

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN  
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE CÁSCARA  
DEL FRUTO DE CAPULÍ (*Prunus serotina* spp)  
UTILIZANDO DOS SOLVENTES A DIFERENTES  
TEMPERATURAS Y TIEMPOS**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. Zoila Cecilia, ROJAS RAMÍREZ**

**Asesor: MCs. Ing. David Ricardo, URIOL VALVERDE**

**CAJAMARCA - PERÚ**

**2017**

*Quiero dedicar el esfuerzo invertido en este trabajo:*

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

*A mi madre Rosabel,  
por su amor incondicional y por hacer que este largo camino sea más fácil.*

*A mi hijo Cristopher,  
por ser tan dulce, amoroso, vital y puro.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Al reflexionar y desandar el camino recorrido para la realización de esta tesis reconozco que el mérito de este trabajo no sólo me corresponde a mí, sino que es el fruto del esfuerzo y de la colaboración de muchas personas. Es por ello que en este momento quiero, desde lo más profundo de mi corazón, expresar mi agradecimiento:*

*Al Ing. David Ricardo Uriol Valverde, por su dedicación y por haberme enseñado tanto, apoyándome en lo que respecta a la elaboración de pruebas respectivas.*

*A mis compañeras y amigas de laboratorio, Emérita y Zulema que me acompañaron en el trabajo diario y pusieron su granito de arena.*

*A la comunidad de la institución a la que pertenezco, la Facultad de Ciencias Agrarias, a quienes en diferentes situaciones, inherentes a este trabajo, colaboraron conmigo generosamente.*

*A mi familia, a mi esposo Jhonatan que me acompañó cada minuto, a mi hijo y razón de ser en esta vida, que con solo mirarlos me llenaron de felicidad y me animaron a seguir; a mi hermana y a mi madre que me enseñó el valor del esfuerzo.*

*A Dios por las personas que puso en mi camino y por haberme dado tanto.*

*A todos ¡muchas gracias!*

## RESUMEN

Las antocianinas son flavonoides responsables del color de la cáscara del fruto de capulí. Estos compuestos son interesantes por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, ya que se pueden utilizar como colorantes alimentarios naturales. Además, debido a su elevada actividad antioxidante, presentan potenciales beneficios para la salud.

Como principal objetivo del presente trabajo de investigación se planteó determinar el contenido de antocianinas de la cáscara del fruto de capulí (*Prunus Serotina* spp) fresco, para lo cual se utilizó agua y etanol al 20 % como solventes, temperaturas de 50 y 70 °C y tiempos de extracción de 15 y 30 minutos, aplicando 24 tratamientos, y obteniendo así 24 resultados. Para determinar el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí se usó el método del pH diferencial. Se determinó que para el solvente agua el valor más alto corresponde a 70 °C y 30 minutos obteniéndose 1,7 mg/g de media, una desviación estándar de 0,04 mg/g y 2,10 % de coeficiente de variación, indicando homogeneidad en sus resultados, y para el solvente etanol al 20 % el valor más alto corresponde a 70 °C y 30 minutos obteniéndose 2,285 mg/g de media, una desviación estándar de 0,35 mg/g y 15,40 % de coeficiente de variación, indicando heterogeneidad en sus resultados. La fórmula óptima se aprecia para etanol 20 %, temperatura 70 °C y tiempo de 30 minutos. Donde el contenido promedio de antocianina se encuentra entre 2,11 y 2,46 mg/g, con una confianza del 95 %, con un promedio de 2,285 mg/g. A partir de los resultados obtenidos en la presente Tesis, se considera que podría ser viable tecnológicamente el desarrollo de alimentos funcionales frescos mediante la incorporación de extracto de antocianina procedente de la cáscara del fruto de capulí. De esta manera se conseguiría dar una mejor alternativa para reemplazar los colorantes artificiales que son usados hoy en día.

## ABSTRACT

Anthocyanins are flavonoids responsible for the color of the peel of the capulí fruit. These compounds are interesting for their impact on the sensory characteristics of food, since they can be used as natural food colors. In addition, due to their high antioxidant activity, they present potential health benefits.

The main objective of this research work was to determine the content of anthocyanins in the fruit husk of fresh capulí (*Prunus Serotina* spp), for which 20 % water and ethanol were used as solvents, temperatures of 50 and 70 °C and extraction times of 15 and 30 minutes, applying 24 treatments, and obtaining 24 results. To determine the content of anthocyanins in the shell of the capulí fruit, the differential pH method was used. It was determined that for the water solvent the highest value corresponds to 70 °C and 30 minutes obtaining 1.7 mg/g on average, a standard deviation of 0,04 mg / g and 2,10 % coefficient of variation, indicating homogeneity in its results, and for the ethanol for 20 % solvent, the highest value corresponds to 70 °C and 30 minutes, obtaining an average of 2,285 mg/g, a standard deviation of 0,35 mg/g and 15,40 % variation coefficient, indicating heterogeneity in their results. The optimal formula is appreciated for 20 % ethanol, temperature 70 °C and time of 30 minutes. Where the average content of anthocyanin is between 2,11 and 2,46 mg/g, with a confidence of 95 %, with an average of 2,285 mg/g. Based on the results obtained in this thesis, it is considered that the development of fresh functional foods could be technologically feasible through the incorporation of anthocyanin extract from the shell of the capulí fruit. In this way it would be possible to give a better alternative to replace the artificial colors that are used today.

## ÍNDICE

	Pág.
<b>CAPÍTULO I</b>	
INTRODUCCIÓN.....	11
OBJETIVOS .....	13
• Objetivo general	
• Objetivos específicos	
<b>CAPÍTULO II</b>	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1. El capulí .....	14
2.1.1. Taxonomía .....	14
2.1.2. El fruto.....	15
2.1.3. Índice de madurez .....	16
2.1.4. Variedades .....	17
2.1.5. Valor nutricional.....	18
2.1.6. Hábitat .....	19
2.1.7. Vegetación / Zona de vegetación .....	19
2.1.8. Fenología .....	19
2.1.9. Aspectos fisiológicos .....	20
2.1.10. Cultivo .....	20
2.1.11. Tolerancias.....	20
2.1.12. Desventajas.....	21
2.1.13. Usos .....	21
2.2. Las antocianinas .....	22
2.2.1. Estructura química .....	23
2.2.2. Extracción y concentración de antocianinas.....	24
2.2.3. Factores que afectan su estabilidad .....	26
• pH	
• Temperatura	
• Agua	
• Copigmentación	
• Oxígeno	
• Luz	

2.2.4. Propiedades colorantes y antioxidantes de las antocianinas .....	30
2.2.5. Las antocianinas como colorantes naturales .....	33
2.2.6. Biosíntesis de las antocianinas .....	34
2.2.7. Actividad biológica de las antocianinas .....	35

