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVII con diseño experimental aplicando el método superficie de respuesta compuesto central 2^3 + principal, rotatable no aleatorizado usando como variable respuesta el contenido de antocianinas totales CAT expresado en (mg cianidina 3 – glucósido/100g de extracto) cuyos diseños se presenta a continuación en las tablas 5 y 6.

- **NIVELES PARA CADA UNA DE LAS VARIABLES:**

T = 20 a 60 °C

pH = 3 a 4

t = 180 a 300 minutos

Tabla 5: Representación de Diseño experimental con variables y niveles

Variables	Nombres de variables	Niveles	
		Bajo	Alto
Variables independientes	Temperatura (°C)	20	60
	pH	3	4
	Tiempo (min)	180	300
Variable dependiente	Contenido de antocianinas totales	(mg cianidina 3 – glucósido/100 g)	
	* Actividad antioxidante	TEAC DPPH (umol trolox/g)	
	* Polifenoles totales	(mg ácido gálico /g)	

* Se evaluará al extracto óptimo.

Tabla 6: Diseño experimental de optimización.

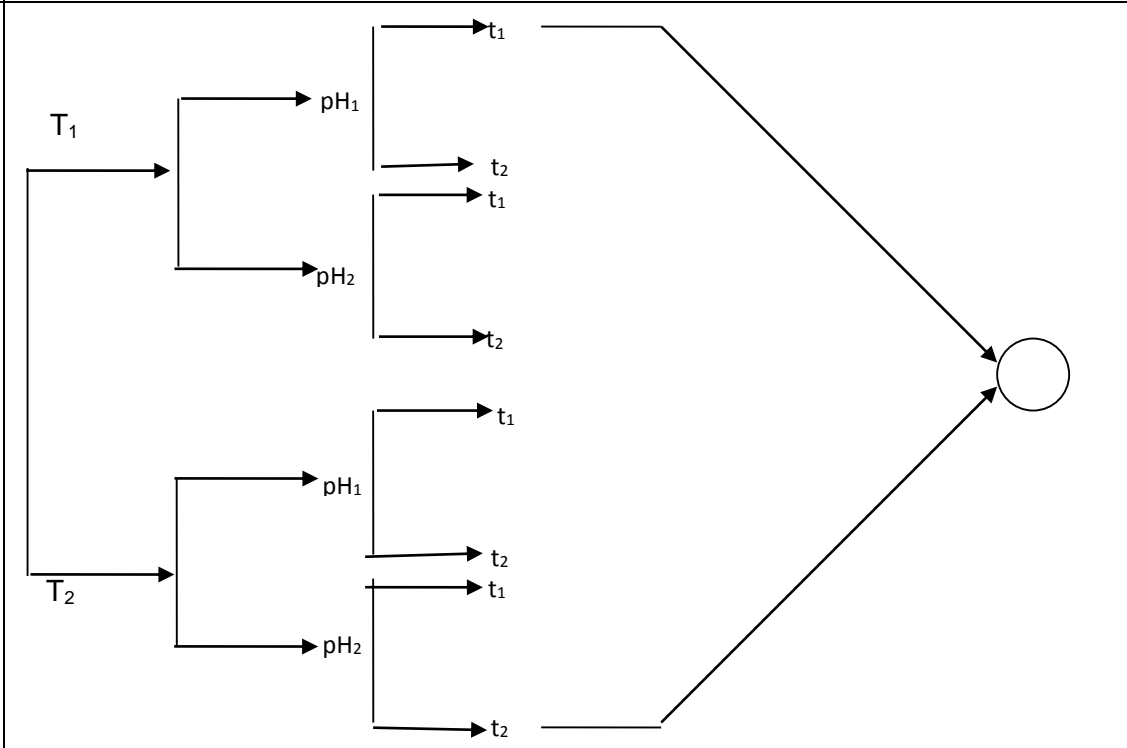
bloque	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (min)	CAT (mg cianidina 3-G/100g)
1	20	3	180	
1	60	3	180	
1	20	4	180	
1	60	4	180	
1	20	3	300	
1	60	3	300	
1	20	4	300	
1	60	4	300	
1	6.36414	3.5	240	
1	73.6359	3.5	240	
1	40	2.6591	240	
1	40	4.3409	240	
1	40	3.5	139.092	
1	40	3.5	340.908	
1	40	3.5	240	
1	40	3.5	240	
1	40	3.5	240	
2	20	3	180	
2	60	3	180	
2	20	4	180	
2	60	4	180	
2	20	3	300	
2	60	3	300	
2	20	4	300	
2	60	4	300	
2	6.36414	3.5	240	
2	73.6359	3.5	240	
2	40	2.6591	240	
2	40	4.3409	240	
2	40	3.5	139.092	
2	40	3.5	340.908	
2	40	3.5	240	
2	40	3.5	240	
2	40	3.5	240	

Tabla 7: Relación de factores de la investigación

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Unidades</i>	<i>Continuo</i>
Temperatura	20	60	°C	Sí
pH	3	4	Acido - Alcalino	Sí
Tiempo	180	300	min	Sí
<i>Respuestas</i>		<i>Unidades</i>		
CAT		(mg cianidina 3-glucosido/L)		
* Actividad antioxidante		TEAC DPPH (umol trolox/g)		
* Polifenoles totales		(mg ácido gálico /g)		

* Se evaluará al extracto óptimo.

Tabla 8: Diseño técnico de la investigación

OPERACIONES	VARIABLES DE EXTRACCIÓN CON NIVELES	OPTIMIZACIÓN	PRODUCTO
<p>Materia Prima Selección y clasificación</p> <p>Acondicionamiento</p> <p>Tubérculos de Mashua</p> 	<p>Temperatura: T = 20 a 60 °C pH : 3.0 a 4.0 Tiempo: 180 a 300 minutos * Evaluado en el extracto optimo</p>	<p>CAT (mg cianidina 3 – glucósido/100g) * CAOX TEAC DPPH (umol Trolox/g) * PFT (mg ácido gálico /g)</p>	<p>EXTRACTO</p>



CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.6. EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A DIFERENTES CONDICIONES

La tabla N° 9 muestra la matriz experimental y los resultados que se obtuvieron en base a la concentración de antocianinas a diferentes tratamientos de acuerdo al diseño experimental planteado, el contenido de antocianinas fue determinado por el método de pH diferencial y la variación de absorbancias a pH 1 y 4.5 se muestra en el anexo 1.

Además, se puede observar que a temperaturas que oscilan los 40°C, alto grado de acidez y tiempos relativamente prolongados se obtiene el mayor contenido de antocianinas totales, sin embargo la cantidad máxima de extracción no indica el valor óptimo de extracción.

Tabla 9: Concentración de antocianinas en extractos de mashua negra

Bloque	Temperatura	pH	Tiempo	CAT (mg cianidina 3-G/100g)
1	20	3	180	105.634
1	60	3	180	94.646
1	20	4	180	79.365
1	60	4	180	83.351
1	20	3	300	110.897
1	60	3	300	92.181
1	20	4	300	90.954
1	60	4	300	86.314
1	6.36414	3.5	240	96.804
1	73.6359	3.5	240	73.483
1	40	2.6591	240	167.916
1	40	4.3409	240	63.03
1	40	3.5	139.092	156.434
1	40	3.5	340.908	181.913
1	40	3.5	240	166.645
1	40	3.5	240	164.025
1	40	3.5	240	164.641
2	20	3	180	107.367
2	60	3	180	92.926
2	20	4	180	78.43
2	60	4	180	85.581
2	20	3	300	110.506

2	60	3	300	89.756
2	20	4	300	91.159
2	60	4	300	85.273
2	6.36414	3.5	240	95.602
2	73.6359	3.5	240	72.706
2	40	2.6591	240	166.213
2	40	4.3409	240	61.983
2	40	3.5	139.092	154.379
2	40	3.5	340.908	179.085
2	40	3.5	240	164.572
2	40	3.5	240	162.285
2	40	3.5	240	163.508

El StatAdvisor, ha creado un diseño de compuesto central: 2^3 +estrella el cual estudió los efectos de 3 factores (Temperatura, pH y Tiempo) en 34 corridas. El diseño fue ejecutado en 2 bloques. El orden de los experimentos no ha sido aleatorizado

4.6.8. ATRIBUTOS DE LA SUPERFICIE DE RESPUESTA

Clase de diseño: Superficie de Respuesta

Nombre del Diseño: Diseño de compuesto central: 2^3 +estrella

Características del diseño: Rotable

Número de factores experimentales: 3

Número de bloques: 2

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 34, incluyendo 3 puntos centrales por bloque

Grados de libertad para el error: 23

Aleatorizado: No

Tabla 10: Atributos de la superficie de respuesta

<i>Factores</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Unidades</i>	<i>Continuo</i>
temperatura	20	60	°C	Sí
pH	3	4	-----	Sí
tiempo	180	300	minutos	Sí

<i>Respuestas</i>	<i>Unidades</i>
CAT	mg cianidina 3-glucosido /100g

4.7. OPTIMIZACIÓN DE LA RESPUESTA

En la tabla 10 se muestra la combinación en todos los niveles de los factores, cuya meta es maximizar el contenido total de antocianinas (CAT), sobre la región indicada. Se puede observar que las mejores condiciones de extracción se da a una temperatura de 37.8 °C, un pH de 3.3 y un tiempo de 264.6 minutos, alcanzando un valor óptimo de **170.36 mg cianidina 3-glucosido/100g** de mashua negra.

Tabla 11: Optimización de las antocianinas totales (CAT)

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Temperatura	6.36414	73.6359	37.769
pH	2.6591	4.3409	3.317
Tiempo	139.092	340.908	264.564

4.7.8. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA CAT

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de CAT en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 efectos (un principal y dos combinado), tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. Esto indica que la variación de pH es altamente significativa en el proceso de extracción de antocianinas en mashua negra.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 83.1695% de la variabilidad en CAT. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 75.8519%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 19.3433. El error medio absoluto (MAE) de 12.0497 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Debido a que el valor-P es menor que 5.0%, hay una indicación de posible correlación serial al nivel de significancia del 5.0%.

