

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Escuela Académico Profesional De Ingeniería En Industrias
Alimentarias



TESIS

Para optar el título de:
Ingeniero En Industrias Alimentarias

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS EN
FRAMBUESA (*Rubus idaeus L.*) A DIFERENTES TEMPERATURAS Y
TIEMPOS DE EXTRACCIÓN

PRESENTADA POR

BACHILLER : DIANA MILAGROS MEJÍA ABANTO

ASESOR : MCs. DAVID RICARDO URIOL VALVERDE

CAJAMARCA – PERU

2016

DEDICATORIA

Al creador de todas las cosas, por todas las cosas que me da siempre y por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto.

Con cariño para mis padres que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme, darme su amor, y formarme para ser una persona capaz de enfrentar la vida.

A mi asesor por todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A las personas importantes en mi vida, que siempre me ayudaron, brindaron su amor incondicional e inspiraron amor en mí

A todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a nuestro amoroso Padre Celestial, por todas las cosas que me da día a día, enseñarme el camino a seguir, y por permitirme realizar este proyecto.

Agradezco también a mis padres, por su confianza y apoyo brindado incondicionalmente a lo largo de mi vida y mi carrera profesional, demostrando su amor en cada momento.

A mis hermanos y amigos por su apoyo, compañía, amor, tiempo compartido y apoyo constante.

Al ingeniero Ricardo Uriol por toda su colaboración, brindado su capacidad, conocimientos, tiempo y medios durante toda la realización de este proyecto

A los ingenieros Elías Huaripata, Corina Paredes, Marco Velásquez, Marleny Díaz por facilitar los medios para la obtención de los frutos de frambuesa.

Y finalmente agradezco a la Agencia Agraria San Marcos, a INIA, por colaborar con los frutos de frambuesa.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
CAPÍTULO I	8
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1 Problema de la investigación	11
1.2 Formulación del problema.....	12
1.3 Objetivos de la investigación.....	12
1.3.1 Objetivo general.....	12
1.3.2 Objetivo específico	12
1.4 Hipótesis de la investigación	12
CAPÍTULO II	13
2. REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1 Frambuesa (<i>Rubus idaeus L.</i>).....	13
2.1.1 Descripción de la especie (<i>Rubus idaeus L.</i>).....	13
2.1.2 Composición química de la frambuesa	14
2.1.3 Consideraciones dietéticas de la frambuesa	15
2.1.4 Usos e industrialización de la frambuesa	17
2.1.5 Mercado nacional	17
2.2 Antocianinas.....	18
2.2.1 Estructura de las antocianinas y color	21
2.2.2 Factores químicos que determinan el color y estabilidad de las antocianinas.....	23
2.2.3 Cuantificación del total de antocianinas mediante el método de pH diferencial	24
2.2.4 Actividad biológica de las antocianinas	26
2.2.5 Antocianinas como ingredientes alimenticios	28
CAPÍTULO III	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1 Ubicación geográfica del trabajo de investigación	31
3.2 Materiales.....	31
3.2.1 Material biológico.....	31

3.2.2	Material de campo	31
3.2.3	Material y equipo de laboratorio.....	31
3.3	Metodología	32
3.3.1	Trabajo de campo.....	32
3.3.2	Trabajo de laboratorio.....	33
3.3.3	Trabajo de gabinete.....	36
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
	LITERATURA CITADA.....	44
	ANEXOS	47
	GLOSARIO.....	58

RESUMEN

En la presente investigación se abordó el estudio del proceso de extracción de antocianinas, con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura y el tiempo en la extracción sólido - líquido de antocianinas a partir de frutos de frambuesa. Para el trabajo se empleó frutos de frambuesa de la variedad Heritage, cultivados en la Agencia Agraria San Marcos, provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca. Las variables evaluadas fueron temperatura, tiempo y contenido de antocianinas. La extracción se realizó mediante el método de destilación a reflujo con disolución de metanol al 20 % aplicando diferentes temperaturas y tiempo de extracción, la concentración del extracto se realizó mediante el método concentración por destilación al vacío y la cuantificación de antocianinas se realizó mediante el método del pH diferencial. Se observó que la variable temperatura tuvo una influencia significativa en la extracción de antocianinas del fruto de frambuesa, mientras que los tiempos aplicados no tuvieron una influencia significativa en el proceso. Los valores óptimos para las variables aplicadas en la extracción de antocianinas en solución de metanol al 20 % del fruto de frambuesa fueron la temperatura de 80 °C y el tiempo de 30 minutos donde se alcanzó el valor de 0,939 mg/g de fruta fresca.

ABSTRACT

The current investigation deals with the study of the process of extracting anthocyanin with the objective of determining the influence of temperature and time on the solid - liquid extraction process of anthocyanins from raspberry fruits. The variety of raspberry fruits that was used was Heritage, cultivated in Agricultural Agency San Marcos, province of San Marcos, department of Cajamarca. The variables that were evaluated were temperature, time and amount of anthocyanin. The extraction was done by distillation with 20 % methanolic solution, applying different temperatures and times of extraction. The concentration of the extraction was done by empty distillation and the quantification of anthocyanin was done by a pH differential method. It was observed that the change in temperature had a significant impact on the amount of anthocyanin extracted from the fruit, while timing had little influence. The optimal value of the variables examined in the extraction was a solution of 20 % methanol with a temperature of 80 degrees and time 30 minutes where 0,939 mg/g of fresh fruit was obtained.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos están presentes en frutas, vegetales y granos. Estudios epidemiológicos han sugerido que estos compuestos, entre los que se encuentran las antocianinas, podrían tener un efecto protector contra muchas enfermedades degenerativas (Cacace y Mazza, citado por Zapata 2014) al proporcionar al cuerpo una protección antioxidante.

Se denomina antioxidante a cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula o bien, a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres (López-Alarcón y Denicola, citado por Zapata *et al.* 2014). En este sentido, una dieta rica en frutas y vegetales está asociada con un bajo riesgo de contraer enfermedades crónicas - degenerativas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis y alteraciones cardiovasculares, atribuyendo este efecto protector a la presencia de compuestos bioactivos, dentro de los cuales destacan los polifenoles (Rangkadilok *et al.*, citado por Salinas *et al.* 2009). La frambuesa (*Rubus idaeus* L.) es una fruta que posee cantidades importantes de estos compuestos, particularmente ácido elágico, elagitaninos, antocianinas, ácidos fenólicos y algunos otros flavonoides (Salinas *et al.* 2009)

Las antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo. Por consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Bridgers *et al.*, citado por Zapata 2014). Pueden donar hidrógenos (Miller y Rice-Evans, 1997; Wang, 1997, citado por Zapata, LM. 2014) o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática (Ramírez Tortosa, citado por Zapata 2014). Se ha demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y contra radicales peróxido, (ROO•), superóxido (O₂•), hidroxilo (-OH) y oxígeno singulete (¹O₂) (Garzón 2008).

Pero el interés en los pigmentos de antocianina también se ha incrementado por su color, ya que se podrían utilizar como colorantes naturales (Bridgers *et al.*, citado por Zapata *et al.* 2014). Las antocianinas son responsables del color atractivo de muchas frutas y verduras (Zozio *et al.* 2011). Su intenso color rojo-púrpura es una fuente atractiva de colorante de alimentos naturales para la industria alimentaria y textil, constituyendo una alternativa a los colorantes alimentarios sintéticos (Bridgers *et al.*, citado por Zapata *et al.* 2014).

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Pereira-Kechinski *et al.*, 2010; Garzón 2008). A nivel comercial, las antocianinas se obtienen principalmente de los subproductos industriales de la uva. En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, presentan propiedades antioxidantes (von Elbe y Steven, citado por Zapata *et al.* 2014).

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

El método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Las condiciones de extracción, tales como relación sólido-líquido, temperatura, tiempo, tipo de disolvente y concentración de disolvente influyen en la estabilidad de las antocianinas, así como también en la concentración de antocianinas extraídas (Bridgers *et al.*, 2010, citado por Zapata *et al.* 2014). Así, se debe maximizar la recuperación de pigmentos, minimizar los compuestos adjuntos extraídos y limitar la degradación o alteración del estado natural del extracto. El conocimiento de los factores involucrados en su estabilidad y de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción, purificación y uso de las antocianinas como colorantes de alimentos. (Zapata *et al.* 2014)

En este sentido, Gorriti-Gutierrez *et al.* (2009^a) estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Ensayaron extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75 °C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25 °C y 30 minutos. También se ha estudiado la influencia de otras variables de proceso como el tipo de solvente de extracción y el pH. Así, Gorriti-Gutierrez *et al.* (2009^b) concluyeron que la extracción se ve favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20 % como agente de extracción y un pH entre 2 y 4.

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

1.1 Problema de la investigación

Las antocianinas son pigmentos vegetales con gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos; estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales por tanto es de gran importancia conocer los aspectos bioquímicos que enmarcan a estos. En la actualidad existe una creciente demanda en el uso de colorantes de origen natural, en reemplazo 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 (Garzón 2008).

El interés por los pigmentos antociánicos e investigación científica 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 las enfermedades coronarias, cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de la agudeza visual y comportamiento cognitivo. Por lo tanto, además de su papel funcional como colorantes, las antocianinas son agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano. A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad de material vegetal limitan su aplicación comercial (Wrolstad 2000; Cevallos-Casals y Cisneros Zeballos 2004, Citado por Garzón 2008).

La creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos ha sido investigada por Hallagan, 1991, y Lauro, 1991, quienes reportaron que los colorantes rojo N° 2 y N° 40 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia, pero el rojo N° 40 aún se encuentra en escrutinio en Estados Unidos. Al mismo tiempo, dichos hallazgos se relacionan con modificaciones en la hiperactividad de niños de edad escolar lo cual puede considerarse un mal neuronal agudo (Breakey et al. 2007).

Tales antecedentes son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales como las antocianinas (Huck y Wilkes 1996; Birks 1999; Ersus y Yurdagel 2007; Olaya et al. 2008; Wallace y Giusti 2008, Citado por Garzón 2008.).