### **CAPÍTULO III**

MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
3.1. Ubicación geográfica del trabajo de investigación .....	37
3.2. Materiales .....	37
3.2.1. Material biológico .....	37
3.2.2. Material y equipos de laboratorio .....	38
a) Equipos	
b) Material	
c) Reactivos	
d) Otros	
3.3. Metodología .....	39
3.3.1. Trabajo de campo .....	39
3.3.2. Trabajo de laboratorio .....	39
3.4. Trabajo de gabinete .....	42

### **CAPÍTULO IV**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
4.1. Serie de experiencias de extracción de antocianinas .....	43
4.2. Prueba de normalidad .....	51
4.3. Hipótesis del diseño de experimento con tres factores a dos niveles cada factor con interacción .....	51
• Solvente	
• Temperatura	
• Tiempo	
• Interacción solvente - temperatura	
• Interacción solvente - tiempo	
• Interacción temperatura - tiempo	
• Interacción solvente - temperatura - tiempo	

## CAPÍTULO V

5.1. Conclusiones .....	57
5.2. Recomendaciones .....	57
5.3. Bibliografía.....	58
ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de capulí en Cajamarca, Perú.....	15
<b>Figura 2.</b> Frutos del capulí.....	15
<b>Figura 3.</b> Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas.....	23
<b>Figura 4.</b> Formación de complejo a través de interacción intermolecular .....	28
<b>Figura 5.</b> Fruto de capulí .....	37
<b>Figura 6.</b> Diagrama de flujo de obtención de extracto de antocianina .....	40
<b>Figura 7.</b> Frutos de capachu, huancachu, cheqche y alaybilí .....	48
<b>Figura 8.</b> Gráfica de probabilidad de antocianinas mg/g normal.....	51
<b>Figura 9.</b> Contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí en mg/g; para diferentes solventes, temperaturas y tiempos.....	55
<b>Figura 10.</b> Validación del modelo .....	56
<b>Figura 11.</b> Materia prima .....	67
<b>Figura 12.</b> Extracción de antocianinas .....	67
<b>Figura 13.</b> Concentración de antocianinas .....	68



<b>Figura 14.</b> Preparación de las disoluciones.....	69
<b>Figura 15.</b> Lectura de la absorbancia – Espectrofotómetro .....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición del fruto de capulí.....	19
<b>Tabla 2.</b> Contenido de antocianinas utilizando dos solventes, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.....	44
<b>Tabla 3.</b> Contenido de antocianinas con solvente agua, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.....	45
<b>Tabla 4.</b> Contenido de antocianinas con solvente etanol al 20 %, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.....	47
<b>Tabla 5.</b> Contenido de antocianinas en el fruto de capachu.....	49
<b>Tabla 6.</b> Contenido de antocianinas en el fruto de huancachu.....	49
<b>Tabla 7.</b> Contenido de antocianinas en el fruto de cheqche.....	49
<b>Tabla 8.</b> Contenido de antocianinas en el fruto de alaybilí .....	50
<b>Tabla 9.</b> ANOVA para el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí .....	51
<b>Tabla 10.</b> Resultados del ANOVA para el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí.....	52
<b>Tabla 11.</b> Composición por parejas según Tukey para la concentración de antocianinas totales en mg/g.....	56

## LISTADO DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Recepción de la materia prima, etapas para la extracción de antocianinas.....	67
<b>Anexo 2.</b> Proceso de concentración de antocianinas .....	68
<b>Anexo 3.</b> Preparación de las soluciones.....	69
<b>Anexo 4.</b> Análisis de contenido de antocianinas, lectura de la absorbancia - Espectrofotómetro .....	70

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

En la actualidad en nuestro país existe una creciente demanda en el uso de colorantes de origen natural, remplazando a los colorantes artificiales, utilizados en la industria procesadora de alimentos; productos como el capulí, sauco, maíz morado, camote, manzana, fresa, cebolla morada, 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 estos colorantes se encuentran las antocianinas que están en el reino vegetal y están presentes en raíces, tallos, hojas, flores y frutos de las plantas superiores. El capulí (*Prunus Serotina* spp), es una variedad pigmentada de color morado, constituido en un 81 % en pulpa y 9 % en cáscara, este fruto de capulí contiene el pigmento denominado antocianina en la cáscara (Blok *et al.* 1992).

El interés por los pigmentos antocianos en investigaciones científicas se han incrementado en los últimos años, debido no sólo al color que confieren a los productos que las contienen sino a su probable papel 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. Por tanto, además de su papel funcional, las antocianinas como pigmentos naturales se constituyen en agentes potenciales en la obtención de productos con valor agregado para el consumo humano (Luthria *et al.* 2012; Garzón *et al.* 2008).

Es de vital importancia obtener información cuantitativa y cualitativa de las antocianinas presentes en el material vegetal. Los investigadores han empleado métodos como el de pH diferencial y de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de antocianinas en una muestra (Goupy *et al.* 2013; Lee *et al.* 2008). La técnica de cuantificación por HPLC usando el método de estándar externo con base en la respuesta de compuestos patrones; se convierte en una herramienta de alta selectividad y versatilidad. Por otro lado, el método de pH diferencial, basado en las transformaciones reversibles que sufren las antocianinas con los cambios de pH, es un método sencillo y económico para cuantificar las antocianinas monoméricas de una muestra (Lee *et al.* 2008).

Las antocianinas son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fennema *et al.* 1993). En los que respecta a su composición química, 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  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio también llamado 2-fenilbenzopirilio (Badui *et al.* 2006). Los factores de la misma cáscara de capulí como su estructura química, pH, temperatura, presencia de oxígeno y ácido ascórbico, concentración y actividad de agua de la matriz son las que determinan la estabilidad del pigmento (Wrolstad *et al.* 2000). Los pigmentos antocianos tienen baja estabilidad debido a la sensibilidad a los cambios de estos factores, los cuales se convierten en la principal limitación de estos pigmentos para ser aplicados como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales en alimentos (Castañeda *et al.* 2009; Olaya *et al.* 2009; Owusu *et al.* 2005; Poo *et al.* 2005).

La cuantificación de antocianinas en cáscara de capulí depende de la temperatura y el tiempo de extracción, siendo favorecidas por el medio etanólico al 20 % y pH entre 2 y 4, alcanzando valores de 16,534 mg de cianidina-3-glucósido/g muestra (Gorriti *et al.* 2009). En este contexto se propone la siguiente tesis, con la cual se pretende contribuir en la tecnología de extracción de antocianinas a partir de cáscara del fruto de capulí, utilizando el método de pH diferencial (Giusti y Wrolstad *et al.* 2001).

## **OBJETIVOS**

- **Objetivo General**

Determinar el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí, (*Prunus Serotina* spp), utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.