Tabla 12: Tabla ANOVA de análisis de varianza

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Temperatura	738.348	1	738.348	1.97	0.1735
B:pH	8266.64	1	8266.64	22.09	0.0001
C:Tiempo	476.982	1	476.982	1.27	0.2705
AA	26344.0	1	26344.0	70.41	0.0000
AB	268.19	1	268.19	0.72	0.4059
AC	79.6556	1	79.6556	0.21	0.6488
BB	12480.2	1	12480.2	33.36	0.0000
BC	36.6207	1	36.6207	0.10	0.7572
CC	504.362	1	504.362	1.35	0.2575
bloques	8.40228	1	8.40228	0.02	0.8822
Error total	8605.72	23	374.162		
Total (corr.)	51131.6	33			

R-cuadrada = **83.1695** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **75.8519** porciento

Error estándar del est. = **19.3433**

Error absoluto medio = **12.0497**

Estadístico Durbin-Watson = 1.30697 (P=**0.0128**)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.32246

La significancia estadística de los factores sobre las variables de respuesta se realizó utilizando un análisis de varianza. Como se indica en la tabla ANOVA (Tabla 12) solamente el pH del solvente tuvo un efecto significativo sobre el rendimiento ($P < 0,05$). Los factores tiempo y temperatura así como las interacciones no mostraron efectos significativos sobre la variable de respuesta en los niveles evaluados.

El efecto significativo del pH del solvente sobre el contenido de antocianinas totales se puede explicar teniendo en cuenta que al haber un mayor nivel de pH las antocianinas tienden a perder su estabilidad y romper los enlaces de hidroxilo o a su vez pasar a chalconas en un medio cercano al básico, cuando se mantiene la temperatura inferior a los 60 °C, este factor no altera significativamente el contenido total, sin embargo al incrementa la temperatura superior a ella las antocianinas sufren una degradación térmica de primer orden.

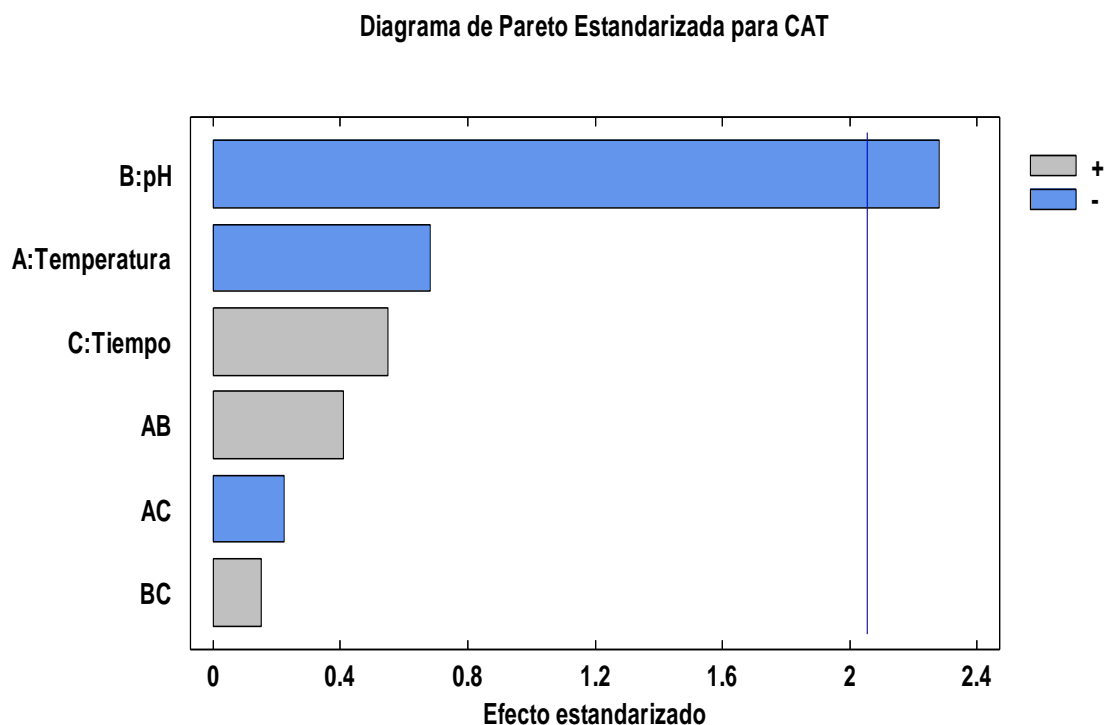


Figura 20: Diagrama de Pareto en orden decreciente de importancia

En la figura 20, se puede apreciar que de las tres variables en estudio (temperatura, pH y tiempo); el factor pH es la de mayor significancia en el estudio del contenido total de antocianinas, por lo que la variación de la misma ofrece una reacción de disminución en contenido total de antocianinas en tubérculos de mashua negra.

4.7.9. COEFICIENTE DE REGRESIÓN PARA CAT

La ecuación de regresión del modelo matemático ajustado (desarrollado con los valores reales) determina los valores constantes para la estimación del contenido de antocianinas totales, de esta manera se puede estimar el contenido de antocianinas en función de todos los factores y sus interacciones.

$$\begin{aligned} \text{CAT} = & -1001.9 + 5.58976*\text{Temperatura} + 595.48*\text{pH} + 0.598136*\text{Tiempo} - \\ & 0.0854551*\text{Temperatura}^2 + 0.409413*\text{Temperatura}*\text{pH} - 0.00185937*\text{Temperatura}*\text{Tiempo} - \\ & 94.1077*\text{pH}^2 + 0.0504292*\text{pH}*\text{Tiempo} - 0.00131378*\text{Tiempo}^2 \end{aligned}$$

Tabla 13: Coeficiente de regresión estimada para CAT

<i>Coefficiente</i>	<i>Estimado</i>
constante	-1001.9
A:Temperatura	5.58976
B:pH	595.48
C:Tiempo	0.598136
AA	-0.0854551
AB	0.409413
AC	-0.00185937
BB	-94.1077
BC	0.0504292
CC	-0.00131378

4.7.10. RESULTADOS ESTIMADOS PARA EL CONTENIDO TOTAL DE ANTOCIANINAS

La figura 21 muestra la superficie de respuesta estimada en el contenido de antocianinas totales de acuerdo a las predicciones establecidas del recorrido de ascenso y descenso para antocianinas, mostrándose así que la región de mayor inflación se da a 3.2 de pH y 37.0 °C de temperatura, reflejando de esta manera 170.0 mg cianidina 3-glucosido/100g de mashua negra aproximadamente

Tiempo: 240.00 minutos
 $r^2 = 0.8312$

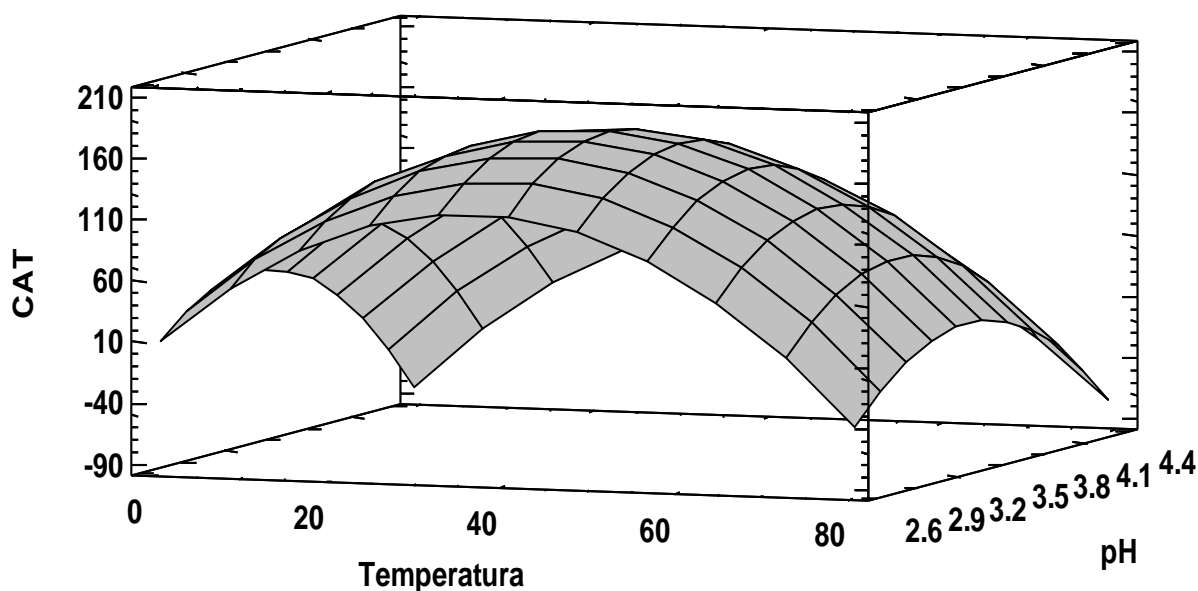


Figura 21: Superficie de respuesta estimada para CAT

4.7.11. CAMINO DE MÁXIMO ASCENSO PARA CAT

La tabla 13 muestra el trayecto de máximo ascenso (o descenso). Este es el trayecto, desde el centro de la región experimental actual, a través del cual la respuesta estimada cambia más rápidamente con un cambio menor en los factores experimentales. Indica buenas características para ejecutar experimentos adicionales si el objetivo es incrementar o decrementar CAT. Actualmente, 6 puntos se han generado cambiando Temperatura en incrementos de 1.0. Puede especificarse la cantidad de cambio en cualquiera de los factores, por lo que el STATGRAPHICS determinará entonces cuanto tendrán que cambiar los otros factores para mantenerse en el trayecto del máximo ascenso. El programa también calcula la CAT estimada en cada uno de los puntos del trayecto, con los cuales pueden compararse los resultados si es que se corren esos ensayos.