Las antocianinas se pueden extraer de vegetales y frutas, como por ejemplo las frambuesas, en este sentido en el presente trabajo se investigó la influencia de variables tiempo y temperatura del proceso de extracción sólido-líquido de antocianinas de frambuesas ya cultivados en la región de Cajamarca con el fin de ofrecer un esquema sobre el potencial de las antocianinas como colorantes de origen natural, además de sus propiedades antioxidantes.

1.2 Formulación del problema

¿A qué tiempo y a qué temperatura se extrae la mayor cantidad de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L.*)?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar la influencia de la temperatura y el tiempo en el proceso de extracción sólido - líquido de antocianinas a partir de frutos de frambuesa.

1.3.2 Objetivo específico

Determinar el contenido de antocianinas de frambuesa utilizando metanol como solvente a las temperaturas de 35, 60 y 80 °C y tiempos de extracción de 30 y 60 minutos.

1.4 Hipótesis de la investigación

A mayor temperatura y tiempo de extracción se obtiene mayor cantidad de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L.*).

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Frambuesa (*Rubus idaeus L.*)

La frambuesa roja o fresa del bosque (*Rubus sidaeus L.*) es el fruto del frambueso o sangüeso, un arbusto perenne de la familia de las Rosáceas, con ramas provistas de espinas, que crece mayoritariamente en regiones templadas (AREX 2014).

El frambueso es nativo de Europa y según parece tiene su origen en Grecia, donde fue encontrada en estado silvestre en el monte Ida (de ahí su nombre botánico). De Grecia pasó a Italia, a los Países Bajos, a Inglaterra y posteriormente a América del Norte. Las variedades que actualmente se encuentran en el mercado son: el frambueso rojo de frutos de color rojo (*Rubus idaeus*), se encuentra en Europa; y las especies y variedades de color rojo y negro del norte de América, tales como: frambueso silvestre (*Rubus strigosus*), frambueso negro (*Rubus occidentales*) y frambueso púrpura (*Rubus neglectus*). (Eroski 2016).

2.1.1 Descripción de la especie (*Rubus idaeus L.*)

La frambuesa es un fruto formado por diferentes drupas o granos rugosos y redondeados que, agrupados, forman una pequeña piña con aspecto circular o cónico. Cada una de las drupas dispone de un pequeño pelo dorado que sobresale del fruto. Su piel contiene un fino vello, aterciopelado, apenas perceptible a simple vista y en su interior dispone de pequeñas semillas que pasan casi desapercibidas durante su degustación en fresco. El tamaño de su base comprende entre 15 y 20 mm de diámetro. Las tonalidades que destacan en la frambuesa roja son las amarillas y verdosas cuando son ejemplares jóvenes, y rojizas en los frutos maduros, aunque otras variedades muestran colores diferentes como amarillo, blanco y negro. Al introducirlo en la boca para su degustación desprende sensaciones jugosas, carnosas, con sabores agrídulces únicos, así como aromas y perfume a frutos rojos del bosque (AREX 2014).

2.1.2 Composición química de la frambuesa

Las frambuesas contienen un porcentaje moderado de hidratos de carbono, mientras que su contenido en proteínas y lípidos, al igual que su valor energético es bastante escaso. Dentro de las frutas, la frambuesa destaca por su alto contenido en fibra. Así mismo, contiene cantidades importantes de vitamina C. Una cucharada sopera de frambuesas aporta casi el 7 % de las ingestas diarias recomendadas para esta vitamina. También es apreciable su contenido en niacina, ácido fólico y vitamina E. Entre sus minerales, destacan el magnesio, el hierro, y el fósforo. En las frambuesas, cabe destacar, además, su alto contenido en compuestos fenólicos (monofenoles, polifenoles y flavonoides) entre los que se encuentran las antocianinas (tabla 2), cianidinas, elagitaninos, ácido elálgico e hidroxicinamatos, que junto a las vitaminas C y E, confieren a este alimento una gran capacidad antioxidante. Además, parecen ejercer una acción antimicrobiana, potenciadora del sistema inmune y reguladora de la presión arterial y la glucemia. (MAPAMA 2016).

Tabla 1. Composición de los frutos de frambuesa

Constituyente	Cantidad /100 g	Constituyente	Cantidad /100 g
Agua	87 g	Zinc	0,3 mg
Calorías	40 kcal	Ácido ascórbico	32 mg
Proteínas	1,4 g	Tiamina	0,03 mg
Grasas	0,3 g	Rivoflavina	0,05 mg
Carbohidratos	4,6 g	Niacina	0,8 mg
Fibras	6,7 g	Ácido pantoteico	0,09 mg
Calcio	25 mg	Vitamina B ₆	0,06 mg
Hierro	0,7 mg	Vitamina A	1 μ g
Magnesio	19 mg	Vitamina D	0 μ g
Fósforo	31 mg	Vitamina E	0,48 mg
Potasio	170 mg		
Sodio	3 mg		

Fuente: Tablas de Composición de Alimentos. Moreiras y col., 2013

2.1.3 Consideraciones dietéticas de la frambuesa

Propiedades nutritivas

Es una fruta que aporta una cantidad destacable de fibra, que mejora el tránsito intestinal. Constituye una buena fuente de vitamina C, ácido cítrico y ácido elágico, flavonoides y folatos, minerales como el potasio, el magnesio y el calcio. La vitamina C tiene acción antioxidante, al igual que el ácido elágico y los flavonoides (pigmentos vegetales), dicha vitamina interviene en la formación de colágeno, huesos y dientes, glóbulos rojos y favorece la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones. El ácido cítrico, posee una acción desinfectante y potencia la acción de la vitamina C. El ácido fólico interviene en la producción de glóbulos rojos y blancos, en la síntesis de material genético y formación de anticuerpos del sistema inmunológico. El potasio es necesario para la transmisión y generación del impulso nervioso, para la actividad muscular normal e interviene en el equilibrio de agua dentro y fuera de la célula. El magnesio se relaciona con el funcionamiento de intestino, nervios y músculos, forma parte de huesos y dientes, mejora la inmunidad y posee un suave efecto laxante (Eroski 2016).

Propiedades para la salud

Las frambuesas son unos frutos que refrescan y estimulan el apetito. Una taza de frambuesas (125 gramos) contiene unos 10 gramos de fibra. Pese a su pequeño tamaño y a que su consumo, dentro de los hábitos alimenticios mediterráneos, se limita a su uso como fruta ornamental en distintos platos, es una gran portadora de fibra. A esta sustancia se le atribuye un destacado efecto protector del organismo, debido a un mecanismo de secuestro de sustancias potencialmente nocivas. La fibra "atrapa" determinados compuestos (ácidos biliares, colesterol) que son excretados junto con las heces, lo que beneficia a las personas con hipercolesterolemia o litiasis biliar. También acelera el tránsito intestinal, reduciendo el tiempo de contacto de algunas de estas sustancias nocivas con el tejido intestinal, lo que previene o mejora el estreñimiento y reduce el riesgo de cáncer de colon (Eroski 2016).

Las frambuesas son una excelente fuente de vitamina C, nutriente con comprobada acción antioxidante, al igual que los flavonoides y el ácido elálgico. Todos estos compuestos contribuyen a reducir el riesgo de enfermedades degenerativas, cardiovasculares e incluso del cáncer. Asimismo, la vitamina C tiene la capacidad de favorecer la absorción del hierro de los alimentos, por lo que mejora o previene la anemia ferropénica y la resistencia a las infecciones. (The First Fruit 2016).

Por su abundancia de ácido fólico o folatos, vitamina imprescindible en los procesos de división y multiplicación celular que tienen lugar en los primeros meses de gestación, su consumo resulta adecuado o interesante para las mujeres embarazadas para prevenir la espina bífida, alteración en el desarrollo del sistema nervioso (tubo neural) del feto (Eroski 2016).

Por su elevado contenido en potasio y bajo en sodio, resultan muy recomendables para aquellas personas que sufren hipertensión arterial o afecciones de vasos sanguíneos y corazón. No obstante, su consumo deberán tenerlo en cuenta las personas que padecen de insuficiencia renal y que requieren de dietas especiales controladas en este mineral. Sin embargo, a quienes toman diuréticos que eliminan potasio y a las personas con bulimia, debido a los episodios de vómitos autoinducidos que provocan grandes pérdidas de este mineral, les conviene el consumo de frambuesa (El Cierron 2016)

Tabla 2. Contenido de antocianinas de algunos productos alimenticios

Producto	Contenido de antocianinas (mg/100 g)
Frambuesa	60 - 687
Uva tinta	30 - 750
Fresa	19 - 55
Sauco	664 - 1816
Arándano	61.8 - 438
Vino tinto	164 - 350

Fuente: Adaptado Pascual-Teresa et al, 2010

2.1.4 Usos e industrialización de la frambuesa

- Aceites: proceso de obtención de aceites botánicos mediante prensado en frío y que contienen aceite de frambuesa, frambuesa negra, junto con aceite de otras especies que no son berries. Distintas formulaciones, con efecto antioxidante.
- Bebidas, alcoholes, licores y vinos: están asociados a los procesos de obtención como producción de vino de frambuesa sin productos químicos, desarrollo de bacterias para la fermentación de vinos de frambuesa, entre otros.
- Extractos (aceites, secos, líquidos): nuevos métodos para la extracción de ácido elágico desde la frambuesa.
- Insumos agrícolas: como ingrediente para el desarrollo de atrayente de insectos en cultivos para su control
- Ambiental: desarrollo de un producto purificador de aire (barrido de formaldehído) en cuya formulación se incorporan solo ingredientes naturales como cetona de frambuesa.
- Colorante: proceso más eficiente, de menor costo, de menor uso de energía para obtención de pigmento natural de frambuesas a partir de jugo de frambuesa.

2.1.5 Mercado nacional

En el Perú no existe una producción industrial de la frambuesa. Actualmente la producción nacional alcanza un promedio de 5 TM/ha (AREX 2014).