- **Objetivos Específicos**

- Determinar el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí utilizando agua como solvente a las temperaturas de 50 y 70 °C y tiempos de extracción de 15 y 30 minutos.
- Determinar el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí utilizando etanol al 20 % como solvente a las temperaturas de 50 y 70 °C y tiempos de extracción de 15 y 30 minutos.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. El capulí

##### 2.1.1. Taxonomía

El capulí cuyo nombre científico es *Prunus serotina* spp, pertenece a la familia de las Rosaceae; así como la ciruela, cereza, melocotón, almendro y muchas otras especies que se hallan distribuidas en diferentes regiones de América tropical. El árbol crece en forma silvestre, tiene de 5 a 15 m. Aunque la planta crece en varios países tropicales; ésta es relativamente abundante en la sierra de Perú. El árbol o arbusto del capulí presentan una copa ancha de forma ovoide que produce una sombra densa y hojas estipuladas, simples, alternas, cortamente pecioladas, ovadas a lanceoladas, de 5 a 16 cm de largo por 2 a 5 cm de ancho, margen aserrado; haz verde oscuro y brillante. Su tronco es largo y recto en el bosque, pero en los claros es corto y ancho, ramas alternas, erguido-extendidas, lampiñas, escabrosas por la presencia de muchas lenticelas esparcidas. Su Corteza es color café o grisácea casi lisa y glabra, exceptuando las ramas tiernas que a veces son pubescentes y su flor(es) son numerosas, pequeñas y blancas, agrupadas en racimos axilares colgantes y largos, de 10 a 15 cm, con pedicelos de 5 a 10 mm de largo, por último tiene un sistema radical de superficial y extendido a medianamente profundo y la mayoría de las raíces ocupan los primeros 60 cm del suelo. La raíz crece muy rápido y su sexualidad es Hermafrodita (Luna *et al.* 2013).

Cada variedad de capulí tiene características particulares y necesidades climáticas y edafológicas específicas. El capulí chaucha negro, cuya especie es la que se utilizó en la presente investigación, es nativo de la zona de Cajamarca. Esta especie representa el 45 % del total de cultivo cultivado a nivel mundial (Ibarra *et al.* 2009).



**Figura 1.** Árbol de capulí en Cajamarca, Perú (Luna *et al.* 2013).

### 2.1.2. El fruto

El fruto del capulí es una drupa globosa, de color negro rojizo en la madurez, de 12 a 20 mm de diámetro, sabor agridulce y algo astringente; conteniendo una sola semilla, la cual es esférica y rodeadas por un endocarpio o hueso leñoso (almendra) de sabor amargo (Ibarra *et al.* 2009).



**Figura 2.** Frutos del capulí (Ibarra *et al.* 2009).

### 2.1.3. Índice de madurez

La definición de madurez implica la necesidad de la aplicación de técnicas para medirla, y para ello se utilizan los índices de calidad. Estos índices son importantes para la regulación del comercio, la estrategia de comercialización y el uso eficiente de la mano de obra y recursos. Para determinar el índice de madurez se llevaran a cabo mediciones por los productores, manipuladores y el personal de control de calidad. La medida de estos índices debe ser sencilla, fácil de realizar durante la manipulación y con equipos relativamente baratos que den unos resultados objetivos y preferiblemente no destructivo (Crisosto *et al.* 1999).

La necesidad del estudio de los índices de madurez se realiza para asegurar una calidad mínima aceptable para el consumidor y una larga vida de almacenamiento. Numerosos investigadores han intentado establecer índices de calidad y métodos de medida que permitiesen objetivizar la determinación de la calidad en frutas y hortalizas, pero todavía no se han podido establecer criterios que permita interrelacionar los diferentes factores que integran la calidad sensorial (Romojaro *et al.* 1996).

Los principales parámetros que indican la madurez del melocotón son (Ferrer *et al.* 2001):

- Tamaño y forma
- Color
- Firmeza
- Contenido en sólidos solubles
- Acidez
  
- **Contenido en azúcares**
  - Refractómetro analógico de tipo catalejo, que es el más usual.
  - Refractómetro digital con pantalla de visualización de resultados.
  
- **Contenido en ácidos**
  - **Utensilios de valoración manual:** Bureta de laboratorio + vaso + reactivos; equipamiento muy barato, pero frágil.
  
  - **Valorador automático:** Bureta automática + electrodo + controlador + reactivo; equipo mas costoso pero automático y sólido.



- **Firmeza**

- **Durómetros:** Medidores de deformación (no destructivos) según el modelo; están basados en el desplazamiento de una pequeñísima bola o de un pequeño cilindro al ser presionados sobre el fruto. Funcionan muy bien con frutos de carne blanda.

- **Penetrómetro manual:** Consiste en un dinamómetro acoplado a un vástago que se introduce 8mm en la pulpa de la fruta después de quitar la piel. Es barato pero inexacto.

- **Color**

- **Colorímetro portátil:** Es un electro-óptico de coste relativamente bajo y de pequeño formato, que otorga una gran precisión a la medida del color y de espectro óptico.

- **Cartas de color:** Constituidas por múltiples tarjetas coloreadas, según las distintas tonalidades que pueden presentar el fruto a lo largo de su maduración. Son específicas de cada especie vegetal y de cada variedad comercial.

- **Aromas y olor**

- El olor es un parámetro de calidad que esta siendo estudiado en la actualidad. En la actualidad hay estudios sobre el cálculo del aroma mediante una nariz electrónica siendo este ensayo no destructivo.

#### **2.1.4. Variedades**

Las principales zonas productoras de capulí están en el Perú, en Cajamarca se tiene un 57 % de producción total en el año 2013, lugar en el que se a producido cerca de 20 326 toneladas, otros departamentos en los que no cuentan con una gran producción pero que tienen todas las condiciones climáticas y geográficas para realizar el cultivo son Huancayo y La Libertad con un 1,5 % al igual que Ancash, Junín y Ayacucho en los que la producción es mínima, este fruto del capulí también se encuentra en parte de Colombia y Ecuador, ya que su clima es el adecuado (MINAG, 2010).

El capulí es árbol de la familia de las rosáceas, originaria de Norteamérica del este de Quebec meridional y de Ontario del sur de Texas, ésta es una especie del subgénero Padus con las flores en racimos, y es un árbol de hoja caduca que crece 15-

30 m de alto. La parte más utilizada para alimentación es el fruto. Su fruto es redondo; con diámetro de 1 centímetro en promedio, de color verde que se torna morado al llegar a la madurez y puede pesar entre 4 y 6 g. Su color es variable, desde rosáceo a violáceo y negro rojizo. La pulpa suele ser de color verde amarillento. El sabor, debido a que se trata de una fruta es ligeramente dulce y a veces un poco ácido, por donde se acumulan gran cantidad de azúcares, es dulce (Ibarra *et al.* 2009).

Es buena fuente de proteínas cubre el 25 % de las recomendaciones para hombres y el 28 % para mujeres. De sus componentes destacan los contenidos en calcio y fósforo (Corbella *et al.* 1995).