Tabla 14: Trayecto máximo de ascenso o descenso de CAT

<i>Temperatura</i>	<i>pH</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Predicción para CAT (mg cianidina 3- G/100g)</i>
40.0	3.5	240.0	166.029
41.0	3.58103	237.954	162.127
42.0	3.65797	236.38	157.168
43.0	3.73167	235.085	151.249
44.0	3.80273	233.974	144.446
45.0	3.87153	232.996	136.818

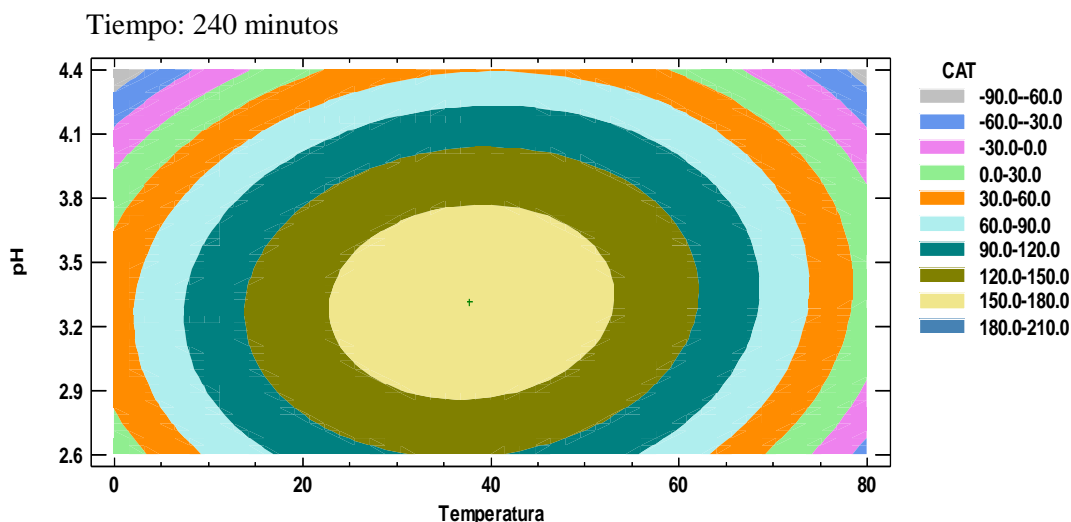


Figura 22: Contornos de superficie de respuesta estimada para CAT

El análisis de superficie de respuesta (figura 22), indica que las condiciones de tiempo, temperatura y pH que maximizan el rendimiento de extracción de antocianinas en mashua negra en el rango estudiado son temperatura de 37.8 °C, un pH de 3.3 y un tiempo de 264.6 minutos.

4.8. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANINAS

Los perfiles fenólicos de HPLC para tubérculos de mashua negra se determinaron en la UNIVERSIDAD NACIONAL SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO, LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA, a través de un cromatógrafo Agilent serie 1200, con un Software: Chemstation V03.02, usando como solventes Aceite de ácido glacial, Acetonitrilo y ácido fosfórico en una relación de (10:5:1).

El análisis se realizó en tres corridas para confirmar los resultados, adicionando un volumen de 1.0 micro litro por un periodo de 18 minutos cada uno a una temperatura de horno de 30 °C. Obteniéndose como resultado la presencia de 8 Antocianinas a los 4.510, 5.936, 6.480, 7.219, 8.080, 9.129, 9.605 y 10.058 minutos respectivamente y un pico espectral que puede corresponder a la presencia de ácido gálico o fenómenos de los tipos de flavanol y ácido benzoico, respectivamente a los 8.33 minutos., De esta manera se confirma que el extracto contiene compuestos antociánicos.

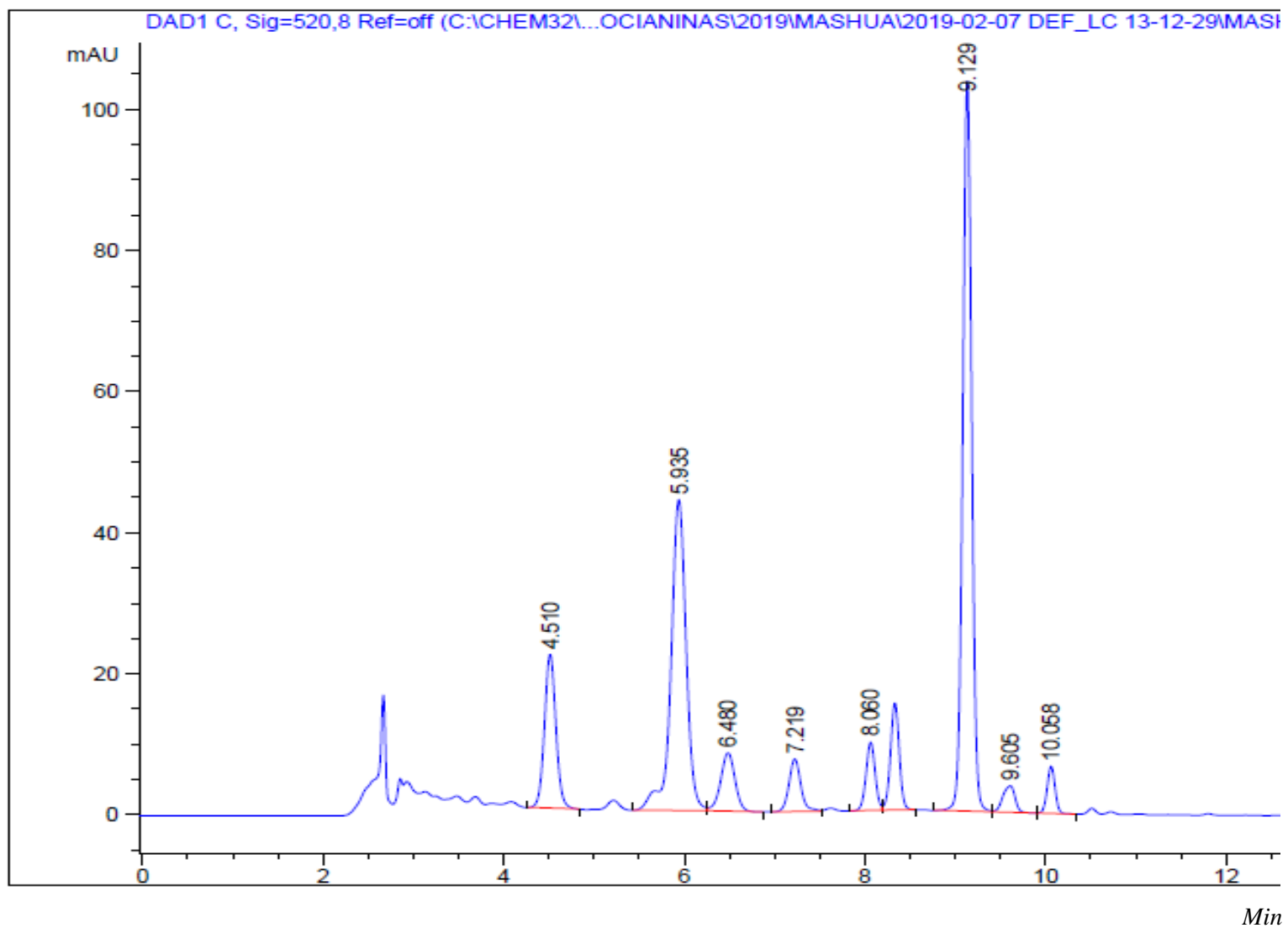


Figura 23: Perfil Cromatográfico de antocianinas en mashua negra

4.8.8. IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANIDINA PREDOMINANTE EN MASHUA NEGRA

La identificación de antocianidina predominante se llevó a cabo mediante la superposición con un pico patrón de antocianidina identificada por HPLC líquida, usando por comparación con espectros cromatograficos de uva y fresa, las mismas que se superponen con los espectros cromatograficos de la muestra de mashua siendo las más semejantes las antocianidinas denominada delfinidina.

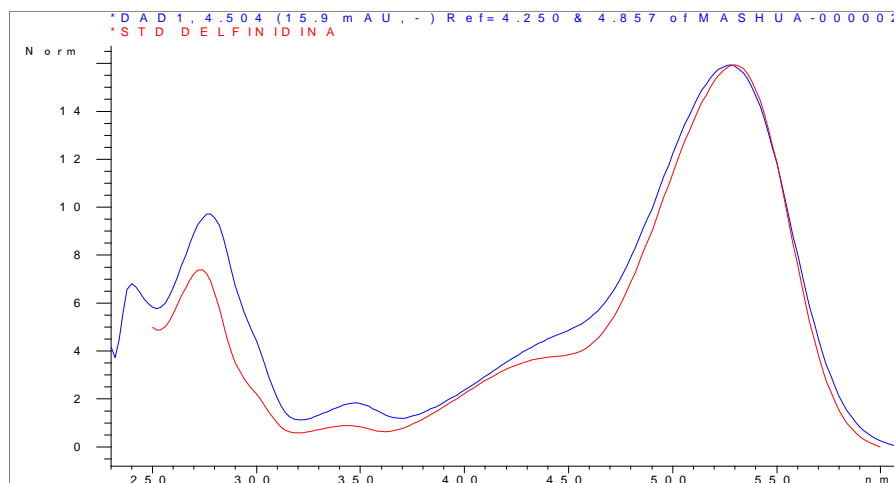


Figura 24: Perfil cromatográfico de la mashua negra comparado con cromatogramas de uva

— Delfinidina en uva
— Antocianidina de mashua negra

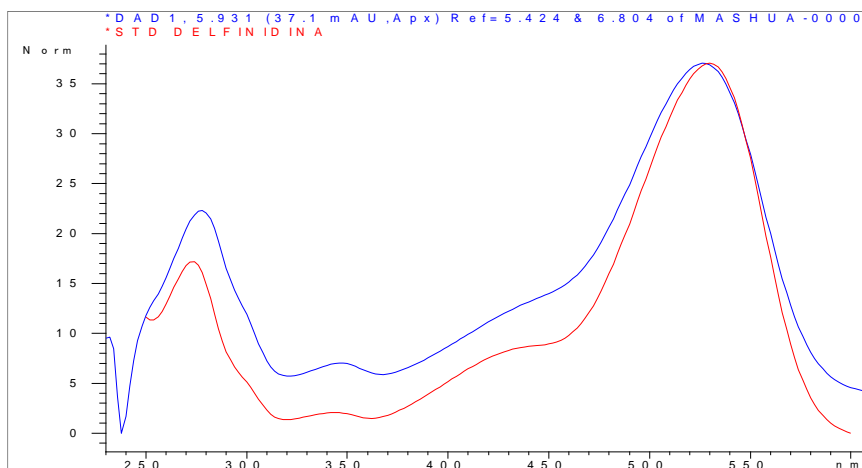


Figura 25: Perfil cromatográfico de la mashua negra comparado con cromatogramas de fresa