En más de 50 hectáreas se han sembrado frambuesas en nuestro país, y continuará creciendo a un ritmo de entre 10 % y 20 % anual. La mayoría de estos cultivos están instalados en Arequipa, Cajamarca, Lambayeque (Cañaris) y Lima (Huarochirí y Huacho), en tanto que las principales variedades que se cultivan son “Heritage” y “Meeker”. Actualmente, el costo de producción asciende entre S/ 75 mil a S/ 80 mil por hectárea. Nuestro país importa frambuesas en tubetes de micropropagación y en plantines, ambas formas provenientes de Chile y

Estados Unidos. Además, se están negociando nuevos protocolos, con otros países, para continuar importando material genético y semillas de este provechoso cultivo. Otro aspecto positivo es que nuestro país está en la capacidad para producir frambuesas todo el año, por lo que tendríamos un enorme potencial en la industria de congelado (Mattos 2015).

2.2 Antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fennema, citado por Aguilera *et al.* 2011). Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Badui, citado por Aguilera *et al.* 2011) también llamado 2-fenilbenzopirilio (Wong, citado por Aguilera *et al.* 2011), que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión (Badui, citado por Aguilera *et al.* 2011).

Fuentes. Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces (Brouillard, citado por Aguilera *et al.* 2011). Estos pigmentos son normalmente encontrados disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies, las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Pecket y Small, citado por Aguilera *et al.* 2011). La principal fuente de antocianinas son frutas rojas, principalmente bayas y uvas rojas, cereales, principalmente maíz morado, vegetales y vino rojo entre las bebidas (Harbone 1993; Escribano-Bailon *et al.* 2004, citado por Aguilera *et al.* 2011)

Extracción. La extracción de antocianinas es comúnmente llevada a cabo con metanol o etanol conteniendo una pequeña cantidad de ácido (15 %, HCl 1M) con el objetivo de obtener la forma del catión flavilio, el cual es estable en un medio altamente ácido. No hay diferencia significativa en lecturas de absorbancia o eficiencia de extracción entre el etanol y metanol (Abdel-Aal y Hucl 1999 citado por Aguilera *et al.* 2011). Es preferible usar etanol ya que es menos

tóxico, particularmente en usos alimenticios y ensayos clínicos. Adicionalmente, si los extractos contienen materiales lipídicos, la adición de un solvente orgánico tal como hexano al extracto puede eliminar algunas sustancias que contenga dichos materiales. El ácido puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acil en antocianinas aciladas, especialmente en aquellas con ácidos dicarboxílicos tales como ácido malónico, por lo que el uso de ácidos débiles es deseable, tal como ácido tartárico o cítrico para mantener los sustituyentes dicarboxílicos intactos (Castaneda-Ovando et al. 2009; Escriban o Bailon *et al.* 2004). El pH también ha mostrado que tiene una influencia significativa sobre el color de los extractos de antocianinas, las lecturas de absorbancia y la recuperación del extracto. A valores de pH más bajos ($\text{pH} < 2$), los extractos de trigo azul y morados exhibieron un cambio de color rojo a rojo oscuro (Aguilera 2011)

Separación y cuantificación. La técnica empleada más comúnmente hoy en día es la cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) puesto que esta permite la separación simultánea, la identificación y cuantificación de los compuestos de antocianinas sin requerir pureza excesiva de los extractos (Escribano-Bailon et al., citado por Aguilera, M. *et al.* 2011).

Las columnas (diámetro interno 4,6 mm y largo 100 - 300 mm) son usualmente mantenidas a temperatura ambiente, y los sistemas de elusión son binarios, usando solventes acidificados acuosos tales como ácido acético, ácido perclórico o ácido fórmico en un solvente orgánico tal como metanol o acetonitrilo (Zhang et al. 2004; Horbowicz *et al.* 2008, citado por Aguilera *et al.* 2011). Las antocianinas separadas son detectadas y cuantificadas a 525 nm y la identificación de antocianinas está basada en los tiempos de retención correspondientes y espectros ultravioletavísibles (UV-Vis) comparado con la de los estándares auténticos puros tales como delfinidina-3-glucósido, delfinidina-3-rutinósido, cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactósido, cianidina-3-rutinósido, peonidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y cloruro de cianidina que están comercialmente disponibles. El contenido total de antocianinas es calculado en $\mu\text{g/g}$ usando una curva estándar para cianidina-3-glucósido o delfinidina-3-glucósido (las

antocianinas más comunes en granos) (Abdel-Aal y Hucl, citado por Aguilera, M. *et al* 2011). Los espectros de absorción UV-Vis de una antocianina puede proveer información sobre la naturaleza de la antocianidina, modelo de glucosilación y posiblemente de acilación (Costa et al; citado por Aguilera *et al.* 2011).

Las antocianinas tienen un rango de absorción amplio al final del azul del espectro visible con una absorción máxima observada en las regiones de 500 - 535 nm (Abdel-Aal et al., citado por Aguilera *et al*- 2011). En adición, la electroforesis capilar (CE) ha sido usada para separar los compuestos iónicos de antocianinas por su carga (Castaneda-Ovando et al. citado por Aguilera *et al.* 2011). El uso de la CE en la separación de antocianinas es bastante nuevo, pero promisorio debido a la alta hidrosolubilidad de estos compuestos. La CE ha sido empleada para la determinación cuantitativa de antocianinas en vino como una alternativa de la RP-HPLC (Saenz-Lopez et al., citado por Aguilera *et al.* 2011).

Detección e identificación. Las propiedades espectrales son a menudo usadas para la caracterización de antocianinas, especialmente para identificar el tipo de antocianina. El análisis espectrométrico UV es la técnica usada comúnmente para identificar y cuantificar antocianinas. Como se describió anteriormente, el espectro de absorción de las antocianinas depende del pH. La absorción máxima a 520 - 540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas (Horbowicz et al., citado por Aguilera *et al.* 2011).

La espectrometría de masas (MS) es una técnica usada comúnmente que permite la identificación de antocianinas determinando la masa de los iones moleculares en la muestra y los fragmentos de la separación de estos compuestos a través de la aplicación de energías ionizantes más altas (Escribano-Bailon et al., citado por Aguilera *et al.* 2011). La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC - MS) es usada para confirmar la identidad de los compuestos de antocianinas en plantas y fluidos biológicos. La LCMS combina la separación sobre el sistema LC con la selectividad y sensibilidad del detector MS permitiendo la identificación de componentes

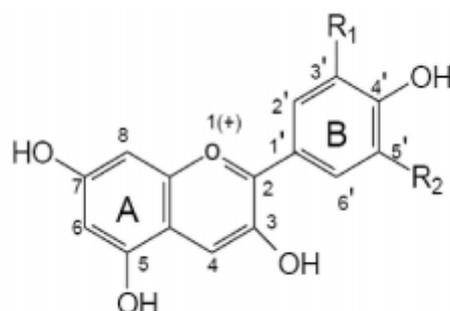
individuales de una mezcla de compuestos tales como extractos de plantas o fluidos biológicos (Costa et al. 2000).

Otras técnicas las cuales han sido usadas para la identificación de antocianinas incluyen la técnica de espectrometría de masas de ionización electrospray (ESI - MS) y la resonancia magnética nuclear (NMR) (Escribano-Bailon et al., citado por Aguilera, M. et al 2011). La ESI - MS es usada para la caracterización de antocianinas en matrices alimenticias complejas y es especialmente útil para la detección de metabolitos de antocianinas de nivel bajo en plasma humano (Horbowicz *et al.*, citado por Aguilera *et al.* 2011). La NMR es un método poderoso usado para la elucidación estructural de antocianinas tales como las antocianinas aciladas con derivados ramnósidos encontrados en algunas frutas como bayas negras y compuestos menores en análisis de vinos (Castaneda-Ovando *et al.* 2009; Kosir y Kidric, citado por Aguilera *et al.* 2011).

El uso de la espectroscopia NMR unidimensional y dos bidimensional ^1H y ^{13}C con métodos de supresión de señal larga permite una identificación segura para las señales de resonancia de ^1H y ^{13}C de antocianinas individuales en metanol deuterado (CD_3OD) (Kosir y Kidric, citado por Aguilera et al. 2011). La espectroscopía NMR es también más simple y menos consumidora de tiempo que la LC-MS.

2.2.1 Estructura de las antocianinas y color

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Fig. 1).



Aglicona	Sustitución		λ_{\max} (nm)
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja - rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul - rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (marmaja - rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul - rojo)
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul - rojo)

Figura 1. Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (Garzón 2008)

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, rutinosa, soforosa, sambubiosa y gentobiosa. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, caféico, ferúlico, sinápico, gálico, o p-hidroxibenzóico. Stintzing et al. (2002), demostraron que el tipo de sustitución glicosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; es así como sustituciones glicosídicas en la posición 5 al igual que acilaciones aromáticas, producen un desplazamiento hacia las tonalidades púrpura (Garzón 2008).

2.2.2 Factores químicos que determinan el color y estabilidad de las antocianinas

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento factores como su misma estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz determinan la estabilidad del pigmento (Wrolstad 2000; Cevallos Casals y Cisneros; Zeballos, 2004, citado por Garzón 2008).

Efecto del pH. El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100 % del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ion oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A-) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings 1999, citado por Garzón 2008)

Efecto de la temperatura. Incrementos de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Timberlake 1980, citado por Garzón 2008).

Efecto del oxígeno y el ácido ascórbico. El efecto degradativo del oxígeno y el ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas está relacionado. Sondheimer y Kertesz, (1953), reportaron que las condiciones que favorecen la oxidación aeróbica del ácido ascórbico en jugo de fresa y en sistemas modelo que contenían pelargo-nidina-3-glucósido proveniente de la fresa causaban grandes pérdidas de antocianinas, pero cuando el oxígeno era excluido del sistema no se observaba deterioro del color. De igual manera, Markakis *et al.*

1957, reportaron un efecto sinérgico entre el ácido ascórbico y el oxígeno sobre la degradación de la pelargonidina-3-glucósido en solución. En investigaciones más recientes, Garzón y Wrolstad (2002), confirmaron la aceleración de la destrucción de antocianinas de fresa cuando el ácido ascórbico está presente tanto en sistemas naturales como en sistemas modelo. El efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de las antocianinas ha sido explicado por Jurd, (1972), y Poeschl-Langston, (1981), como una posible reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos.

Otros factores. La concentración del pigmento y la actividad de agua de la matriz afectan la estabilidad del color.