La especie *Prunus Serotina spp* comprende diversas variedades, de las cuales la variedad chaucha es la más comercial según Ibarra *et al.* (2009), y éstas son las siguientes:

- **Chaucha rojo:** Drupa globosa, de color rojizo en la madurez, de 12 a 20 mm de diámetro, sabor agridulce y algo astringente; conteniendo una sola semilla, su semilla es esférica y rodeada por un endocarpio o hueso leñoso (almendra) de sabor amargo.
- **Chaucha negro:** Drupa globosa, de color negro rojizo intenso en la madurez, de 11 a 18 mm de diámetro, sabor agridulce; conteniendo una sola semilla de sabor amargo.
- **Pequeño:** De forma semi globosa, de color moreno rojizo, de 9 a 15 mm de diámetro, sabor agridulce; con una sola semilla esférica y un endocarpio de sabor amargo.
- **Coco o cuadrado:** De forma ovalada, de color rojo oscuro, de 10 a 19 mm de diámetro, sabor ligeramente dulce; conteniendo una sola semilla esférica y rodeadas por un hueso leñoso de sabor amargo.

#### 2.1.5. Valor nutricional

En la Tabla 1 se presenta la composición del fruto del capulí. Estas drupas tienen alto nivel de calorías y muy bajo contenido en grasa, mientras que poseen un alto contenido en hidratos de carbono y son ricas en minerales como calcio y fósforo, al igual que su riqueza en vitamina A y ácido ascórbico.

Además, son una fuente de antioxidantes naturales, tales como compuestos fenólicos y antocianinas (Nunes *et al.* 2008).

**Tabla 1.** Composición del fruto de capulí

<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad por 100 g</b>	<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad por 100 g</b>
Agua	77,2 g	Hierro (mg)	0,8 mg
Calorías	81 kcal	Fósforo (mg)	24 mg
Proteína	1,3 g	Vitamina A (mg)	45 mg
Grasa total	0,2 g	Riboflavina	0,04 mg
Hidratos de carbono	20,7 g	Tiamina	0,04 mg
Fibra	0,6 g	Niacina	1,1 mg
Calcio	24 mg	Ácido ascórbico	18 mg

**Fuente:** GAVILANES, Flor. Evaluación de siete tratamientos pre germinativos y seis sustratos para la germinación de la semilla de capulí. Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Ambato. Facultad Agronomía. Ambato. 1990. pp.5-10.

#### **2.1.6. Hábitat**

Se desarrolla sobre pendientes acentuadas y se le encuentra en zonas de cultivo (cafetal). Habita en muchos lugares templados y fríos del Perú. Suelos: pedregoso oscuro, somero, profundo con abundante materia orgánica y húmedo (Ibarra *et al.* 2009).

#### **2.1.7. Vegetación / Zona de vegetación**

##### **Tipos de vegetación.**

- Bosque de encino.
- Bosque de pino.
- Bosque de pino-encino.
- Bosque mesófilo de montaña (cerca de su límite superior).
- Pastizales (vegetación sabanoide).

**Zona(s) ecológica(s).** Templada subhúmeda (Ibarra *et al.* 2009).

#### **2.1.8. Fonología**

- **Follaje.** Perennifolio / Caducifolio. Pierde el follaje durante un lapso breve.
- **Floración.** Florece mayormente de enero a marzo.
- **Fructificación.** Fructifica entre mayo y agosto.

- **Polinización.** Entomófila (insectos) (Ibarra *et al.* 2009).

#### 2.1.9. Aspectos fisiológicos

- **Crecimiento.** Especie de moderado a rápido crecimiento. Las plántulas crecen de 5 a 10 cm en un mes. Bajo condiciones de sombra llegan a crecer 15 cm en 3 ó 4 años y mueren si no se les libera de la sombra. El árbol vive de 40 a 60 años.
- **Establecimiento.** Especie muy persistente. Bajo la sombra de especies primarias los árboles pueden persistir manteniendo una talla pequeña antes de verse liberadas de la sombra. Si llegan a morir, los tocones tienen la habilidad de producir rebrotes.
- **Producción de hojas, frutos, madera y/o semilla.** Empieza a producir a los 5 años de edad. La máxima producción de semillas se da después de los 30 años. Los árboles producen buena cosecha en intervalos de 1 a 5 años.
- **Regeneración.** Existen abundantes semillas almacenadas en el suelo ya que cada año se incorporan cientos de miles de semillas al banco (Ibarra *et al.* 2009).

#### 2.1.10. Cultivo

Tolera bien el corte o poda. Se le debe practicar poda de aclareo ya que produce numerosas ramas y poda sanitaria para prevención de enfermedades y plagas. Tiene baja necesidad de riego. Las plántulas se trasplantan con cepellón pequeño y se plantan a una distancia de 7 m entre cada árbol (Ibarra *et al.* 2009).

#### 2.1.11. Tolerancias

- Demandante de luz.
- Firme al viento.
- Resistente a fuego y daño por termitas.

- Tolerante a contaminación ambiental, se desarrolla bien en ambientes contaminados, heladas, suelos ácidos, suelos compactados y pedregosos, suelos húmedos y suelos someros (Ibarra *et al.* 2009).

#### 2.1.12. Desventajas

- Intolerante a la sombra.
- Sensible / Susceptible a daño por hongos (fruto, hoja), daño por insectos (hoja) y orugas, gusanos, polillas (Ibarra *et al.* 2009).

#### 2.1.13. Usos

**Combustible [madera].** Leña y carbón.

**Comestible (fruta, dulces) [fruto].** Fruto muy apreciado como complemento alimenticio por su agradable sabor. Se come crudo o en conserva (jalea o mermelada) y bebidas frescas. En los mercados suelen venderse tamales de capulí.

**Construcción [madera].** Construcción rural.

**Estimulante [fruto].** Elaboración de bebidas embriagantes con el fruto fermentado.

**Industrializable [semilla].** La semilla contiene 30 a 40 % de aceite semisecante apropiado para la fabricación de jabones y pinturas.

**Maderable [madera].** Decoración de interiores, postes, carpintería en general, ebanistería. La madera tiene un color rojizo brillante; es fácil de labrarse y adquiere un bello pulimento.

**Medicinal [corteza, hoja, fruto].** Corteza, hojas (en infusión): se usa como expectorante, estimulante, febrífugo, antiespasmódico, tónico, sedante y para combatir las diarreas. El polvo de la corteza "aplicado en los ojos desvanece las nubes, aclara la vista y cura las inflamaciones. El fruto en jarabe se usa contra la tos. Los extractos, infusiones y jarabes preparados con las ramas, corteza y

raíces, se usan como tónicos y sedantes en el tratamiento de la tisis pulmonar y en la debilidad nerviosa (Ibarra *et al.* 2009).