— Delfinidina en fresa
— Antocianidina de mashua negra

4.9. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Para la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de mashua negra, se han usado como patrón de referencia el Trolox, por lo que tanto los extractos como el estándar actuaron reduciendo el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). A 2.9 mL de solución de DPPH previamente ajustada a absorbancia de 0.700, se le adicionó 100 μ L del extracto acuoso de mashua negra luego se agitó, se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, luego se leyó en un espectrofotómetro UV/VIS GENESYS 10S (Thermo Scientific) a 515nm de longitud de onda. La calibración fue hecha con una solución de Trolox (ácido (\pm)-6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametil-croman-2- carboxílico de EMD Chemicals Carbiochem USA) y la actividad antioxidante total fue expresada como micromoles de equivalentes Trolox por gramo de mashua negra. Usando el solvente etanol como blanco. Con respecto al radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, Free radical Calbiochem Merck) se ha preparado a 50 μ m en 100 mL y de esta solución se ajusta a una absorbancia de 0.7 (\pm 0.02) con etanol.

La tabla 15 muestra los resultados obtenidos de un análisis por triplicado, tomándose como resultado el promedio de las mismas.

Tabla 15: Capacidad antioxidante TEAC DPPH (umol trolox/g)

MUESTRA	TEAC DPPH (umol trolox/g)	PROMEDIO	SD
* Mashua negra	39.4	42.76	2.92
* Mashua negra	44.6		
* Mashua negra	44.3		

Datos expresados en media \pm SD; n=3. p<0.05

* Se realizó el análisis solo en el extracto óptimo

4.10. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

La tabla 15 muestra la concentración de fenoles totales en extractos de mashua negra que fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Tabla 16: Contenido de polifenoles totales PFT (mg ácido gálico /g)

MUESTRA	PFT (mg ac. Gálico/g)	PROMEDIO	SD
* Mashua negra	10.29	10.66	0.624
* Mashua negra	11.39		
* Mashua negra	10.32		

Datos expresados en media \pm SD; n=3. p<0.05

* Se realizó el análisis solo en el extracto óptimo

4.11. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.11.8. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS ÓPTIMOS DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE MASHUA NEGRA.

En el presente estudio determinó las condiciones óptimas de extracción de antocianinas con solvente de grado orgánico (etanol acidificado con ácido cítrico) a diferentes condiciones de extracción así como se muestra en la tabla 9. El resultado óptimo de los tratamientos se muestran en la tabla 10; (temperatura 37.769 °C; pH 3.317 y tiempo 264.564 minutos, obteniéndose 170.36 mg cianidina 3-glucosido/100g de antocianinas totales de mashua negra). Siendo el valor determinado superado con el que ha sido reportado en cerezas rojas (223.0 mg de cianidina-3-glucósido /100g pero muy superior al encontrado en moras y diversos cultivares de frambuesas y grosellas rojas (103.5-197.8 y 35.0-49.0 mg de cianidina-3-glucósido /100g, respectivamente) (84).

Asimismo, los parámetros óptimos de extracción concuerdan con los expresados en el estudio de investigación *“Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos”* (12); donde se usa como diseño experimental superficie respuesta y reporta como mejores condiciones de extracción una proporción materia prima/solvente 1:3 kg/kg, temperatura 36 ± 1 °C y tiempo de extracción 2 h, obteniendo así una concentración de antocianinas totales de 879.0 ± 12.9 mg cianidina-3-glucósido/100 mL. También, en la investigación *“Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.)* (13)” Se determinó que las mejores condiciones para la extracción de antocianinas con la metodología de superficie de respuesta con tres factores para esta especie son 50% de solvente acidificado (etanol acidificado 1% ácido ortofosfórico), tiempo de proceso de 4 horas y temperatura de 30 °C, alcanzando 62 mg cianidina-3-glucósido/100g; respecto al tiempo, el pH y la temperatura de extracción estos resultados concuerdan con el presente estudio de investigación para antocianinas de mashua negra, estos valores se deben a que durante el proceso de extracción se evitó posibles alteraciones por factores tales como la incidencia de la luz y la concentración por rotaevaporador que pudieran haber alterado el contenido total de antocianinas en los tuberculoso de mashua negra.

El estudio *“Extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (Zea mays L) y determinación de su actividad antioxidante”*, se determinó que los extractos antociánicos muestran mayor estabilidad en un rango de pH de 2 a 6 y temperaturas entre 10 y 50 °C; al respecto Giusti y Wrolstad (81), consideran que 45 °C es una temperatura adecuada para la extracción de antocianinas debido a que temperaturas superiores a esta producen degradación por efecto de la temperatura.

Respecto a la cantidad de antocianinas total de mashua negra, en el presente estudio se determinó como valor óptimo 170.36 mg cianidina 3-glucosido/100g de mashua negra, este valor se encuentra próximo a estudios tales como *“Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)”* (59), donde se reporta antocianinas que fluctuaron entre 9.0 y 267.7 mg cianidina 3-glucosido /100 g dependiendo de la variedad y genotipo de mashua, las variedades de mashua morada o negra son las que reportan los mayores valores de antocianinas; *“Actividad antioxidante de Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur”* (14), reporta $192,63 \pm 1,28$ mg de cianidina-3-glucósido/100g y *“Evaluación de los compuestos bioactivos (fenólicos totales, antocianinas, carotenoides totales) y capacidad antioxidante de diferentes genotipos de mashua (Tropaelum tuberosum Ruiz & Pavón)”*, (85), reporta 205.04 mg de cianidina-3-glucósido/100g. Las variaciones respecto a la cantidad pueden deberse a factores tales como la variedad del cultivo, las condiciones ambientales de cultivo, la incidencia de la luz en el proceso de extracción, el método y tipo de solvente de extracción y el índice de madurez del tubérculo tal como lo afirma David Campos (85), en su estudio de investigación.

4.11.9. PERFIL CROMATOGRÁFICO DE ANTOCIANINAS

El perfil cromatográfico de mashua negra evaluado en el presente trabajo de investigación, mediante la superposición de curvas patrón muestra que el pico de antocianina de mayor similitud frente a patrones identificados corresponde al pico 3, identificándose la antocianidina Delfinidina como componente mayoritario, este resultado concuerda con los obtenidos en las investigaciones *“Perfiles fenólicos de tubérculos mashua andino (Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón). Identificación por HPLC-DAD y evaluación de su actividad antioxidante”* (11), en la que se obtiene como resultado la presencia de 8 picos predominantes. Pico 1 correspondió a ácido gálico y la presencia de 11 antocianinas diferentes. Los dos pigmentos principales (56.4-73.0% del rango de área total al 520 nm) se identificaron como delfinidina 3-glucósido-5 acetil-ramósido y delfinidina 3-soprósido-5 acetil-ramósido. Además en el estudio de investigación *“Optimización de las condiciones de extracción de antioxidantes y compuestos fenólicos de tubérculos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruíz & Pavón)”* (9), se determinó la presencia de un total de nueve picos representativos a 280 nm para ambos genotipos de mashua. Los perfiles de HPLC a 520 nm mostraron que los picos 2-8 son antocianinas. Los datos espectrales DAD-UV / visible para los picos 1 y 9 mostraron absorbancias máximas a 215.0 / 231.0 / 279.4 nm y 253.0 / 287.0 nm, respectivamente. Los picos 1 y 9 corresponden a fenómenos de los tipos de flavanol y ácido benzoico, respectivamente. En todos los casos antes mencionados se trabajaron con tubérculos de mashua negra entera, ninguno de ellos pertenece a un tratamiento específico de extracción.

4.11.10. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la investigación *“Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)”* (10). Se determinó que la capacidad antioxidante para las variedades de mashua en estudio fluctúa entre (4.9 y 39.5 $\mu\text{mol TE/g.}$) dependiendo de la intensidad de la coloración en cada cultivar de mashua, así mismo Ríos en la investigación *“Contribución al estudio de algunos compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante presente en diez genotipos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón) y a la evaluación de su estabilidad”* (86). Quien trabajó con 10 genotipos de mashua, encontró que la mayor CAOX hidrofílica fue de (69,378 $\mu\text{mol TE/g}$) para el genotipo ARB 5241 de coloración morada (la coloración se presentó a nivel de la cáscara y pulpa); Comparado estos valores con los resultados obtenidos (42.76 \pm 2.92 $\mu\text{mol TE/g}$) se puede apreciar que los resultados obtenidos se encuentran ligeramente variables a los valores antes determinados; esta diferencia podría atribuirse a que la capacidad antioxidante está directamente relacionada con el contenido de pigmentos que presenta el alimento o también por las condiciones de cultivo del producto (período de cultivo, riego, condiciones del suelo, exposición al sol, etc); puesto que los cultivares desarrollan mayor capacidad antioxidante como mecanismo de defensa a condiciones medioambientales adversas (87).

La CAOX del arándano en diferentes estados de madurez en la investigación *“Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit”* (88). Encontró en promedio 17 $\mu\text{mol TE/g}$, comparado este resultado con los encontrados la presente investigación (42.76 \pm 2.92 $\mu\text{mol TE/g}$) se puede observar que la mashua negra tiene un poco más del doble de CAOX que la del fruto en mención. Teniendo en cuenta que, las propiedades antioxidantes de los arándanos están bien documentadas en la literatura y que son catalogados entre los frutos que poseen CAOX altas entre muchas otras frutas, podemos así, indicar que la mashua negra se presenta como una muy buena fuente de antioxidantes que fue corroborado por el análisis DPPH.