Garzón y Wrolstad (2002), compararon la estabilidad de la antocianina de fresa (pelargonidina-3-glucósido) con la de la antocianina de la cáscara de rábano (pelargonidina-3-soforósido 5-glucósido acilada con ácidos aromáticos y alifáticos) y encontraron que dicha estabilidad era independiente de la estructura, a una misma concentración de pigmento. Hoshino et al., (1992), y Dangles et al., (1994), demostraron que cuando la concentración de antocianinas alcanza valores altos, se presentan fenómenos de autoasociación entre dos cationes flavilio, dos formas hemiacetal, dos bases quinoidales, e inclusive, entre una base quinoidal y un catión flavilio y protegiendo la molécula de antocianina. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas Probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la pseudobase inestable (Garzón y Wrolstad, 2001; Olaya et al., 2008).

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

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 implica el uso de solventes ácidos.

Tabla 3. Métodos de extracción de antocianinas

Método	Características
0,001 % HCl en metanol	Este es el método más efectivo, pero el HCl es corrosivo y el metano tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0,001 % HCl en etanol	80 % tan efectivo como el metanol.
0,001 % HCl en agua	27 % tan efectivo como el metanol.
Metanol acidificado con ácido cítrico	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.
Agua acidificada con ácido acético	En eficiencia es seguido por el ácido cítrico, tartárico y clorhídrico.
Agua con 1 000 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

Delgado-Vargas *et al.*, 2000

Como se observa en la tabla 3 los métodos de extracción han ido en busca de mejores rendimientos, pero se han comprometido en cuestiones de seguridad (Delgado-Vargas *et al.*, 2000).

Cuantificación de antocianinas monoméricas

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-Vis a diferentes valores de pH también varían y nos ayudan a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas (Giusti y Wrolstad, 2001). La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Estas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (260 - 280 nm) y

la región visible (490 - 550 nm). Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas monoméricas, generalmente expresados como cianidina-3-glucosido.

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 espectrometría de UV-Visible. 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 bisulfito de sodio y peróxido de hidrogeno (Leyva, 2009).

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5. El método del pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas (Leyva, 2009).

2.2.4 Actividad biológica de las antocianinas

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa et al., 1999 citado por Aguilera, M. et al 2011) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo (Aguilera 2011).

Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno,

además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli et al. 1998, citado por Garzón 2008). Estos resultados sugieren que las antocianinas son la explicación de la conocida “Paradoja Francesa”. Aunque varias hipótesis existen, se propone que el bajo riesgo de la enfermedad coronaria en Francia se asocia con el alto consumo de vino tinto (St. Leger et al. 1979; Xia et al. 1998). De igual manera, Wang y Jiao (2000) y Wang y Lin (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido, (ROO.), superóxido (O_2^-), hidroxilo (.OH) y oxígeno singulete (1O_2).

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Hagiwara et al. (2002), demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. De igual manera, Koide et al. 1997, reportaron efectos antitumorales al usar extractos de frijoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa. En cuanto a la actividad anticancerígena, Kamei et al. (1998), reportaron la supresión de células cancerígenas HCT-15 provenientes del colon humano y de células cancerígenas gástricas AGS al suministrar fracciones de antocianinas del vino tinto. Así también, Tristan et al. (2005), realizaron bioensayos que demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis.

Referente a la actividad antiinflamatoria, Wang y Mazza (2002), encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados. Por otra parte, Vuorela et al. 2005, encontraron efecto supresor de prostaglandina EG_2 , sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas de frambuesa.

De acuerdo a Tristan et al., 2008, antocianinas provenientes de cuatro especies de arándanos silvestres: *Amelanchier alnifolia*, *Viburnum trilobum*, *Prunus virginian* y *Shepherdia argentea*, muestran propiedades hypoglicémicas. Tales frutos, con alto contenido de sustancias fitoquímicas, han sido consumidas tradicionalmente por tribus norteamericanas para la protección de enfermedades crónicas como diabetes. Otro ejemplo de actividad antidiabética de las antocianinas fue reportado por Perossini et al. 1987.

Estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79 % de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas han sido reportados por Ohgami et al., 2005, quienes suministraron extractos de frutas ricas en antocianinas a ratas con deficiencia ocular, lo cual resultó en un efecto antiinflamatorio y de aumento de la agudeza visual. Joseph et al., 1999, y Shukitt-Hale et al. 2005, han demostrado que el comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio puede ser mejorado a través de suplementación nutricional con extractos de arándanos y fresas.

2.2.5 Antocianinas como ingredientes alimenticios

Las antocianinas se acumulan en mayor concentración en flores y frutas, pero también están presentes en hojas, tallos, órganos de almacenamiento y granos. Varias bayas y grosellas negras son las fuentes más ricas en antocianinas, aunque la berenjena y los granos pigmentados morados y azules también contienen altas cantidades de antocianinas. La enorme presencia de antocianinas en frutas, vegetales y vinos rojos resulta en una ingesta alta para los humanos. Dependiendo del país y de los hábitos nutricionales de los individuos, la ingesta diaria de antocianinas ha sido estimada en el rango de varios miligramos a cientos de miligramos por persona (Horbowicz et al., citado por Aguilera *et al.* 2011).

La ingesta de antocianinas se está incrementando de manera significativa debido a que los extractos y jugos de frutas y vegetales con alto contenido de antocianinas están llegando a ser mucho más disponibles comercialmente hoy en día, y los beneficios a la salud de las antocianinas han llegado a ser evidentes. Las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para asegurar una predominancia del catión flavilio. Por ejemplo, las antocianinas del trigo azul, del grano entero o en forma aislada son térmicamente más estables a pH 1 y su degradación no es significativa más baja a pH 2 que comparada a pH 5 (Abdel-Aal y Hucl, citado por Aguilera *et al.* 2011).

Esto podría explicar el principal uso de extractos de antocianinas, tales como pigmentos de uva en bebidas y bebidas no alcohólicas, donde aproximadamente 3 kg de extracto de antocianina al 1 % añadido a 1 000 L de bebida puede impartir un color rojo profundo. Actualmente, la mayoría del maíz pigmentado es usado para ornato debido a su apariencia colorida donde solamente una pequeña cantidad está siendo utilizada en la producción de tortillas coloreadas azul y rosa. El trigo morado es resquebrajado en grandes piezas, las cuales son distribuidas sobre el exterior del pan multigrano (Bezar, citado por Aguilera *et al.* 2011). Adicionalmente, Abdel-Aal *et al.* (2006) reportaron que los granos de maíz pigmentado tales como azul, rosa y morado tienen cantidades relativamente altas de antocianinas, especialmente el maíz morado (1 277 µg/g) proyectando una promesa para el desarrollo de alimentos funcionales y/o colorantes naturales. Similar a otros compuestos bioactivos, el medio ambiente en el cual ellos son cultivados es determinante para tener una influencia sobre la composición y concentración de antocianinas. Por lo tanto, durante la producción del cultivo se deben hacer esfuerzos para aumentar al máximo el contenido de antocianinas para frutas y cereales (Awika *et al.*, 2004 citado por Aguilera *et al.* 2011).

Extractos alimenticios ricos en antocianinas han sido incorporados y desarrollados dentro de suplementos alimenticios dietéticos. Por ejemplo, extractos de antocianinas de maíz morado han sido incorporados como un suplemento dietético antioxidante con recomendaciones para promover la salud, apariencia más joven y una piel más radiante (Shipp y Abdel-Aal, citado por Aguilera *et al.* 2011). Las antocianinas también están siendo vendidas como un suplemento llamado Medox, el cual incorpora una cantidad concentrada de cianidin-3-glucósido y delphinidin-3-glucósido extraídos de bayas noruegas (*Vaccinium myrtillus*) y grosellas negras (*Ribes nigrum*) (Biolink Group, citado por Aguilera *et al.* 2011).

El arroz rojo también está siendo fermentado y comercializado como un suplemento dietético y comercializado como Cholestin para ayudar a reducir los niveles de colesterol (Pharmanex 2009). Adicionalmente, el pan de trigo azul puede ser procesado para producir un polvo de trigo azul rico en antocianinas como un suplemento dietético (Abdel-Aal *et al.*, citado por Aguilera *et al.* 2011).

Por todo lo anterior, las antocianinas gradualmente están siendo incorporadas dentro de productos alimenticios y bebidas como colorantes, alimentos funcionales o suplementos alimenticios. El aumento en el contenido de antocianinas con mayor estabilidad y vida de anaquel prolongada incrementará las aplicaciones alimenticias, el consumo total y con ello incrementar su efecto benéfico en la salud humana (Shipp y Abdel-Aal, citado por Aguilera *et al.* 2011).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica del trabajo de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Química Ambiental del Departamento Académico de Ciencias Químicas y Dinámicas, ambiente 1E – 207 de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicados en el distrito Cajamarca, provincia Cajamarca y departamento de Cajamarca en las coordenadas UTM: N 9206505, E 773507 y una altitud de 2 720 msnm.

3.2 Materiales

3.2.1 Material biológico

- Frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L.*)

3.2.2 Material de campo

- Frascos de vidrio
- Cámara fotográfica

3.2.3 Material y equipo de laboratorio

3.2.3.1 Equipos

- Balanza analítica, Sartorius M-Class, modelo: AX
- Agitador magnético, IKA C-MAG MS 7
- Bomba de vacío Sartorius, Microsart, 22 l/min PN
- Espectrofotómetro UV – Vis, Bausch and Lomb Spectronic 20 Spectrophotometer
- Refractómetro Atago
- pH- metro Oakton
- Termómetro Boeco Germany
- Refrigeradora Daewoo

3.2.3.2 Material

- Tubos de ensayo de 5 mL
- Fiolas de 25, 50, 100 y 1 000 mL
- Vasos de precipitado de 100 mL

- Embudo de vidrio
- Matraz doble boca fondo plano 1 000 mL
- Matraz fondo redondo 250 mL
- Pipeta de 10 y 25 mL
- Condensadores
- Matraz Kitasato 1 000 mL
- Embudo Buchner
- Papel filtro
- Pera de jebe Sicherheits - Pipettierball
- Gradilla
- Soporte para embudos
- Soporte universal de laboratorio

3.2.3.3 Reactivos

- Disolución de metanol al 20 %
- Buffer a pH 1,0: KCl 0,25 M
- Buffer a pH 4,5: Acetato de sodio CH₃-COONa 0,4 M

3.3 Metodología

3.3.1 Trabajo de campo

Este estudio se realizó con frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L.*) procedentes de la parcela de frambuesa de la Agencia Agraria - San Marcos. La variedad utilizada fue Heritage. Los frutos de frambuesa utilizados en la presente investigación, fueron proporcionadas por INIA y la Agencia Agraria - San Marcos.