Se ha encontrado además que las semillas del fruto son ricas en ácido oleico (Alveano *et al.* 2011). Asimismo, el fruto de capulí puede usarse como un alimento funcional potencialmente útil en la prevención y tratamiento de la hipertensión (Luna *et al.* 2013). Son pocas las publicaciones sobre la composición del colorante extraído de la cáscara (antocianinas) (Ordaz *et al.* 1999).

Por todo lo expuesto, se considera importante buscar alternativas de industrialización del fruto de capulí. Además, se venden en el mercado local algunas producciones artesanales de mermeladas de capulí, entre otros. Sin embargo, estas producciones no han sido significativas en cuanto a la cantidad de capulí industrializado. Además, se necesita mejorar mucho la calidad sensorial, nutricional y el contenido de fitonutrientes de los productos elaborados por ello se puede considerar al fruto de capulí como fuente de compuestos de origen natural como es la obtención de colorantes naturales y compuestos bioactivos. En general, estos frutos son reconocidos por sus potenciales efectos beneficiosos en la salud, ya que contienen altas concentraciones de antocianinas, que podrían ser extraídas y utilizadas en la industria alimentaria como colorante y antioxidante (Faria *et al.* 2005).

## **2.2. Las antocianinas**

Las antocianinas están presentes en los frutos del capulí. Estos compuestos son colorantes naturales que han suscitado interés debido a su carácter no tóxico y porque al ser hidrosolubles, se pueden utilizar como colorantes en productos alimenticios. Además, debido a sus propiedades antioxidantes, se pueden encontrar numerosas publicaciones que les atribuyen propiedades beneficiosas para la salud, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, cáncer y diabetes, entre otras (Castañeda-Ovando *et al.* 2009; Moldovan *et al.* 2012).

Estos atributos de las antocianinas, colorantes y antioxidantes, resultan de interés a efectos de estudiar metodologías de extracción para poder utilizar posteriormente el producto en aplicaciones tecnológicas, especialmente como ingrediente en la industria alimentaria e incorporarlo a alimentos y bebidas (Castañeda-Ovando *et al.* 2009; Faria *et al.* 2005).

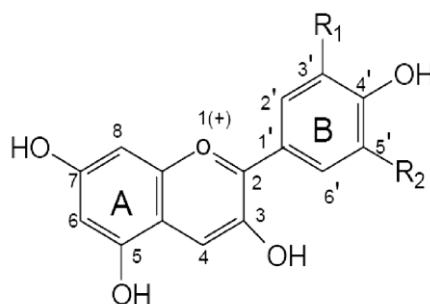
Para abordar este desafío es conveniente estudiar primero la estructura química de estos compuestos y los distintos factores que pudieren afectar su estabilidad.

### 2.2.1. Estructura química

Las antocianinas son los compuestos químicos responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta en hojas, flores y frutos (Kong *et al.* 2003).

Son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos  $\alpha$  y  $\beta$  unidos por una cadena de 3 Carbonos (Garzón *et al.* 2008). Las antocianinas están constituidas por una molécula de antocianidina, que es una aglicona a la que se le une un azúcar por medio de un enlace glucosídico; por lo general están glucosidados en la posición 3 y 5 (Badui *et al.* 2006).

El color de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Garzón *et al.* 2008). En la figura 3 se muestra la estructura básica de una molécula de antocianinas.



Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	510 (azul-rojo)

**Figura 3.** Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas (Garzón *et al.* 2008).

### 2.2.2. Extracción y concentración de antocianinas

Las antocianinas se pueden extraer de diferentes tejidos vegetales (Francis *et al.* 1989). El método usual de extracción es la extracción sólido-líquido. Sin embargo, es de destacar la existencia de otros métodos. Así, científicos japoneses desarrollaron una metodología alternativa que consiste en extraer las antocianinas mediante la fermentación de las matrices que las contienen (Fan *et al.* 2008).

En relación a la extracción, (Rodríguez y Wolstrad 2001) señalan que 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, especialmente, grupos acilos, además de por factores como la temperatura y la luz y el método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta. Así, en el caso de las antocianinas, se debe maximizar la extracción 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 (Wrolstad *et al.* 2000).

La concentración de antocianinas entonces se determina con la absorbancia a un pH diferencial. Éstas moléculas dan dos bandas de absorción en la región UV (180-380 nm) y la región visible (380 – 700 nm). Los resultados se expresan como pigmentos de antocianinas monoméricas. El método del pH diferencial permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas totales, abteniéndose una medida de absorbancia máxima en la región visible (Leyva *et al.* 2009).

La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH manifestado por un llamativo cambio en la absorbancia. La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4,5. El pH diferencial es un método basado en ésta reacción, y permite una rápida y exacta medida de la antocianinas total, incluso en la presencia de pigmentos degradados polimerizados y de otros compuestos interferentes (Leyva *et al.* 2009).

Al conocer las características fisicoquímicas de las antocianinas y su comportamiento en los diferentes pH's se puede medir la concentración de antocianinas totales en el



extracto de la materia a analizar, aplicando el método del pH diferencial reportado por (Wroslstad *et al.* 2000) de la siguiente manera:

$$[\text{Antocianinas totales}] = A_{\text{neta}} \times M \times FD \times 1000 / (\epsilon \times l) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

donde:

*[Antocianinas totales]* = concentración de antocianinas totales en mg/L

*A<sub>neta</sub>* = absorbancia neta

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 1,0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH} = 4,5}$$

*M* = masa molar de la cianidina-3-glucósido = 449,2 g/mol

*FD* = factor de dilución (1 en 50)

1000 = factor de conversión de g a mg

$\epsilon$  = absortividad molar = 26 900  $\frac{\text{L}}{\text{mol}} \cdot \text{cm}$

*l* = longitud de paso de celda = 1 cm

Cacace y Mazza *et al.* (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, en donde las variables independientes seleccionadas por estos investigadores fueron: concentración de etanol y temperatura. 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 % 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 85 °C.

También Fan *et al.* (2008) investigaron sobre las condiciones de extracción de antocianinas presentes en camote morado, en la cual trabajaron con las variables:

temperatura de extracción (50-70 °C), tiempo (20-40 min) y como respuesta evaluaron el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura y el tiempo de extracción influyeron en el rendimiento de extracción. Estos autores obtuvieron que la mejor combinación de las variables fue: temperatura de 70 °C y tiempo de extracción 40 minutos.

Gorriti-Gutierrez *et al.* (2009) 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 15 y 35 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 80 °C y 120 minutos.

### **2.2.3. Factores que afectan su estabilidad**

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

- **pH**

El pH tiene efecto en la estructura, color y la estabilidad de las antocianinas. Éstas se pueden encontrar en diferentes formas químicas en función del pH de la solución (Garzón *et al.* 2008). En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos básicamente el 100 % del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH<sup>+</sup>) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición dos, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal y la forma chalcona 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 de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Provenzi *et al.* 2006). La estabilidad de antocianidinas está influenciada por los sustituyentes del anillo B y la presencia adicional de grupos de hidroxilo o metoxilo que disminuyen la estabilidad de la aglucona en medio neutro (Garzón *et al.* 2008).