Por otra parte, la investigación *“Antioxidant activity and profiles of common vegetables in Singapore”* (89). Evaluaron la CAOX de 66 tipos de vegetales de consumo habitual en Singapur encontrando que el cilantro y las algas marinas secas tenían la más alta CAOX ORAC (60.45 y 61.07 $\mu\text{mol TE/g b.h}$, respectivamente) seguidas de col china, espinaca, jengibre, brotes de soya, berros, chile rojo, repollo rojo, ajo, caupi, etc; con valores que van de (40.03, 35.53, 31.62, 31.26, 28.72, 27.75, 23.06, 22.36, 20.10 $\mu\text{mol TE/g}$), respectivamente. Comparando estos valores con los resultados de este estudio se puede apreciar que el valor (42.76 \pm 2.92 $\mu\text{mol TE/g}$) encontrado en la mashua negra, es superado solo por el cilantro y las algas marinas, siendo muy comprable y superior a los demás vegetales evaluados.

4.11.11. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

El presente trabajo de investigación muestra que la cantidad de polifenoles totales evaluados por el método de Folin-Ciocalteu, es de $(10.66 \pm 0.624 \text{ mg ácido Gálico/gr})$, estos resultados se encuentran ligeramente bajos del rango encontrado en la investigación *“Optimización de las condiciones de extracción de antioxidantes y compuestos fenólicos de tubérculos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón)”* (9), donde se encontró un contenido de compuestos fenólicos totales para 10 genotipos de mashua negra (proveniente de Huancayo), comprendido entre $(8.1 \text{ y } 25.4 \text{ mg AGE/g})$, destacando en especial los genotipos de color morado (presentaron valores de compuestos fenólicos entre 5 y 7 veces más alto que sus pares amarillos).

Esta variación puede deberse a que se trabajó con tubérculos congelados de mashua negra, el cual podría afectar en contenido total de fenoles; ya que los ácidos fenólicos están presentes principalmente en forma ligada, unidos a los compuestos estructurales de la pared celular y procesos, tales como el tratamiento térmico, pasteurización, fermentación y congelación, contribuye a la liberación de estos ácidos fenólicos unidos, haciéndolos más sensibles al efecto térmico, lo cual podría provocar la disminución antes mencionada del contenido de ácido fenólicos si resulta ser estables al calor una vez liberados de la pared celular (90)

Asimismo, Chirinos et al en su investigación, *“Perfiles fenólicos de tubérculos mashua andino (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón). Identificación por HPLC-DAD y evaluación de su actividad antioxidante”*. (11), indican que la cinética de la acumulación o desaparición de los compuestos bioactivos durante la maduración depende tanto de la variedad y el compuesto considerado. También, se sabe que la genética, la temporada de cosecha y las condiciones geográficas y ambientales pueden influir significativamente en el contenido de metabolitos secundarios de las plantas. Estos factores podrían haber sido quienes influyeron en la cantidad total de polifenoles evaluados a mashua negra provenientes del distrito de Kishuará. Además, en la investigación, *“Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)”* (10). Se determinó el contenido de compuestos fenólicos totales de los 84 cultivares de mashua estando los valores comprendidos entre $(5.54 \text{ y } 16.75 \text{ mg AGE/g})$, estos resultados coinciden con los encontrados en el presente trabajo de investigación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Los parámetros óptimos de extracción de antocianinas en mashua negra corresponden a (temperatura 37.769 °C; pH 3.317 y tiempo 264.564 minutos), obteniéndose 170.36 mg cianidina 3-glucosido/100g de antocianinas totales de mashua negra a un porcentaje de variación de la variable respuesta de 83.1695 porciento ($r^2=0.8312$), este último resultado indica que el contenido de antocianinas dependen en un 83% de los tres factores en estudio,
- El extracto óptimo de los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “mashua negra” presentan una actividad antioxidante TEAC DPPH de $42.76\pm 2.92\mu\text{mol}$ equivalente de Trolox/g determinados por el método de DPPH.
- El contenido de polifenoles totales del extracto óptimo de tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón “mashua negra”, fue de 10.66 ± 0.624 mg ácido Gálico/gr, determinados por el método de Folin Ciocalteu.
- El análisis de varianza indicó que de las tres variables en estudio (temperatura, tiempo y pH), la variable pH tiene un efecto significativo en la extracción de antocianinas (0.0001 valor-P menor que 0.05); el cual muestra que el pH es la variable más importante para la extracción de antocianinas en tubérculos de mashua negra.
- Se identificó un total de 8 picos antociánicos en tubérculos de mashua negra mediante HPLC líquida, destacándose como componente mayoritario la antocianidina Delfinidina.

5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos de este tubérculo bajo diferentes condiciones de procesamiento y determinar si estas propiedades son grandemente dependientes de estas condiciones.
- Realizar aislamiento y purificación de los compuestos químicos presentes en el extracto para determinar la capacidad antioxidante de cada uno de ellos.
- Realizar un estudio de comparación de los fenoles totales y capacidad antioxidante total en la cáscara y la pulpa de la mashua, también estudiar la comparación de estos por diferentes métodos
- Profundizar en el análisis por HPLC de masas de los compuestos fenólicos y antocianinas presente en el tubérculo de mashua negra. Para determinar específicamente que compuestos fenólicos y antocianinas son los responsables de las propiedades funcionales del tubérculo.
- Estudiar la cinética de degradación de los fenoles totales y la capacidad antioxidante durante la etapa del soleado y cocción de la mashua.

BIBLIOGRAFÍA

1. **GRAU, Alfredo; ORTEGA, Ramiro; NIETO, Carlos; HERMANN, Michael.** "*Mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pav.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*". 25, Roma-Italia: International Plant Genetic Resources Institute, 2003, Vol. 472.
2. **SUN, Jie; CHU, YF; WU, X; Liu, RH.** "*Actividades antioxidantes y antiproliferativas de frutos comunes*". Revista de química agrícola y alimentaria, 2002. pp. 7449-7454. Vol. 50.
3. **CACACE, J.E y MAZZA, G.** "*Optimización de la extracción de antocianinas de grosellas negras con etanol acuoso*". Journal of Food Science, 2003, Vol. 68, pp. 240-248.
4. **LÓPEZ-ALARCÓN, Camilo and DENICOLA, Ana.** "*Evaluación de la capacidad antioxidante de los productos naturales: Una revisión sobre ensayos químicos basados en células*": Analytica chimica acta, 2013, Vol. 763, pp. 1-10.
5. **MINAGRI: Ministerio de Agricultura y Riego.** "*Mashua (Tropaeolum tuberosum)*". Perú : INIA, Diciembre del 2012.
6. **ORTEGA, V.** "*Estudio Comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista funcional y toxicológico*". Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 2004.
7. **ESPÍN, Susana; VILLACRÉS, Elena y BRITO GRANDES, Beatriz.** "*Caracterización físico-química, nutricional y funcional de raíces y tubérculos andinos*". Ecuador-Perú: s.n, 2004, pp. 91-116.
8. **GARZÓN, Gloria Astrid.** "*Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos*": Revisión 3, Colombia: Acta Biológica Colombiana, 2008, Vol. 13.
9. **CHIRINOS, Rosana; CAMPOS, David; COSTA, Nora; ARBIZU, Carlos; PEDRESCHI, Romina; LARONDELLE, Yvan.** "*Optimización de las condiciones de extracción de compuestos fenólicos antioxidantes de tubérculos mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón)*". Lima-Perú : Instituto de Biotecnología (IBT), Universidad Nacional Agraria La Molina – UNALM, 2006.
10. **HUAMÁN HUACCHO, Carmen Violeta.** "*Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)*". Lima-Perú : Universidad Nacional Agraria La Molina. 2016. pp. 65-70.



11. **CHIRINOS, Rosana; CAMPOS, David; COSTA, Nora; ARBIZU, Carlos; PEDRESCHI, Romina; LARONDELLE, Yvan.** "*Perfiles fenólicos de tubérculos mashua andino (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón). Identificación por HPLC-DAD y evaluación de su actividad antioxidante.* Lima-Perú : Universidad Nacional Agraria La Molina, 2007.
12. **ZAPATA, L. M; HEREDIA, A. M; QUINTEROS, C. F; MALLERET, A. D; CLEMENTE, G; and CÁRCEL, J. A.** "*Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos*". Argentina: Ciencia, docencia y tecnología, 2009, Vol. 49, pp. 166-192.
13. **HERAS, Irina, ALVIS, Armando and ARRAZOLA, Guillermo.** "*Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera l.)*". Córdoba - Colombia: Universidad de Córdoba, 2013, Información tecnológica, Vol. 24, pp. 93-102.
14. **INOSTROZA, Luis. A; CASTRO, A. J; HERNÁNDEZ, E. M; CARHUAPOMA, M; YULI, R. A; COLLADO, A; and CÓRDOVA, J. S.** "*Actividad antioxidante de Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón (mashua) y su aplicación como colorante para yogur*": Ciencia e Investigación, 2015, Vol. 8, pp. 83-89.
15. **GORRITI GUTIERREZ, Arilmi; ARROYO ACEVEDO, J; NEGRON BALLARTE, L; JURADO TEIXEIRA, B; PURIZACA LLAJARUNA, H; SANTIAGO AQUISE, I; QUISPE JACOBO, F.** "*Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (Zea mays L.): Método de extracción*". Santiago, Chile : Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2009, Vol. 8.
16. **MEZA, G.** "*Cultivo de mashua*". Cuzco-Perú: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco. Centro de investigación en cultivos andinos. Asociación Arariwa. IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos, 1997.
17. **CAICEDO, Carlos.** "*Estudio y promoción de las tuberosas andinas dentro del agroecosistema andino en Ecuador*". Lima-Perú. El agroecosistema andino: problemas, limitaciones, perspectivas: anales del Taller Internacional sobre el Agroecosistema Andino, 1992-1993, p. 155.
18. **HERNÁNDEZ BERMEJO, J. E. and LEÓN, Jorge.** "*Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*". Roma-Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1992, pp. 150-151.