Para reducir el deterioro postcosecha, los frutos de frambuesa, inmediatamente después de ser recolectados, se colocaron en envases de vidrio. Después se almacenaron a 4 °C hasta ser transportados al laboratorio donde permanecieron en refrigeración (4 °C) hasta el momento de utilizarlos en las diferentes experiencias planificadas.

3.3.2 Trabajo de laboratorio

1. Obtención de los extractos de antocianina

La Figura 2 esquematiza la metodología de trabajo. Durante el proceso de obtención de extracto de antocianinas se tomaron muestras para realizar las determinaciones analíticas señaladas en la figura 2. Inicialmente, en las frambuesas utilizadas como materia prima se cuantificaron, sólidos solubles y pH.

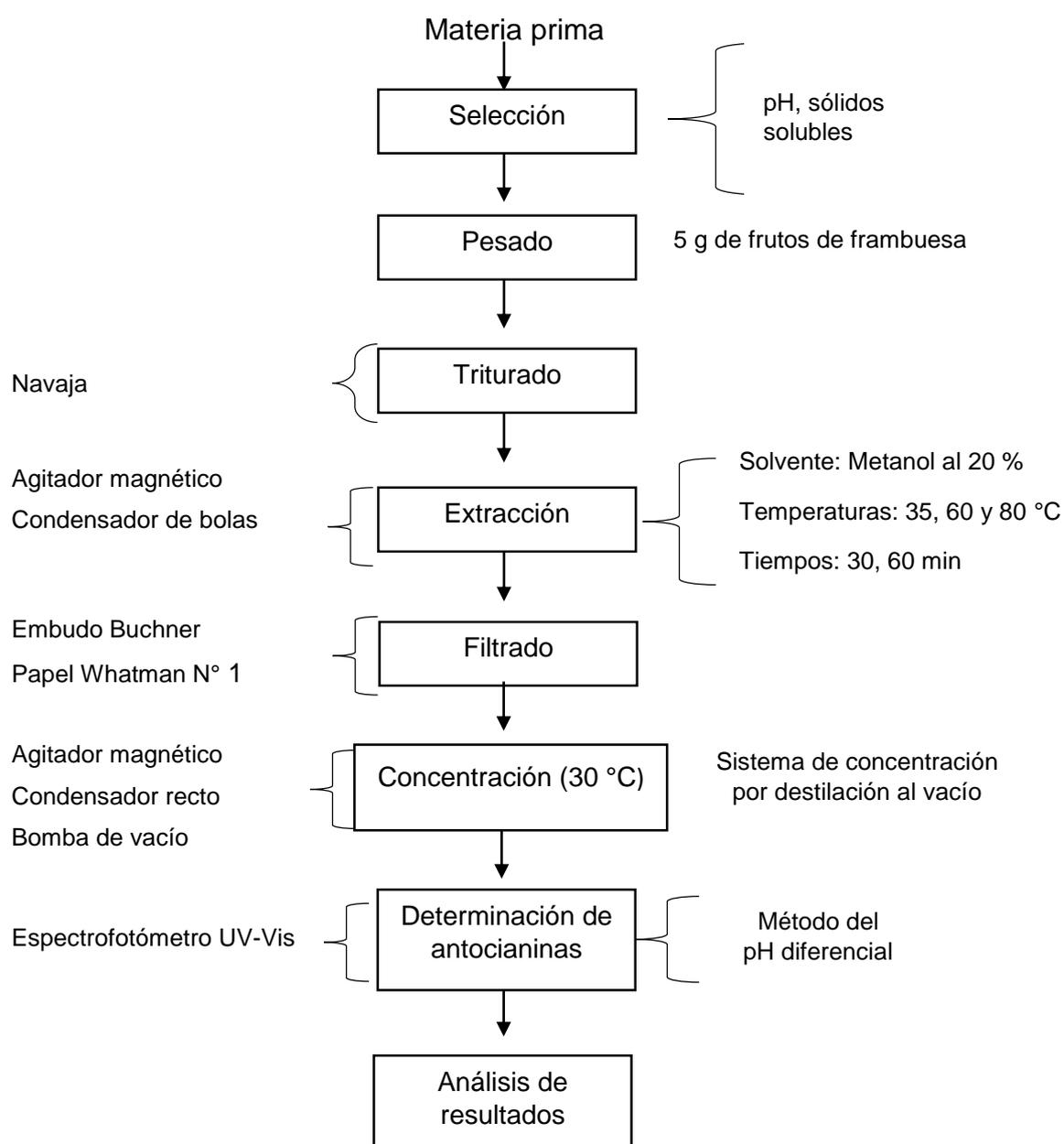


Figura 2. Flujograma de la metodología de trabajo, adaptado Fuente: Zapata et al. 2014

Se pesaron 5 g de frutos frambuesas enteras en la balanza analítica, las frambuesas se trituraron realizando pequeños cortes utilizando una navaja, posteriormente se realizó la extracción.

2. Extracción sólido - líquido de antocianinas

La extracción sólido-líquido de antocianinas se realizó en una serie de etapas en la que se estudiaron los variables temperatura y tiempo extracción.

En la extracción sólido - líquido de antocianinas, se utilizó como solvente una solución de metanol-agua (20:80 v/v) y 5 g de frutos de frambuesa triturada, ambos fueron colocados en un matraz doble boca fondo redondo, que se colocó en un sistema de extracción por reflujo formado principalmente por un agitador magnético y un condensador de bolas, a las temperaturas y tiempos de extracción utilizados (figura 5). Las variables de proceso estudiadas y los niveles de trabajo de las mismas fueron: temperatura (35, 60 y 80 °C), y tiempo de extracción (30 y 60 min). El diseño experimental arrojó un total de 6 tratamientos en las que se combinaron las variables estudiadas.

Variables en estudio

1. Temperatura (A)

a₁ = 35 °C

a₂ = 60 °C

a₃ = 80 °C

2. Tiempo (B)

b₁ = 30 min

b₂ = 60 min

Tabla 3. Tratamientos aplicados a la muestra

N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Materia prima	Solvente
1	35	30		
2	35	60		
3	60	30	Frutos de frambuesa	Metanol al 20 %
4	60	60		
5	80	30		
6	80	60		

Se utilizó el diseño completamente al azar con tres repeticiones.

Los extractos obtenidos en los diferentes tratamientos fueron filtrados utilizando papel filtro Whatman N°1 con la ayuda de un equipo de filtración al vacío formado

por el embudo Buchner, un matraz kitasato y una bomba de vacío (foto 6). Posteriormente los extractos de antocianinas filtrados fueron concentrados en un sistema de concentración por destilación al vacío formado principalmente por un agitador magnético, un condensador lineal y una bomba de vacío, a la temperatura de 30 ± 2 °C hasta reducir su volumen a 50 mL.

3. Determinaciones analíticas

Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles se determinó mediante el método refractométrico (AOAC, 1990). Los resultados se expresaron en °Brix.

pH

Para la determinación del pH se utilizó un pH - metro (Oakton)

Antocianinas totales

La concentración de antocianina monomérica se determinó por el método de pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Para ello, 1 mL de extracto de antocianina se mezcló con tampón a pH 1,0 de cloruro de potasio 0,025 M (foto 8) y otro con tampón a pH 4,5 de acetato de sodio 0,4 M (foto 9). La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (510 nm) es proporcional al contenido de antocianinas (Wrolstad, 1993). Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se midió la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizaron con un espectrofotómetro (Bausch & Lomb) contra un blanco de agua destilada. La concentración de las antocianinas se expresa como mg cianidina-3-glucósido/100 mL de extracto de acuerdo a la expresión siguiente (Wrolstad *et al.*, 2005) (ecuaciones 1 y 2):

$$A_{neta} = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4.5} \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$AT \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A_{neta} \cdot M \cdot FD \cdot 10^3}{\epsilon \cdot \ell} \quad \dots\dots\dots (2)$$

Donde:

AT = Antocininas totales

AT = Antocianinas totales

A_{neto} = Cambio en la absorbancia

M = Masa molar para cianidina – 3 – glucosido; 449,2 g/mol

FD = Factor de dilución

*ε = Absortividad molar cianidina – 3 – glucosido; 26 900 L/mol * cm*

ℓ = Longitud de paso de celda, 1 cm

10³ = Factor de conversión de gramos a miligramos.

3.3.3 Trabajo de gabinete

Para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el laboratorio fueron digitados en programa de Excel de Microsoft y Minitab 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. Concentración de antocianinas en los diferentes tratamientos

T	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	AT (mg/g)
1	35	30	0,516 ± 0,231
2	35	60	0,655 ± 0,121
3	60	30	0,839 ± 0,116
4	60	60	0,838 ± 0,056
5	80	30	0,939 ± 0,086
6	80	60	0,821 ± 0,082

T: tratamiento, valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

La extracción de antocianinas en frutos de frambuesa en disolución de metanol al 20 %, según el diseño factorial que consideró los factores temperatura de extracción con los niveles 35, 60, 80 °C, y tiempo de extracción con los niveles 30, 60 min indica que existen diferencias altamente significativas con $p < 0,05$ para los diferentes tratamientos realizados a la muestra. Los valores encontrados para las antocianinas extraídas de las frambuesas, indican valores entre 0,516 mg/g fruto para el tratamiento (temperatura de 35 °C y tiempo 30 minutos) y 0,939 mg/g fruto para el tratamiento (temperatura de 80 °C y tiempo de 30 minutos).