De lo expuesto se puede señalar que la acidez tiene un efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. Es por esto que las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (Aguilera Ortiz *et al.* 2011).

- **Temperatura**

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

Gorriti Gutierrez *et al.* (2009) investigaron la extracción de antocianinas de maíz morado a temperaturas entre 25 y 90 °C. Así, obtuvieron que el mayor rendimiento de extracción se produjo a temperaturas entre 75 °C y 90 °C, dependiendo de las demás condiciones de extracción.

Por otra parte, un estudio sobre la cinética de degradación de antocianinas durante el tratamiento térmico de jugo de arándanos, entre las temperaturas de 40 y 80 °C, señaló que ésta fue de primer orden y que la degradación fue mayor a valores más altos de temperatura (Pereira Kechinski *et al.* 2010).

Wang y Xu *et al.* (2007) estudiaron también la cinética de degradación de antocianinas, en este caso en jugo de mora, durante el tratamiento térmico y el almacenamiento y llegaron a la misma conclusión que Pereira Kechinski *et al.* (2010). Hubo una pérdida de antocianinas, tanto durante el tratamiento térmico como durante el almacenamiento. Esta pérdida siguió una cinética de primer orden. Además, la degradación de antocianinas aumentó con el incremento de la temperatura.

De lo expuesto se puede decir que, en términos generales, la bibliografía señala que las temperaturas más elevadas provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas, especialmente durante un tratamiento térmico o el almacenamiento. Sin embargo, los mejores rendimientos de extracción de antocianinas de un determinado producto fueron a temperaturas altas. Probablemente, este último efecto se deba a la mayor transferencia de antocianinas desde la matriz que lo contiene hacia el seno de la disolución extractiva.

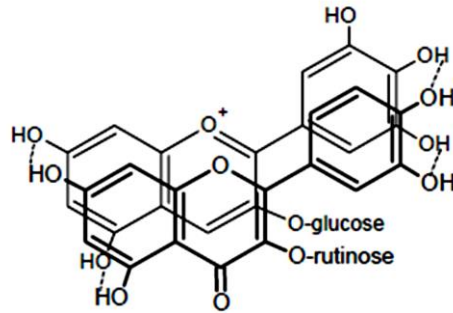
- **Agua**

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación. Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. 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 (Kopjar y Piližota *et al.* 2009; Lewis y Walker *et al.* 1995).

- **Copigmentación**

La copigmentación es uno de los principales factores de estabilización de la estructura del catión flavilio. Las formas coloreadas de las antocianinas pueden estabilizarse por interacción con componentes, llamados copigmentos, que existen en las células de las flores y frutas (Rein *et al.* 2005). Los copigmentos pueden ser flavonoides, polifenoles, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos y grupos acilo aromáticos, entre otros. La copigmentación se lleva a cabo en un rango de pH ácido y puede ocurrir a través de una serie de interacciones (Mazza *et al.* 1995).

La disposición solapada de las dos moléculas (antocianina y copigmento) (Figura 4), previene el ataque nucleofílico de moléculas de agua en la posición 2 del catión flavilio, evitando la formación de la pseudobase no coloreada (Rein *et al.* 2005).



**Figura 4.** Formación de complejo a través de interacción intermolecular (Rein *et al.* 2005).

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

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

- **Oxígeno**

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

Además se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, formando peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina, produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina (Fennema *et al.* 2000).

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

- **Luz**

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

Al estudiar el efecto de la luz sobre la estabilidad de las antocianinas en extracto de frutos de espinaca blanca, concluyeron que la luz ejerce un efecto adverso sobre su estabilidad (Laleh *et al.* 2006).

Por lo tanto, resulta importante proteger, no solo del oxígeno, sino también de la luz a los productos ricos en antocianinas.

#### **2.2.4. Propiedades colorantes y antioxidantes de las antocianinas**

El color de un alimento es una de las características de calidad que el consumidor primero percibe y que más influye en la elección del mismo. En la actualidad colorear los alimentos es una práctica común, ya sea para resaltar, recuperar o uniformar su color original o simplemente para hacerlos más atractivos.

Existen, en el mercado, colorantes naturales y sintéticos. Estos últimos presentan como principales ventajas que proporcionan mayor intensidad de coloración (por lo que se requiere menor cantidad de colorante para obtener el mismo efecto), suministran una mayor gama de colores, son más estables a la luz, pH y temperatura, es más fácil lograr la reproducibilidad de obtención del color deseado y presentan menores probabilidades de interactuar con otros aditivos (Astiasarán *et al.* 2003). Sin embargo, tienen importantes desventajas entre las que hay destacar que los colorantes sintéticos ocasionan, en ciertas personas, gastroenteritis alérgica. También se les ha relacionado con la hiperactividad en niños (Prado-Lobato *et al.* 2012). Además, y de forma genérica se puede afirmar que la mayoría de los colorantes sintéticos presentan problemas de toxicidad a altas dosis, por lo que su empleo está siendo restringido (Astiasarán *et al.* 2003).

La preocupación de los consumidores acerca de la seguridad de los colorantes sintéticos ha aumentado el interés por el uso de colorantes naturales como aditivos. A la hora de seleccionar un colorante surgen preguntas sobre las características tecnológicas, toxicológicas y legales acerca del uso del mismo. Si bien los colorantes sintéticos poseen

mejores características funcionales y tecnológicas que los naturales, existe una marcada tendencia hacia el consumo de productos más naturales, libres de compuestos químicos sintéticos y con potenciales efectos beneficiosos sobre la salud (Restrepo Gallego *et al.* 2007).

Es por ello que se están desarrollando investigaciones enfocadas a buscar pigmentos coloreados obtenidos de materias primas de origen animal, mineral y fundamentalmente vegetal. En este sentido, los colorantes naturales son menos tóxicos y menos nocivos para la salud, además tienen un menor impacto sobre el medio ambiente (Siva *et al.* 2007).

Sin embargo, son más caros, menos potentes y menos estables. Están formados por dos grupos químicos: cromóforo y auxocromo. El cromóforo, usualmente es un anillo aromático y está asociado a la propiedad colorante. Tiene enlaces insaturados como  $-C=C$ ,  $=C=O$ ,  $-C-S$ ,  $=C-NH$ ,  $-CH=N$ ,  $-N=N-$  y  $-N=O$ , cuyo número define la intensidad del color. Los grupos auxocromos son sustituyentes del cromóforo que intensifican la intensidad del color (Riva *et al.* 2007).

Como se mencionó anteriormente, las antocianinas son las responsables de conferir los colores rojo, azul y violeta en vegetales, granos de cereales, flores y frutos (Bridgers *et al.* 2010), especialmente en arándano, uva y manzana. Las antocianinas son colorantes interesantes por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, ya que por sus colores atractivos se las puede utilizar como colorantes alimentarios naturales, y por sus potenciales beneficios a la salud (Aguilera Ortiz *et al.* 2011; Bridgers *et al.* 2010; Castañeda-Ovando *et al.* 2009).