19. **SHAHIDI, F.** "*Fenólicos en cereales, frutas y verduras: Ocurrencia, extracción y análisis*". Washintong: American Chemical Society, pp. 162-175.
20. **ZAMBRANO, Eddie.** "*Estudio de la variabilidad de melloco (Ullucus tuberosus Caldas), oca (Oxalis tuberosa Molna) y mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon) en finca de agricultores Colta-Chimborazo*". Universidad Central del Ecuador, 2004.
21. **MONTALDO, A.** "*Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*". Lima-Perú : Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, 1972, pp. 235-236.
22. **MINISTERIO DE SALUD (MINSA). Centro Nacional de Alimentación y Nutrición.** "*Tablas peruanas de composición de alimentos*". Lima-Perú : Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, 2017. p. 146.
23. **BARRERA, Víctor H.** "*Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador*". International Potato Center, 2003.
24. **AL-SHERAJI, Sadeq Hasan; ISMAIL, A; MANAP, M. Y; MUSTAFA, S; YUSOF, R. M; and HASSAN, F. A.** "*Una revisión a los prebióticos como alimentos funcionales*". *Journal of Functional Foods*. 2013. pp. 1542-1553. Vol. 6. 4.
25. **YANG, Linxi; QUAN Sophia He; CORSCADDEN Kenneth; UDENIGWE Chibuike C.** "*Las perspectivas de la alcachofa de Jerusalén en la producción funcional de alimentos y bioenergía*". *Biotechnology Reports*, 2015, Vol. 5, pp. 77-88.
26. **ALVÍDREZ-MORALES, Alicia; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Blanca Edelia; and JIMÉNEZ-SALAS, Zacarias.** "*Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales*". *RESPYN*, 2002, Vol. 3, pp. 1-3.
27. **ASHWELL, Margaret.** "*Conceptos sobre los alimentos funcionales*". ILSI Europe, 2004.
28. **FORMAN, Henry Jay.** "*Incluso los radicales libres: una guía para la terminología y metodología de la investigación de radicales libres*". *Free Radical Biology and Medicine*, 2015, Vol. 78, pp. 233-235.
29. **LAMA-MORE, R; and MORÁIS-LÓPEZ, A.** "*Las grasas en la alimentación infantil. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados*". *Anales de pediatría*, 2005, pp. 16-23.

30. **DEWAPRIYA, Pradeep and KIM, Se-kwon.** s.l: "*Microorganismos marinos: una vía emergente en nutraceuticos modernos y alimentos funcionales*". Food Research International, 2014, Vol. 56, pp. 115-125.
31. **LEONG, Wai-Fun, LAI, Oi-Ming, LONG, Kamariah, TAN, Chin-Ping, CHE-MAN, Yaakob B,** s.l. *Preparación y caracterización de nanodispersiones de fitosterol solubles en agua.* Food Chemistry, 2011, Vol. 129, pp. 77-83.
32. **FU, Yuanqing; ZHANG, Yan; HU, Hunying; CHEN, Ying; WANG, Rong; LI, Duo;** s.l: "*Diseño y síntesis directa de nuevos fitosteroles de galloilo con excelente actividad antioxidante*". Food chemistry, 2014, Vol. 163, pp. 171-177.
33. **SANCLEMENTE, T; MARQUEZ-LOPES, I; FAJO-PASCUAL, M; COFAN, M; JARAUTA, E; ROS, E;** s.l: "*Los fitosteroles naturales en la dieta habitual influyen en el metabolismo del colesterol en sujetos sanos*". Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2012, Vol. 20, pp. 849-855.
34. **BADUI-DERGAL, Salvador; GÓMEZ-CEJUDO, Hector:** "*Química de los alimentos*". Revisión Úcnica. Mexico : Pearson educación, 2006.
35. **COSTA, Marcia; SOTO, Viviana; AH-HEN, Kong Shun; POO-BARRERA; Susan Mercedes;** s.l: "*Concentración de antocianinas en jugo de cranberries (Vaccinium macrocarpon Ait.) mediante nanofiltración*". Acceso, 2004, p. 6.
36. **KONG, Jin-Ming; CHIA, Lian-Sai; GOH, Ngoh-Khang; CHIA, Tet-Fatt;** s.l: "*Análisis y actividades biológicas de las antocianinas*". Phytochemistry, 2003, Vol. 64, pp. 923-933.
37. **BRUTO, Jeana; BRUTO, J.** "*Pigmentos en frutas*". Londres: Academic Press, 1987, pp. 59-63.
38. **FENNEMA, Owen R.** "*Química de los alimentos*". Zaragoza-España : Acribia, 1992.
39. **WALFORD, John.** s.l: "*Desarrollo histórico de la coloración de alimentos*". Developments in food colours, 1980, Vol. 1, p. 1.
40. **WESCHE- EBELING, Pedro; MONTGOMERY, Morris W. 3,** s.l: "*Fresa polifenoloxidasas: Su papel en la degradación de antocianinas*". Journal of Food Science, 1900, Vol. 55, pp. 731-734.

41. **CHANDRA, Amitabh; NAIR, Muraleedharan, G; IEZZONI, Amy.** 6, s.l: "*Evaluación y caracterización de los pigmentos de antocianina en cerezas ácidas (Prunus cerasus L.)*". Journal of agricultural and food chemistry,, 1992, Vol. 40, pp. 967-969.
42. **DELGADO-VARGAS, Francisco; JIMÉNEZ, A. R; PAREDES-LÓPEZ, O.** 3, s.l: "*Pigmentos naturales: Carotenoides, antocianinas y betalaínas: Características, biosíntesis, procesamiento y estabilidad*". Critical reviews in food science and nutrition,, 2000, Vol. 40, pp. 173-289.
43. **LEWIS, C. and WALKER, J.** s.l: "*Efecto de los polisacáridos sobre el color de las antocianinas*". Química de los alimentos, 1995, pp. 319-325.
44. **HULME, Alfred Cresswell;** s.l: "*La bioquímica de las frutas y sus productos*". The biochemistry of fruits and their products. , 1971, Vol. 2.
45. **KOPJAR, Mirela; NEDIC-TIBAN, Nela; PILIZOTA, Vlasta; BABIC, Jurislav;** s1, s.l: "*Estabilidad de antocianinas, fenoles y actividad de eliminación de radicales libres mediante la adición de azúcar durante el almacenamiento congelado de moras*". Journal of food processing and preservation, 2009, Vol. 33, pp. 1-11.
46. **KUSKOSKI, E. Marta; ASUERO, Agustin; GARCIA-PARRILLA, Carmen; TRONCOSO, Ana; FETT, Roseane;** 4, s.l: "*Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos*". Food Science and Technology, 2004, Vol. 24, pp. 691-693.
47. **WONG, Dominic WS.** "*Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*". Zaragoza - España: Acribia, 1994. p. 476.
48. **TIMBERLAKE, C. F. and HENRY, B. S.** 1, s.l: "*Pigmentos vegetales como colorantes alimentarios naturales*". Endeavour NS, 1986, Vol. 10, pp. 31-36.
49. **LOCK SING DE UGAZ, Olga.** 1. s.l: "*Colorantes naturales*". Pontificia Universidad Católica del Perú, 1997. pp. 208-210.
50. **LEYVA, D.** "*Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora*". Oaxaca, México: Universidad Tecnológica de Mixteca, 2009.
51. **VARGAS-SIMÓN, Georgia; SOTO-HERNÁNDEZ, Ramón Marcos and RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, María Teresa.** 3, s.l: "*Análisis preliminar de antocianinas en fruto de icaco (Chrysobalanus icaco L.)*". Revista Fitotecnia Mexicana, 2002, Vol. 25, pp. 261-265.

52. **JIMÉNEZ-DEL CARPIO Carla; SERRANO-FLORES, Carlos and GIUSTI, Mónica.** "*Caracterización de las antocianinas de los frutos de Berberis boliviana Lechler*". Lima-Perú: Revista de la Sociedad Química del Perú, 2009, Vol. 75, pp. 76-86.
53. **FULEKI, Tibor and FRANCIS, F. J. 1, s.l:** "*Métodos cuantitativos para antocianinas. Extracción y determinación de antocianinas totales en arándanos*". Journal of food science, 1968, Vol. 33, pp. 72-77.
54. **R, Eder.** "*Pigmentos: antocianinas*". 970, New York: Handbook of Food Analysis, 1996, Marcel Dekker, Vol. 1.
55. **LIU, Dezhong; GAO, Yunlong and KISPERT, Lowell D. s.l:** "*Propiedades electroquímicas de los carotenoides naturales*". Journal of Electroanalytical Chemistry,, 2000. pp. 140-150. Vol. 2. 488.
56. **PAIVA, Sergio AR and RUSSELL, Robert M.** "*β-caroteno y otros carotenoides como antioxidantes*". Revista del Colegio Americano de Nutrición: s.n, 1999. pp. 426-433. Vol. 18.
57. **RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B; KIMURA, Mieko; GODOY, Helena; AMAYA-FARFAN, Jaime.** "*Base de datos brasileña actualizada sobre carotenoides alimentarios: Factores que afectan la composición de carotenoides*". s.l: Journal of Food Composition and Analysis, 2008. pp. 445-463. Vol. 21.
58. **KRINSKY, Norman I.** "*Visión general del licopeno, los carotenoides y la prevención de enfermedades*". s.l: Actas de la Sociedad de Biología Experimental y Medicina, 1998. Vol. 218, pp. 95-97. 2.
59. **HUAMÁN-HUACHO, Carmen Violeta.** "*Capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, carotenoides y antocianinas de 84 cultivares de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavón)*". Lima-Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina, 2016.
60. **FRANKEL, Edwin N and MEYER, Anne S.** "*Los problemas de usar métodos unidimensionales para evaluar alimentos multifuncionales y antioxidantes biológicos*". s.l.: Journal of the Science of Food and Agriculture, 2000. pp. 1925-1941. Vol. 80.
61. **MAGALHÃES, Luís M; SEGUNDO, Marcela A; REIS-SALETTE, José.** "*Aspectos metodológicos sobre la evaluación in vitro de las propiedades antioxidantes*". 613. s.l.: Analytica chimica acta, 2008. pp. 1-19. Vol. 1.