Peña et al., (2006) en un trabajo relacionado con determinar el efecto de localidad y grado de maduración sobre el contenido de antocianinas y la actividad antioxidante en frutos de frambuesa de dos localidades encontraron valores cercanos a 0,287 mg/g a 0,556 mg/g de fruta fresca para Tlamimilolpa, Hgo. Y de 0,088 mg/g a 0,53 mg/g de fruta fresca para San Mateo Acatitlán, México. Asimismo, Antonnen y Karjalinen (2005) mencionan que el contenido de antocianinas totales en frambuesa es influenciado por el ambiente de producción y la variedad; los valores de esta variable se hallan entre 0,19 y 0,51 mg/g de fruta fresca valores inferiores a los encontrados en la presente investigación los cuales se encontraron entre 0,516 mg/g a 0,939 mg/ g de fruta fresca.

Tabla 5. Anova para la extracción de antocianinas.

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	FT		P
					0,05	0,01	
Tratamientos	5	0,35	0,07	4,30	3,26	5,06	
Temperatura	2	0,30	0,15	9,23	3,88	6,93	0,004
Tiempo	1	0,00	0,00	0,01	7,75	9,33	0,916
Temperatura * Tiempo	2	0,05	0,02	1,51	3,88	6,93	0,260
Error	12	0,20	0,02				
Total	17	0,55					

GL = grados de libertad, SC = suma de cuadrados, CM = cuadrado medio, F = valor de F, P= probabilidad

El análisis de varianza para el factor temperatura, tabla 5, muestra que hay diferencias significativas entre las temperaturas de 35, 60, 80 °C en la extracción de antocianinas en frutos de frambuesa con $p < 0,05$ (tabla 4; Fig. 4).

Tabla 6. Agrupación de información método de Tukey, nivel de confianza de 95 %

Temperatura	N	Media	Agrupación
80	6	0,880	A
60	6	0,839	A
35	6	0,586	B

En este sentido en la prueba de Tukey al factor temperatura se observa que las temperaturas 80 y 60°C son igual de significativas y mostraron mayor diferencia significativa con respecto a la temperatura de 35 °C (tabla 6), concluyendo que las mejores extracciones se da a las temperaturas de 80 °C y 60 °C, donde se obtuvieron 0,939 mg/g fruto y 0,839 mg/g fruto respectivamente, mientras que la temperatura más desfavorable fue la de 35 °C.

En la tabla 5 según el análisis de varianza del factor tiempo se observa que no hay diferencias significativas entre los tiempos de 30 y 60 min aplicados en la extracción de antocianinas en frambuesa. Se puede indicar que el mejor tiempo de extracción a las diferentes temperaturas es 60 minutos, sin embargo al momento de realizar la extracción se observó que en frutos de frambuesa que presentaban colores rojos menos intensos, la extracción de antocianina era menor incluso al aplicar un mayor tiempo y temperatura en la extracción, esto

en el caso de tratamiento de 80 °C y 60 minutos donde los frutos usados en la extracción presentaron colores rojos más tueses, los resultados obtenidos fueron 0,821 mg/g fruto mientras que para el tratamiento 80 °C y 30 minutos los frutos usados tenían colores rojos más intensos obteniendo resultados más altos 0,939 mg/g fruto, en este sentido Peña *et al* (2006)., determino que el color rojo de la frambuesa se debe a las antocianinas, que son principalmente derivados glicosilados de cianidina y pelargonidina. La intensidad del color depende de la concentración de estos compuestos. En los frutos inmaduros, de coloraciones rojas tenues, se tiene un menor contenido de antocianinas que en los frutos maduros

Salinas et al. (2009). En un trabajo relacionado con la determinación del perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus L*) variedad "Autumn Bliss" con diferente grado de maduración y provenientes de dos localidades se determinó que en los frutos inmaduros se presentaron únicamente cuatro antocianinas, y en los completamente maduros se tuvieron ocho. De estas, las antocianinas con los mayores porcentajes relativos fueron: cianidina-3-soforósido (46,2 %) y cianidina-3-(2-glucosilrutinosido) (25,9 %).

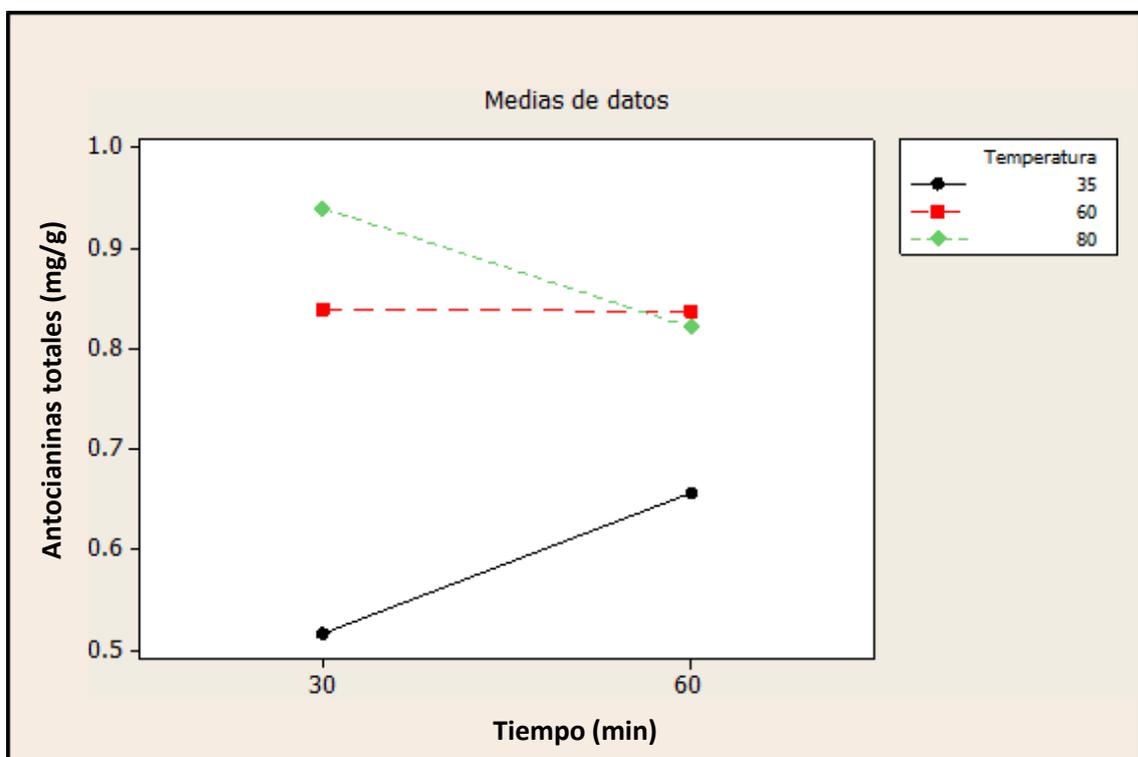


Figura 3. Interacción para antocianinas totales

El análisis de varianza para la interacción de los dos factores tiempo*temperatura no muestra diferencias significativas tabla 4. En la figura 3 se observa que a una temperatura de 35 °C la mejor extracción se logra a 60 minutos, a 60 °C no existe diferencia entre los tiempos, mientras que a 80 °C se obtuvo una mayor extracción a un tiempo de 30 minutos.

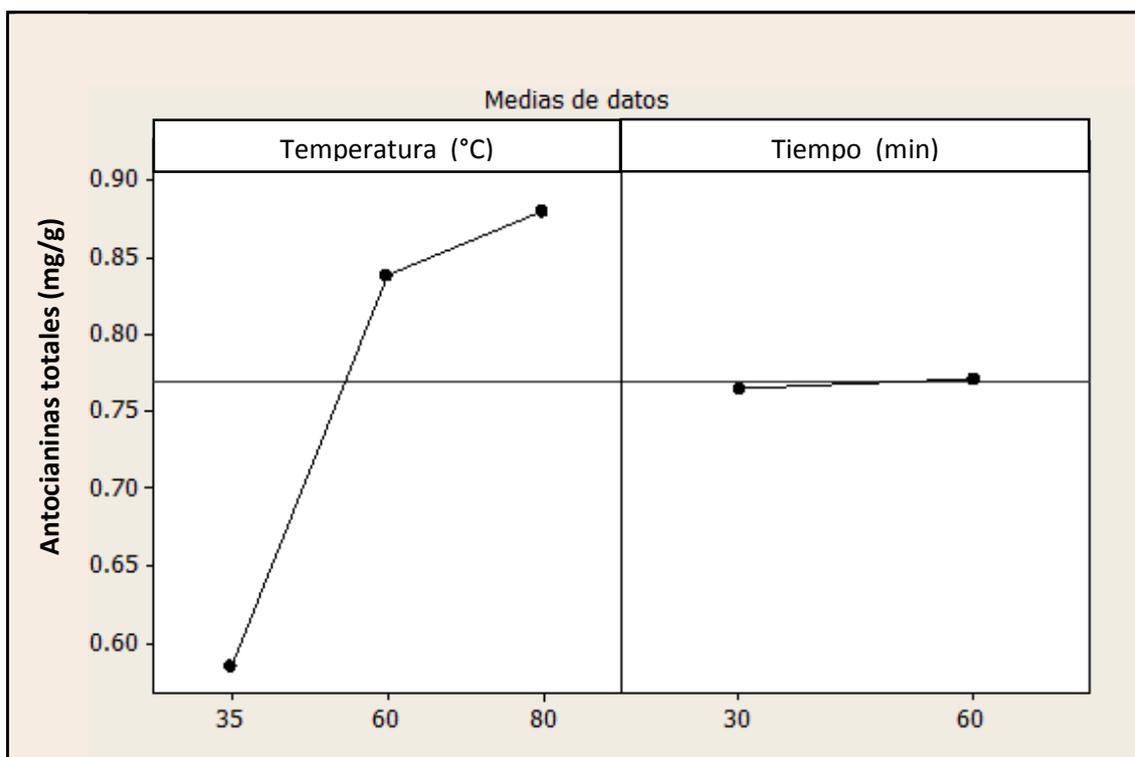


Figura 4. Efectos principales para antocianinas totales

En la figura 4, se observa que la eficacia de la extracción aumentó con el incremento de la temperatura, los valores más altos se obtuvieron a la temperatura de 80 °C, mientras que para el tiempo de extracción, las antocianinas extraídas a 30 y 60 min son estadísticamente similares.