De hecho, el empleo de antocianinas como colorantes se encuentra contemplada en el Código Alimentario Argentino (2012), como así también en la lista de colorantes alimentarios autorizados en la Unión Europea (Astiasarán *et al.* 2003).

Dentro de las posibles fuentes de antocianinas para su utilización como colorantes, se encuentran las uvas, los arándanos, los arándanos agrios y algunas otras plantas como la perilla (Faria *et al.* 2005; Francis y Markakis *et al.* 1989). Estos pigmentos naturales representan un potencial importante en la industria, ya que, se podrían usar como aditivo, en competencia con los colorantes sintéticos utilizados en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos. Sin embargo, para su aplicación queda mucho por investigar. Así, por ejemplo, es necesario profundizar sobre su estabilidad en matrices específicas, la relación entre su

estructura y la actividad biológica de metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas (Garzón *et al.* 2008; Vargas-Simón *et al.* 2002).

El interés en los pigmentos antociánicos ha aumentado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. En el paso del sistema digestivo al sistema circulatorio, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos que influyen en la prevención de enfermedades coronarias, cancerígenas, neurológicas, circulatorias, inflamatorias y diabéticas; además de mejorar la agudeza visual y el comportamiento cognitivo. Estos efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Aguilera Ortíz *et al.* 2011; Castañeda-Ovando *et al.* 2009; Wang y Mazza *et al.* 2002; Sánchez-Moreno *et al.* 2002). Por lo tanto, las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Garzón *et al.* 2008).

La actividad antioxidante de las antocianinas radica en el hecho de que pueden reaccionar con radicales libres. Estos últimos, entre los que se encuentran los radicales OH• (hidroxilo) y O<sub>2</sub>• (superóxido), son capaces de atacar a proteínas, carbohidratos, grasas y ADN del cuerpo, ejerciendo un efecto oxidativo que daña las células. Así, cuando un radical reacciona con una molécula, la molécula resultante de esta reacción se convierte en un nuevo radical libre, originándose una reacción en cadena, que provoca un daño en los tejidos, que a su vez, derivan en enfermedades degenerativas disminuyendo la calidad de vida (Youngson *et al.* 2004).

Esta acción oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias denominadas antioxidantes. Se llama "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 *et al.* 2013).

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.* 2010).



Las propiedades atribuidas a las antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos (Wang y Mazza *et al.* 2002).

Actualmente, existe un interés considerable en aumentar el consumo de antioxidantes en la dieta humana. Una forma de lograrlo es mediante el enriquecimiento de alimentos con antioxidantes. Por sus características hidrosolubles, las antocianinas podrían incorporarse a alimentos acuosos. Sin embargo, existen factores que pueden afectar la actividad antioxidante de los frutos, tales como el grado de madurez en la cosecha, estación, diferencias genéticas, condiciones ambientales previas a la cosecha, condiciones de almacenamiento posteriores a la cosecha y procesamiento (Yean-Yean y Barlow *et al.* 2004).

A partir de cáscara de capulí, se podría obtener un producto rico en antioxidantes, especialmente en antocianinas que podría ser incorporado a ciertos alimentos, tales como cremas, helados, bebidas, frutos, etc; impartiendo la característica de alimento funcional. Además, dado que el color juega un rol importante en la preferencia y aceptabilidad de un alimento, este producto también podría ser utilizado como colorante natural.

Resumiendo, la obtención de un producto rico en antocianinas a partir de la cáscara de capulí podría tener un impacto positivo, dado que:

- Se obtendría un colorante natural, constituyendo una alternativa a los cuestionados colorantes sintéticos.
- Se dispondría de una fuente de antioxidantes de origen natural, cuyo aporte a distintos alimentos les impartiría la característica de funcionales.

### **2.2.5. Las antocianinas como colorantes naturales**

La creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos ha sido investigada por Hallagan *et al.* (1991), y Lauro *et al.* (1991), quienes reportaron que los colorantes rojo No. 2 y No. 40 se han prohibido en Austria, Japón, Noruega y Suecia, pero el rojo No. 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.* 2002; McCann *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 *et al.* 1996;

Birks *et al.* 1999; Ersus y Yurdagel *et al.* 2007; Olaya *et al.* 2009; Wallace y Giusti *et al.* 2008).

Las políticas regulatorias en cuanto al uso de colorantes derivados de las antocianinas varían de país a país (Ottersäater *et al.* 1999). Estados Unidos es el país más restrictivo en cuanto al uso de las antocianinas como colorantes naturales. Allí, cuatro de los 26 colorantes que están exentos de certificación y aprobados para el uso en alimentos se derivan de la cáscara de la uva, del extracto de la uva, del jugo de vegetales y del jugo de frutas. Las fuentes más comunes de jugo de vegetales son el repollo morado, los rábanos y diferentes variedades de bayas (Wrolstad *et al.* 2004). En contraste, en la Unión Europea, Chile, Colombia, Irán, Israel, Corea del Sur, Malta, Perú, Arabia Saudita y los Emiratos Árabes todos los colorantes derivados de las antocianinas son reconocidos como naturales (Ottersäater *et al.* 1999).

Las antocianinas son pigmentos responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul de muchas frutas, vegetales y cereales. El interés en estos pigmentos se ha intensificado gracias a sus posibles efectos terapéuticos y benéficos, dentro de los cuales se encuentran la reducción de la enfermedad coronaria, los efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatoria y antidiabética; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano. 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 (Wrolstad *et al.* 2004).

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 (Stintzing *et al.* 2002).

#### **2.2.6. Biosíntesis de las antocianinas**

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos. Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta de ácido shikímico. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que

por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de  $\text{NH}_3$  se convierte en ácido p-coumárico. El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil- CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa. Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posterior posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones (Springob *et al.* 2003).

### **2.2.7. 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) 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. 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). 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. De igual manera, Wang y Jiao *et al.* (2000) y Wang y Lin *et al.* (2000) han demostrado que frutos ricos en antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y contra radicales peróxido ( $\text{ROO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ).

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. Referente a la actividad antiinflamatoria, Wang y Mazza *et al.* (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 EG2, sinónimo de actividad antiinflamatoria en extractos de antocianinas.

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.

Las antocianinas son pigmentos naturales que imparten colores a las plantas para diversas funciones. Estos pigmentos representan un potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos en alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos y para la obtención de productos con valor agregado dirigidos al consumo humano.