62. **HUANG, Dejian; OU, Boxin and PRIOR, Ronald L.** "*La química detrás de los ensayos de capacidad antioxidante*". 6, s.l.: Revista de química agrícola y alimentaria, 2005, Vol. 53, pp. 1841-1856.
63. **ZULUETA, Ana; ESTEVE, Maria J and FRÍGOLA, Ana.** "*Comparación de ensayos ORAC y TEAC para medir la capacidad antioxidante de los productos alimenticios*". 1, s.l. : Food Chemistry, 2009, Vol. 114, pp. 310-316.
64. **MISHRA, Krishnanand; OJHA, Himanshu and CHAUDHURY, Nabo Kumar.** "*Estimación de las propiedades antirradicales de los antioxidantes mediante el ensayo DPPH: Una revisión crítica y resultados*". 4, s.l.: Food chemistry,, 2012, Vol. 130, pp. 1036-1043.
65. **BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth and BERSET, C. L. W. T.** "*Uso de un método de radicales libres para evaluar la actividad antioxidante*". 1, s.l. : LWT-Food science and Technology, 1995, Vol. 28, pp. 25-30.
66. **RE, R; PELLEGRINI, Nicoletta; PROTEGGENTE, Anna; PANNALA, Ananth; YANG, Min; RICE-EVANS, Catherine.** "*Actividad antioxidante aplicando un ensayo de decoloración de catión radical ABTS mejorado*". 9-10, s.l.: Free radical biology and medicine, 1999, Vol. 26, pp. 1231-1237.
67. **PRIOR, Ronald L; WU, Xianli and SCHAICH, Karen.** "*Métodos estandarizados para la determinación de la capacidad antioxidante y fenólicos en alimentos y suplementos dietéticos*". s.l.: Revista de química agrícola y alimentaria, 2005. pp. 4290-4302. Vol. 50.
68. **KRISHNAIAH, Duduku, SARBATLY, Rosalam and NITHYANANDAM}, Rajesh.** "*Una revisión del potencial antioxidante de las especies de plantas medicinales*". 3, s.l.: Procesamiento de alimentos y bioproductos, 2011, Vol. 89, pp. 217-233.
69. **OU, Boxin; HAMPSCH-WOODILL, Maureen and ANTES, Ronald L.** "*Desarrollo y validación de un ensayo mejorado de capacidad de absorción de radicales de oxígeno utilizando fluoresceína como sonda fluorescente*". 10, s.l.: Revista de química agrícola y alimentaria, 2001, Vol. 49, pp. 4619-4626.
70. **NIKI, Etsuo.** "*Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro e in vivo*". 4, s.l.: Biología y medicina de radicales libres, 2010, Vol. 49, pp. 503-515.

71. **BENZIE, Iris FF and STRAIN, John J.** "*La capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) como medida del "poder antioxidante": El ensayo FRAP*". s.l.: Bioquímica analítica, 1996. pp. 70-76. Vol. 239.
72. **FINKEL, Toren and HOLBROOK, Nikki J.** "*Oxidantes, el estrés oxidativo y la biología del envejecimiento*". 6809, s.l. : Nature, 2000, Vol. 408, p. 239.
73. **CHEESEMAN, K. H and SLATER, T. F.** "*Una introducción a la bioquímica de radicales libres*". 3, s.l.: British medical bulletin, 1993, Vol. 49, pp. 481-493.
74. **BERRA, B; CARUSO, D; RASETTI, MF; GALLI, G.** "*Propiedades antioxidantes de los componentes polares menores del aceite de oliva sobre los procesos oxidativos del colesterol en las LDL humanas*". Italia: Revista Italiana delle Sostanze Grasse (Italy), 1995.
75. **VAN SUMERE, C. F.** "*Fenoles y ácidos fenólicos, Métodos en bioquímica vegetal*". s.l: Academic Press, 1989, Vol. 1, pp. 29-73.
76. **SINGLETON, Vernon L; ORTHOFER, Rudolf and LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M.** "*Análisis de fenoles totales y otros sustratos de oxidación y antioxidantes mediante el reactivo Folin-Ciocalteu*". 14, s.l: Methods in enzymology, Academic press, 1999, Vol. 299, pp. 152-178.
77. **MONTGOMERY, D. C.** "*Diseño y análisis de experimentos*". México: Grupo Editorial Iberoamérica SA de CV, 1991. p. 589.
78. **BENAVENTE-VELÁSQUEZ, G. E.** "*Optimización del secado de choro (Aulacomya ater Molina) usando el método de superficie de respuesta*". Universidad Nacional Agraria La Molina Lima-Perú : Escuela de Post-Grado. Esp. en Tecnología de Alimentos,, 2003. p. 123.
79. **FERRERO, B; IBÁÑEZ, CABEZUDO, María Dolores and GONZÁLEZ, M. A.** "*Optimización del batido de vainilla mediante la metodología de superficie de respuesta*". s.l. : Alimentación, equipos y tecnología, 2000. pp. 77-82. Vol. 19.
80. **ELÍAS-PEÑAFIEL, C. E, SALVÁ, B and MORALES, E.** "*Optimización por aplicación del método de superficie de respuesta en productos cárnicos*". Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru): Agraria, 2006.
81. **GIUSTI, M. Mónica and WROLSTAD, Ronald E.** "*Caracterización de antocianinas de rábano rojos*". 2, s.l.: Journal of Food Science, 1996, Vol. 61, pp. 322-326.

82. **BARRAGAN-CONDORI, Melquiades and ARO-ARO, Juan Marcos.** *"Determinacion del efecto de procesos de coccion en papas nativas pigmentadas (Solanum tuberosum spp. andigena) sobre sus compuestos bioactivos"*. 1, s.l. : Revista de Investigaciones Altoandinas, 2017, Vol. 19, pp. 47-52.
83. **GUERRERO, Jaime; CIAMPI, Luigi; CASTILLA, Andrea; MEDEL, Fernando; SCHALCHLI, Heidi; HORMAZABAL, Emilio; BENSCH, Emma and ALBERDI, Miren.** *"Capacidad antioxidante, antocianinas y fenoles totales de bayas silvestres y cultivadas en Chile"*. 4, Chile : Chilean Journal of Agricultural Research, 2010, Vol. 70, pp. 537-544.
84. **PANTELIDIS, Georgios E.** *"Capacidad antioxidante, contenido de fenol, antocianina y ácido ascórbico en frambuesas, moras, grosellas rojas, grosellas y cerezas cornelias"*. 3, s.l.: Food chemistry, 2007, Vol. 102, pp. 777-783.
85. **CAMPOS, David; CHIRINOS, Rosana; ROGEZ, Herve; PEDRESCHI, Romina.** *"Evaluación de los compuestos bioactivos (fenólicos totales, antocianinas, carotenoides totales) y capacidad antioxidante de diferentes genotipos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón)"*. s.n.: Separations and Purification Technology. Lima-Perú, 2004, Vol. 3.
86. **Rios, C.** *"Contribución al estudio de algunos compuestos bioactivos y de la capacidad antioxidante presente en diez genotipos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavón) y la evaluación de su estabilidad"*. Lima-Perú.: Universidad Agraria La Molina, 2004. pp. 50-51.
87. **REPO-DE CARRASCO, Ritva and ENCINA-ZELADA, Christian René.** *"Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas"*. 2, s.l.: Revista de la Sociedad Química del Perú, 2008, Vol. 74, pp. 108-124.
88. **CELIK, Huseyin; OZGEN, Mustafa; SERCE, Sedat; KAYA, Cemal.** *"Acumulación fitoquímica y capacidad antioxidante en cuatro etapas de madurez de la fruta del arándano"*. s.l.: Scientia Horticulturae, 2008. pp. 345-348. Vol. 117.
89. **ISABELLE, Mia; LAN-LEE, Bee; THIAM-LIM, Meng; PUAY-KOH, Woon; HUANG, Dejian and NAM-ONG, Choon.** *"Actividad antioxidante y perfiles de vegetales comunes en Singapur"*. s.l.: Food Chemistry, 2010. pp. 993-1003. Vol. 120.
90. **RETTIG, Karen and ARLETTE, Mathias.** *"Estabilidad de Pigmentos Naturales, Polifenoles y Capacidad Antioxidante del Jugo de Murta (Ugni molinae Turcz)"*. Valdivia-Chile : Universidad Austral de Chile, 2014.

ANEXOS

Anexo 1: Diferencia en el valor “a” (variación en la lectura de absorbancias a pH 1 y pH 4.5)

Bloques	Temperatura	pH	Tiempo	“a”
1	20	3	180	<i>0.144</i>
1	60	3	180	<i>0.129</i>
1	20	4	180	<i>0.108</i>
1	60	4	180	<i>0.113</i>
1	20	3	300	<i>0.151</i>
1	60	3	300	<i>0.125</i>
1	20	4	300	<i>0.124</i>
1	60	4	300	<i>0.117</i>
1	6.36414	3.5	240	<i>0.132</i>
1	73.6359	3.5	240	<i>0.100</i>
1	40	2.6591	240	<i>0.229</i>
1	40	4.3409	240	<i>0.086</i>
1	40	3.5	139.092	<i>0.213</i>
1	40	3.5	340.908	<i>0.248</i>
1	40	3.5	240	<i>0.227</i>
1	40	3.5	240	<i>0.223</i>
1	40	3.5	240	<i>0.224</i>
2	20	3	180	<i>0.146</i>
2	60	3	180	<i>0.126</i>
2	20	4	180	<i>0.107</i>
2	60	4	180	<i>0.116</i>
2	20	3	300	<i>0.150</i>
2	60	3	300	<i>0.122</i>
2	20	4	300	<i>0.124</i>
2	60	4	300	<i>0.116</i>
2	6.36414	3.5	240	<i>0.130</i>
2	73.6359	3.5	240	<i>0.099</i>
2	40	2.6591	240	<i>0.226</i>
2	40	4.3409	240	<i>0.084</i>
2	40	3.5	139.092	<i>0.210</i>
2	40	3.5	340.908	<i>0.244</i>
2	40	3.5	240	<i>0.224</i>
2	40	3.5	240	<i>0.221</i>
2	40	3.5	240	<i>0.223</i>

Valor “A” para determinar el contenido de antocianinas totales por el método de pH diferencial.