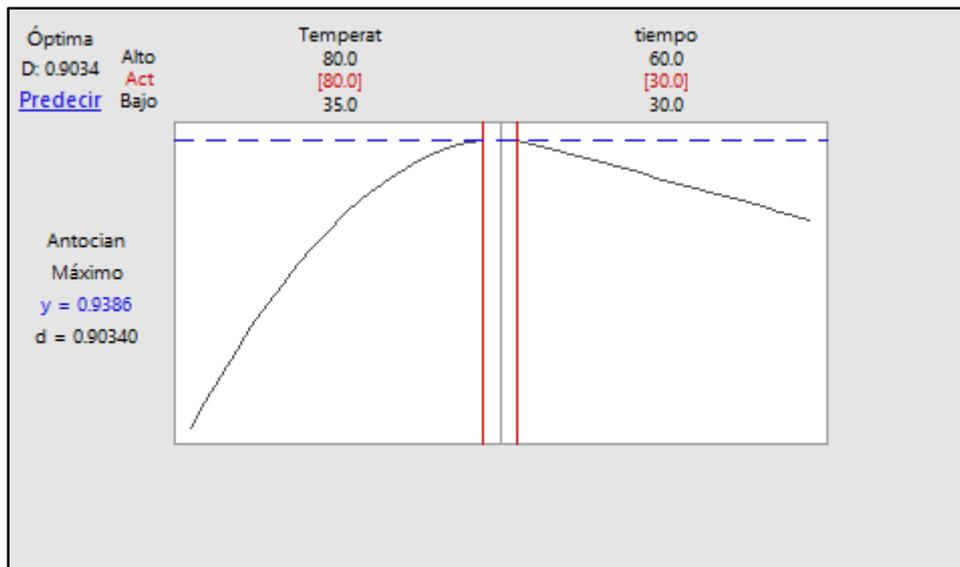


Figura 5. Optimización para obtener la máxima cantidad de antocianinas.

En la figura 5 se observa que para obtener la máxima cantidad de antocianinas las mejores condiciones de extracción se realizan a la temperatura de 80 °C y el tiempo de 30 min.

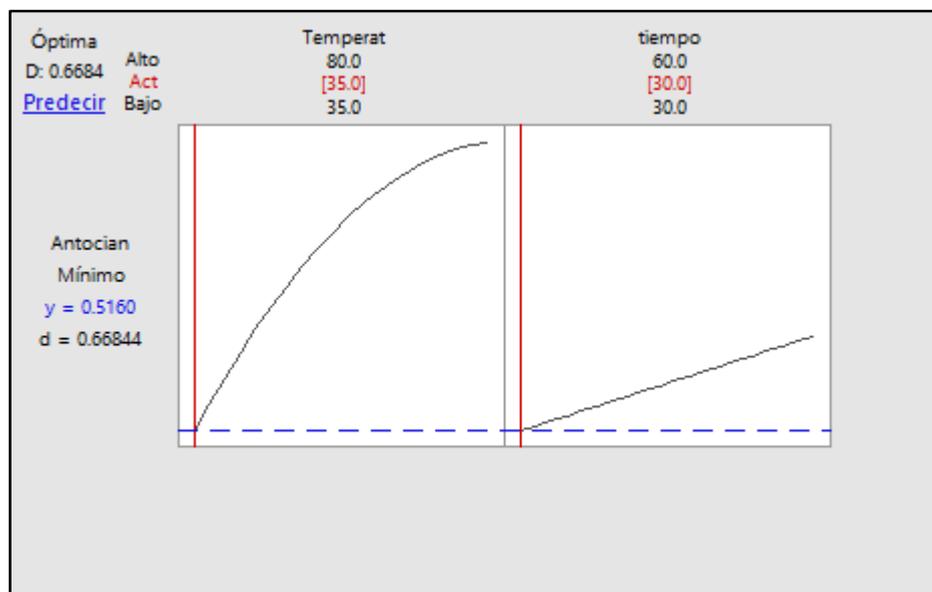


Figura 6. Optimización para obtener la máxima cantidad de antocianinas.

Mientras que las condiciones de extracción con bajos contenidos de antocianinas corresponden a la temperatura de 35 °C y tiempo de 30 minutos figura 6.

En este sentido, Gorriti-Gutiérrez *et al.* (2009) estudiaron las mejores condiciones de extracción de antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Las extracciones se realizaron en soluciones metabólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo ambos en 4 niveles. Los resultados obtenidos indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75 °C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25 °C y 30 minutos.

Por otro lado, en la optimización de las condiciones de extracción de antocianinas de batata morada, Fan *et al.* (2008) lograron la mejor extracción a 80 °C; y en cuanto al factor tiempo de extracción, Fan *et al.* (2008) encontraron que la extracción de antocianinas de batata morada tuvo lugar con 60 min de extracción, valores muy similares a los obtenidos en la presente investigación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- La mayor concentración de antocianinas totales se obtuvo a la temperatura de 80 °C empleando un tiempo de extracción de 30 minutos (0,939 mg/g de fruta fresca), mientras que a 60 °C fue de 0,839 mg/g de fruta fresca y a 35 °C la concentración fue de 0,516 mg/g de fruta fresca empleando el mismo tiempo de extracción.
- La concentración de antocianinas totales que se obtuvo a la temperatura de 80 °C empleando un tiempo de extracción de 60 minutos fue de 0,821 mg/g de fruta fresca fue mayor que las obtenidas a 60 °C (0,838 mg/g de fruta fresca) y a 35 °C (0,655 mg/g de fruta fresca) empleando el mismo tiempo de extracción.
- La temperatura de 80 °C y el tiempo de 30 minutos son las mejores condiciones de extracción de antocianinas totales de los frutos de frambuesa empleando una disolución de metanol al 20 %.
- El factor temperatura ejerce una influencia significativa en la extracción de antocianinas totales de los frutos de frambuesa no así el factor tiempo de extracción.

Recomendaciones

- En futuros trabajos de investigación se recomienda determinar el índice de madurez de los frutos de frambuesa
- Utilizar otro tipo de solventes como etanol, acetona a concentraciones mayores y menores a las usadas en la presente investigación.
- Para obtención de extractos de antocianinas de uso alimentario o farmacéutico se recomienda utilizar agua o etanol como solvente.

LITERATURA CITADA

Aguilera, M. et al 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud 8(2):17-22

AREX (Asociación regional de exportadores de Lambayeque). Arándano deshidratado (en línea). Lambayeque, PE. Consultado 10 abril 2016. Disponible en http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil_comercial/PERFIL%20COMERCIAL%20ARANDANOS.pdf

AREX (Asociación regional de exportadores de Lambayeque). Perfil comercial frambuesa (en línea). Lambayeque, PE. Consultado 10 May 2016. Disponible en <http://www.sierraexportadora.gob.pe/perfil-comercial-de-la-frambuesa-deshidratada/>

Arilmí, G. et al 2009. Extracción de antocianinas de las corontas de *zea mays* “maíz morado”. Revista ciencia e investigación 12(2): 64-74

El cerrión. ES. Frambuesa (en línea). Consultado 19 ene 2017. Disponible en http://www.arandanoselcierron.com/frambuesa-variedad-fruto-del-bosque/arandanos-el-cierron/frambuesa_4_1_ap.html

Eroski Consumer, ES. Frambuesa: Propiedades (en línea). Consultado 10 may 2016. Disponible en <http://frutas.consumer.es/frambuesa/propiedades>

Garzón, GA.2008. Las antocianinas como colorantes naturales y Compuestos bioactivos: revisión. Acta biológica colombiana. 13(3): 27- 36.

Gorriti, A. et al. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de las corontas del maíz morado (*Zea mays* L.): Método de extracción. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 8 (6): 509 – 518.

IBO (International Blueberry Organization). 2014. Perú: Cajamarca to plant 600 acres of raspberries and blueberries (En línea) EU. Consultado 11 abril 2016. Disponible en <http://www.internationalblueberry.org/2014/10/28/peru-cajamarca-to-plant-600-acres-of-raspberries-and-blueberries/>

Leyva DE. 2009. Determinación de antocianinas, fenoles y actividad antioxidante en licores y jugo de uva. Titulación. Oaxaca. MX. Universidad Tecnológica De La Mixteca. 80p

MAPAMA (Ministerio De Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente) Frambuesa, (En línea). Madrid, ES. Consultado 10 may 2016. Disponible en http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/frambuesa_tcm7-315363.pdf

Matta, V. PE. 2016. Crece cultivo de frambuesa en el Perú (en línea). Consultado 08 noviembre 2016. Disponible en <http://www.beta.com.pe/blog/crece-cultivo-de-frambuesas-en-el-peru/>

ODEPA (Oficina De Estudios Y Políticas Agrarias) 2013. Estudio sobre nuevos procesos industriales que permiten ampliar las alternativas de uso para los berries en chile (en línea) CL. Consultado 22 may 2016. Disponible en <http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Estudio-berries-terminado2.pdf>.

Pascual-Teresa S, *et al* 2010. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences* 11(4): 1679–1703.

Peña, G. *et al* 2006. Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12 (1):159–163.

Rojas, N.PE.2016. El cultivo del arándano en Perú (En línea). Lima, PE. Consultado 11 abril 2016. Disponible en <http://agronegociosperu.org/el-cultivo-del-arandano-en-peru/>

Salinas, Y. *et al* 2009, Ácido elálgico y perfil de antocianinas en frutos de frambuesa (*Rubus idaeus* L.) con diferente grado de maduración. Revista Chapingo. Serie horticultura 15 (1):97-101

The First Fruit, CO. Frambuesa (en línea). Consultado 19 ene 2017. Disponible en http://thefirstfruitsas.com/product_type/variable/

Zapata, LM. 2014. Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria. Doctorado. Concordia. AR. Universidad Politécnica De Valencia. 204p.

Zapata, LM *et al*. 2014. Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. Revista ciencia docencia y tecnología. 25(49):166-192.

ANEXOS

Anexo 1

Metodología del análisis estadístico

Diseño factorial con dos factores

Considere los factores A y B con a y b ($a, b \geq 2$) niveles de prueba, respectivamente. Con ellos se puede construir el diseño factorial a x b que consiste en a x b tratamientos. Se llama *réplica* a cada repetición completa del arreglo factorial. Los diseños factoriales que involucran menos de 4 factores se corren replicados para poder tener la potencia necesaria en las pruebas estadísticas sobre los efectos de interés, de tal forma que si se hacen n réplicas, el número total de corridas experimentales es $n(a \times b)$.

Modelo estadístico:

Con un diseño factorial a x b se pueden estudiar los efectos individuales y el efecto de interacción de ambos factores. En términos estadísticos lo que se afirma es que el comportamiento de la variable respuesta Y en el experimento con k réplicas se podrá escribir mediante:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2, \dots, a \quad j = 1, 2, \dots, b \quad k = 1, 2, \dots, n$$

Donde μ es la media general, α_i es el efecto del i-ésimo nivel del factor A, β_j es el efecto del j-ésimo nivel del factor B, $(\alpha\beta)_{ij}$ representa el efecto de interacción en la combinación ij y ε_{ijk} es el error aleatorio que supone sigue una distribución con media cero y varianza constante σ^2 y son independientes entre sí. Para que la estimación de los parámetros en este modelo sea única, se introducen las restricciones:

$$\sum_{i=1}^a \alpha_i = \sum_{j=1}^b \beta_j = 0 \quad \text{y} \quad \sum_{i=1}^a (\alpha\beta)_{ij} = \sum_{j=1}^b (\alpha\beta)_{ij} = 0$$

Es decir, los efectos dados en el modelo son desviaciones respecto de la media global.

El ANOVA para un diseño factorial 3 x 2 con 3 réplicas resulta de descomponer la variación total como:

$$SST=SS_A+SS_B+SS_{AB}+SS_E$$

Y la tabla de ANOVA está dada por:

<i>Fuente de Variación</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>Estadístico F</i>
<i>Efecto A</i>	SSA	<i>a-1</i>	<i>CMA=SSA/(a-1)</i>	<i>CMA/CME</i>
<i>Efecto B</i>	SSB	<i>b-1</i>	<i>CMB=SSB/(b-1)</i>	<i>CMB/CME</i>
<i>Efecto AB</i>	SSAB	<i>(a-1)(b-1)</i>	<i>CMAB=SSAB/((a-1)(b-1))</i>	<i>CMAB/CME</i>
<i>Error</i>	SSE	<i>ab(n-1)</i>	<i>CME=SSE/(ab(n-1))</i>	
<i>Total</i>	SST	<i>abn-1</i>		

A. Factores de estudio

- Factor A: Temperatura de extracción con tres niveles (35, 60, 80 °C)
- Factor B: Tiempo de extracción con 2 niveles (3,60 minutos)

B. Variable de respuesta

- Contenido de antocianinas en el fruto de frambuesa (mg/g)

Tabla matriz del diseño experimental.

N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Antocianinas totales (mg/g)
1	35	30	0,516 ± 0,231
2	35	60	0,655 ± 0,121
3	60	30	0,839 ± 0,116
4	60	60	0,838 ± 0,056
5	80	30	0,939 ± 0,086
6	80	60	0,821 ± 0,082

T: tratamiento, solución de extracción: 20 % metanol, valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Modelo estadístico para el diseño 3 x 2 con tres repeticiones

Hipótesis a evaluar y análisis de varianza

Se estableció las siguientes hipótesis para los tres efectos sobre la extracción de antocianinas presentes en el fruto de frambuesa: Temperatura de extracción (T°), tiempo de extracción (t) y la interacción de temperatura y tiempo de extracción

Para el factor A (temperatura)

H₀: influencia de la T° extracción = 0 La temperatura de extracción no influye en la concentración de antocianinas totales

H₁: influencia de la T° extracción ≠ 0 La temperatura de extracción influye significativamente en la concentración de antocianinas totales

Para el factor B (Tiempo)

H₀: influencia del t de extracción = 0. El tiempo de extracción no influye en la concentración de antocianinas totales

H₁: influencia del t de extracción ≠ 0. El tiempo de extracción influye significativamente en la concentración de antocianinas totales

Para la interacción AB: (Temperatura * tiempo)

H₀: influencia de la T° x t de extracción = 0 La interacción de la temperatura x el tiempo de extracción no influye en la concentración de antocianinas totales

H₁: influencia de la T° x t de extracción ≠ 0 La interacción de la temperatura x el tiempo de extracción influye significativamente en la concentración de antocianinas totales

Anova de la extracción de antocianinas en los factores e interacciones del modelo experimental

Fuentes de variación	GL	SC	CM	F calculado	FT		P
					0,05	0,01	
Tratamientos	5	0,35	0,07	4,30	3,26	5,06	
Temperatura	2	0,30	0,15	9,23	3,88	6,93	0,004
Tiempo	1	0,00	0,00	0,01	7,75	9,33	0,916
Temperatura x Tiempo	2	0,05	0,02	1,51	3,88	6,93	0,260
Error	12	0,20	0,02				
Total	17	0,55					

GL = grados de libertad, SC = suma de cuadrados, CM = cuadrado medio, F = valor de F, P = probabilidad

Anexo 2

Masa y grados brix de cada muestra usada en la extracción de antocianinas

N°	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Masa (g)	Brix (°Bx)
1	35	30	5,043 3	13
2	35	30	5,019 6	13
3	35	30	5,066 0	13
4	35	60	5,108 0	13
5	35	60	5,078 6	10
6	35	60	5,089 8	11,5
7	60	30	5,071 8	13
8	60	30	5,018 5	13
9	60	30	5,001 9	12
10	60	60	5,020 4	13
11	60	60	5,070 7	10
12	60	60	5,013 7	11
13	85	30	5,015 6	11
14	85	30	5,085 2	10
15	85	30	5,016 2	11,5
16	85	60	5,008 7	10,25
17	85	60	5,027 0	10
18	85	60	5,016 2	10,25

pH de frambuesa fresca recién recolectada: 2,95

Anexo 3

Medida de absorbancia, cambio de absorbancia y cantidad de antocianinas totales en cada tratamiento

T	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	KCl		CH ₃ -COONa		<i>A_{neta}</i>	Antocianinas totales (mg/L)	Antocianinas totales (mg/g)
			<i>A₅₁₀</i>	<i>A₇₀₀</i>	<i>A₅₁₀</i>	<i>A₇₀₀</i>			
1	35	30	0,145 ± 0,063	0,016 ± 0,006	0,013 ± 0,002	0,008 ± 0,004	0,124 ± 0,055	51,627 ± 23,114	0,516 ± 0,231
2	35	60	0,188 ± 0,025	0,019 ± 0,002	0,019 ± 0,004	0,007 ± 0,004	0,157 ± 0,029	65,543 ± 12,150	0,655 ± 0,121
3	60	30	0,239 ± 0,035	0,025 ± 0,003	0,030 ± 0,005	0,017 ± 0,003	0,201 ± 0,028	83,912 ± 11,577	0,839 ± 0,116
4	60	60	0,232 ± 0,008	0,021 ± 0,001	0,024 ± 0,005	0,014 ± 0,005	0,201 ± 0,013	83,773 ± 5,606	0,838 ± 0,056
5	80	30	0,263 ± 0,022	0,020 ± 0,000	0,030 ± 0,001	0,013 ± 0,002	0,225 ± 0,021	93,931 ± 8,627	0,939 ± 0,086
6	80	60	0,226 ± 0,022	0,021 ± 0,001	0,021 ± 0,001	0,013 ± 0,003	0,197 ± 0,020	82,103 ± 8,237	0,821 ± 0,082

T: tratamiento, solución de extracción: 20 % metanol, valores promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar

Anexo 4



Figura 1. Recolección de frutos de frambuesa junto al ing. Elías Huaripata director de la Agencia Agraria - San Marcos



Figura 2. Recolección de frutos de frambuesa en la Agencia Agraria - San Marcos



Figura 3. Frutos de frambuesa recién recolectados



Figura 4. Arbusto de frambuesa



Figura 5. Extracción por destilación a reflujo



Figura 6. Filtración al vacío



Figura 7. Extracto de antocianinas de frambuesa



Figura 8. Extracto de antocianinas y diluciones de extractos de antocianinas en los buffers



Figura 9. Dilución de extracto de antocianinas en KCl 0,025 M pH 1



Figura 10. Dilución de extracto de antocianinas en $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ 0,4 M pH 4,5



Figura 11. Armando equipo de concentración



Figura 12. Medición del volumen del extracto de antocianinas



Figura 13. Preparación de la disolución



Figura 14. Medición en el espectrofotómetro

GLOSARIO

A

Acido elágico

El ácido elágico es un polifenol que protege a muchas plantas contra la luz ultravioleta, virus, bacterias y parásitos. · 6, 13, 14, 15, 17

Antioxidante

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. · 6, 7, 9, 14, 15, 17, 24, 26, 35, 37

C

Colorantes sintéticos

Los Colorantes Sintéticos son colorantes orgánicos obtenidos por síntesis química. · 7, 9, 10

Compuestos fenólicos

Los fenoles o compuestos fenólicos son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional · 6, 8, 13

Cromatografía líquida

La cromatografía líquida, también conocida como cromatografía de líquidos, es una técnica de separación y no debe confundirse con una técnica cuantitativa o cualitativa de análisis. Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizadas, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la adsorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. · 18, 20

E

Elagitaninos

Los elagitaninos son una clase diversa de taninos hidrolizables, un tipo de polifenol formado principalmente de la unión oxidativa de grupos galoyl en glucosa 1,2,3,4,6-pentagalloyl. · 6, 13

F

Flavonoides

Flavonoide (del latín flavus, "amarillo") es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas · 6, 13, 14, 15, 20

G

Glucósidos

Los glucósidos son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. Los glucósidos desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos. · 6, 7, 20

Grupos acilos

En química orgánica, un grupo acilo es un grupo derivado de un oxoácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo. · 7

H

Hidroxilación

La hidroxilación es una reacción química en la que se introduce un grupo hidroxilo (OH) en un compuesto reemplazando un átomo de hidrógeno, oxidando al compuesto. · 21

P

Pigmentos

es un material que cambia el color de la luz que refleja o transmite como resultado de la absorción selectiva de la luz según su longitud de onda · 7, 8, 10, 15, 17, 23, 26

Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. · 6, 8, 13