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH\ 1.0} - (A_{520} - A_{700})_{pH\ 4.5}$$

A₅₂₀ = Lectura de absorbancia a 520 nm de longitud de onda.

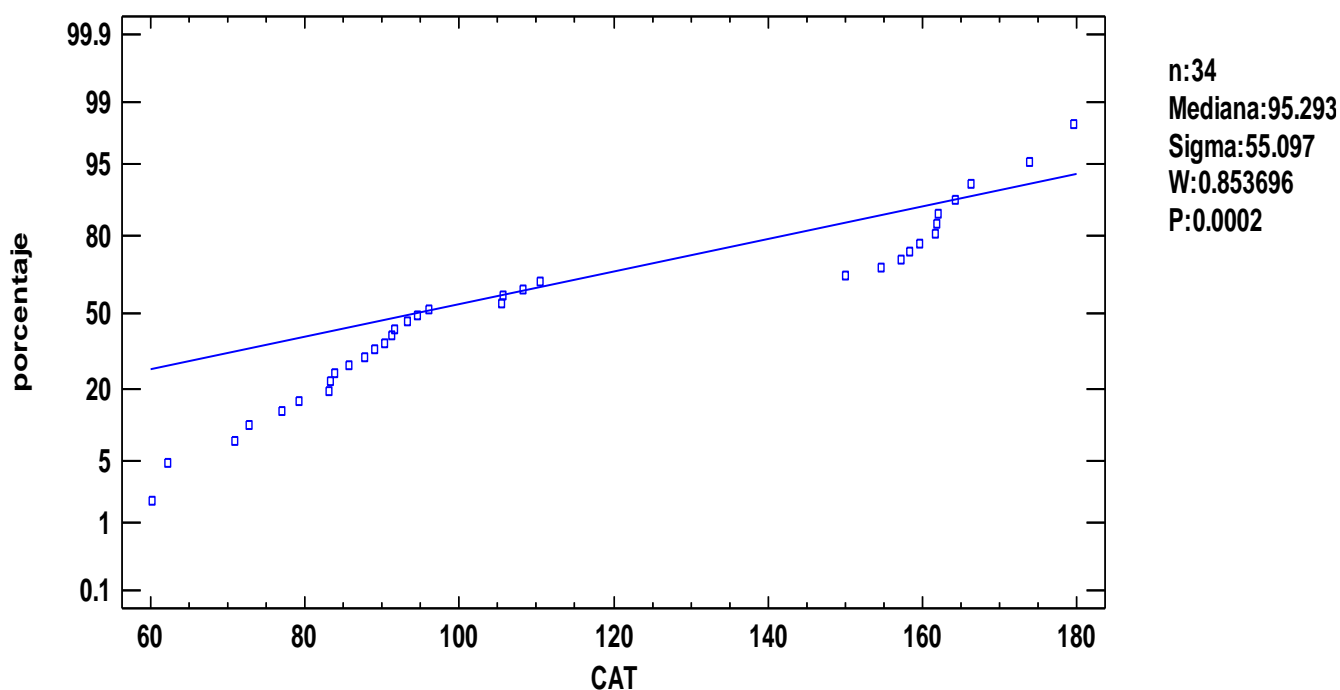
A₇₀₀ = Lectura de absorbancia a 700 nm de longitud de onda.

Anexo 2: Matriz de correlación para los efectos estimados

		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
(1)	promedio	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-0.6606	0.0000	0.0000	-0.6606	0.0000	-0.6606	0.0000
(2)	A:Temperatura	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(3)	B:pH	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(4)	C:Tiempo	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(5)	AA	-0.6606	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.2954	0.0000	0.2954	0.0000
(6)	AB	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(7)	AC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
(8)	BB	-0.6606	0.0000	0.0000	0.0000	0.2954	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.2954	0.0000
(9)	BC	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
(10)	CC	-0.6606	0.0000	0.0000	0.0000	0.2954	0.0000	0.0000	0.2954	0.0000	1.0000	0.0000
(11)	bloque	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

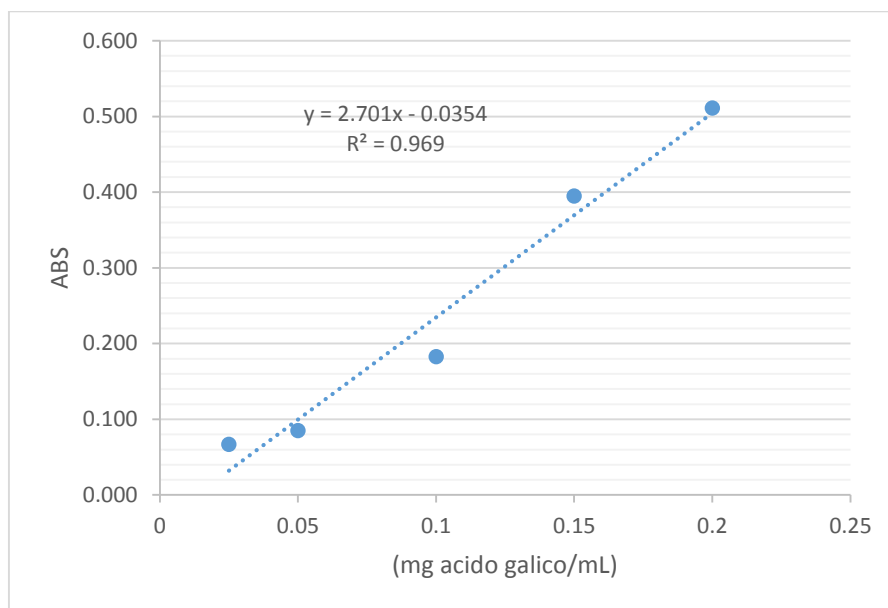
La matriz de correlación muestra el grado de confusión entre los efectos. Un diseño perfectamente ortogonal mostrará una matriz diagonal con 1's en la diagonal y 0's fuera de ella. Cualquier término distinto de cero implica que los estimados de los efectos correspondientes a esa fila y columna estarán correlacionados. En este caso, hay 3 pares de efectos con interacción distinta de cero. No obstante, como ninguna es mayor o igual que 0.5, probablemente será capaz de interpretar los resultados sin mucha dificultad.

Anexo 3: Gráfico de probabilidad normal para CAT



Anexo 4: Curvas estándares

Curva estándar: Método FOLIN CIOCALTEU



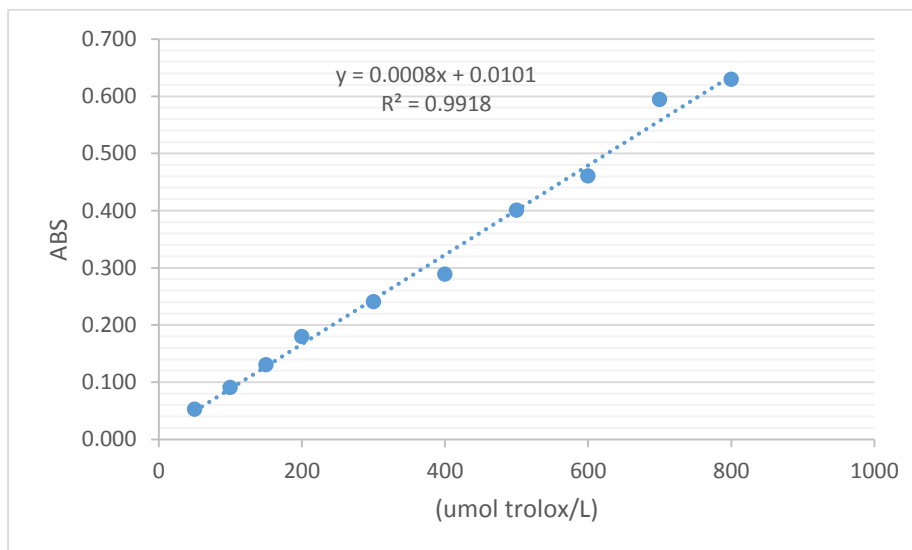
Ecuación: $2.701x - 0.0354$

Y: Diferencia de absorbancia

X: μmol de TE/gr

Rango de lectura: no se acepta lecturas menores a 0.200, ni lecturas mayores al blanco.

Curva estándar: Método DPPH



Ecuación: $Y = 0.0008x + 0.0101$

Y: Diferencia de absorbancia.

X: mg de AGE/gr

Rango de lectura: 0.100-0.700

Anexo 5: Representación gráfica de los procesos

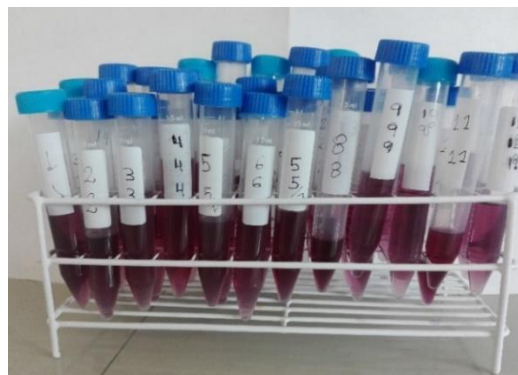
Preparación y extracción de pigmentos antocianicos de mashua negra



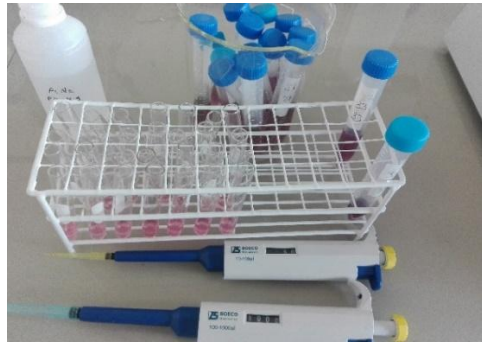
Filtrado del extracto acuoso



Extracto centrifugado de mashua



Preparación de muestras a pH 1 y pH 4.5



Lectura de absorbancias



Reactivo Folin-Ciocalteu (polifenoles totales)



Folin-Ciocalteu inicial



Variación de color por reducción



Evaluación de antioxidantes DPPH