## CAPÍTULO III

### 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, ubicado en el distrito, provincia 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 capulí, el cual fue adquirido en el mercado central de Cajamarca, procedente del Centro Poblado Otuzco, considerando características como tamaño, forma, consistencia, color (negro rojizo) y grado madurez comercial (es decir halla alcanzado su máximo tamaño, y tenga una consistencia firme que permitirá el manejo de éste) se determinó este grado de madurez intermedio mediante la vista.
- El agua que se usó como solvente fue agua destilada (cuya composición se basa en la unidad de moléculas de H<sub>2</sub>O, a la cual se le han eliminado las impurezas e iones mediante destilación), ésta destilación se realizó de manera previa en el laboratorio de Química (1E-207) del Departamento de Ciencias Químicas y Dinámicas, usando un destilador automático de agua.

#### Materia prima



**Figura 5.** Fruto de capulí (*Prunus Serotina spp*) (Ibarra et al. 2009).

### **3.2.2. Material y equipos de laboratorio**

#### **a) Equipos**

- Balanza analítica
- Agitador magnético
- Termómetro
- Bomba de vacío
- Espectrofotómetro UV – Vis

#### **b) Material**

- Cuchillos
- Tubos de ensayo
- Fiolas
- Pipetas
- Matraz kitasato
- Embudo büchner
- Embudo de plástico
- Barra mangnética
- Matraz de 2 bocas
- Matraz de 1 boca
- Varilla capilar
- Placas petri
- Condensador allihn
- Condensador recto

### **c) Reactivos**

- Solución etanólica al 20 %
- Buffer a pH 1, 0: Cloruro de potasio (KCl)
- Buffer a pH 4, 5: Acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa)

### **d) Otros**

- Marcadores, lapiceros, bolsas de polietileno, envases de plástico, papel toalla, papel bond y computadora.

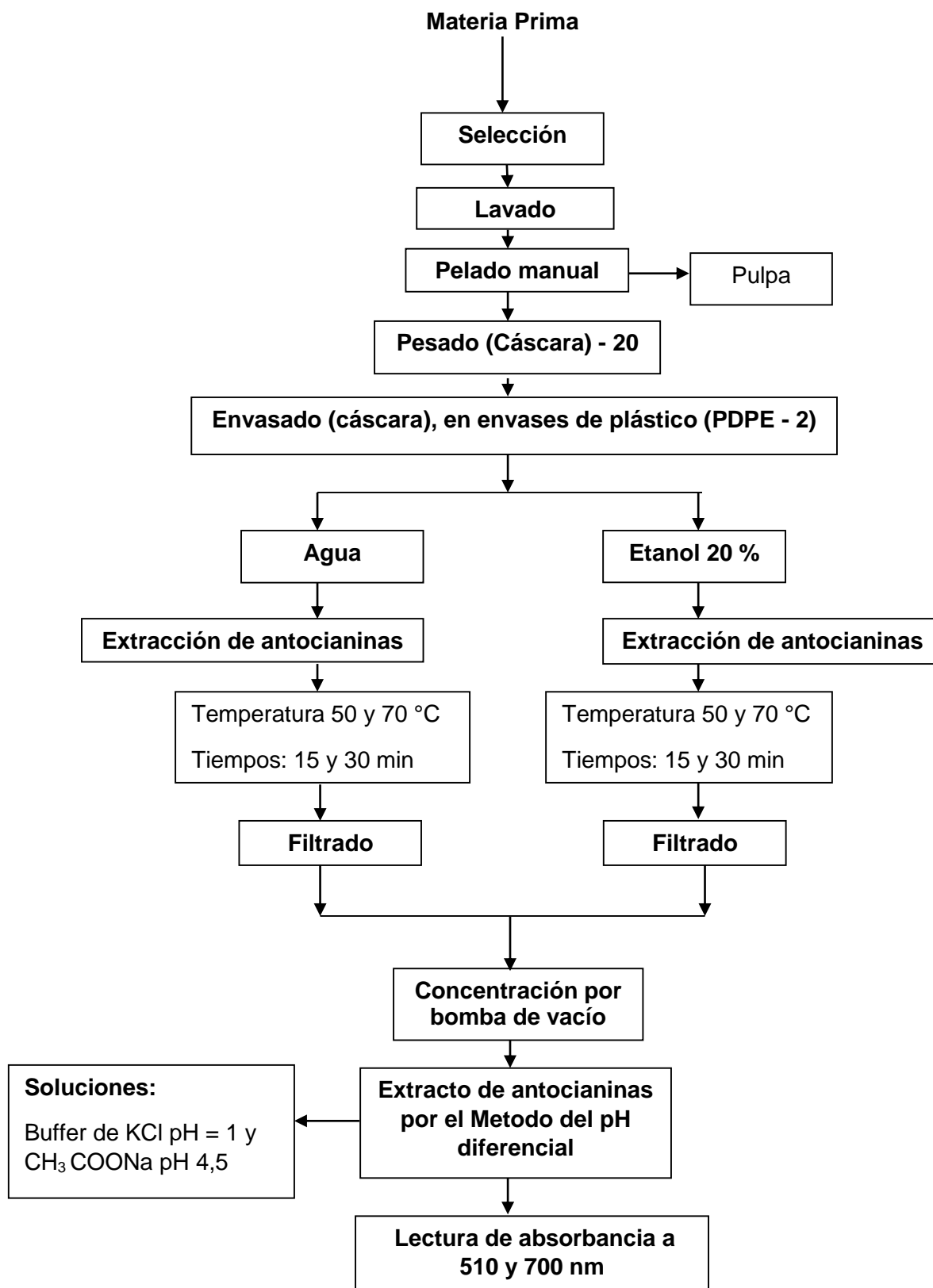
## **3.3. Metodología**

### **3.3.1. Trabajo de campo**

Se consideró todo lo relacionado con la materia prima (frutos de capulí), el cual fue comprado en el mercado Central de la ciudad de Cajamarca, procedente del Centro Poblado de Otuzco, distrito, provincia y departamento de Cajamarca, considerando características como su peso (promedio de 4 a 6 g), tamaño, forma, color y madurez, una vez seleccionados se procedió a trasladar los frutos en envases de plástico evitando de que se produzca algún tipo de daño que altere su comportamiento fisiológico, llegando así al laboratorio en donde se almacenaron en una refrigeradora a 4 °C manteniendo la frescura del mismo para luego proceder los pasos a seguir como muestra la figura 6.

### **3.3.2. Trabajo de laboratorio**

La cuantificación de antocianinas de cáscara del fruto de capulí (*Prunus Serotina spp*) se representa en el siguiente flujograma llevado a cabo en el laboratorio de Química (1E-207) del Departamento de Ciencias Químicas y Dinámicas.



**Figura 6.** Diagrama de flujo de obtención de extracto de antocianina con dos solventes (Lee et al. 2008 y gorriti et al. 2009).



El flujograma se explica a continuación:

- **Selección**

Se seleccionó la materia prima (frutos de capulí), teniendo en cuenta su grado de madurez, tamaño, forma y color (Ibarra *et al.* 2009).

- **Lavado**

Se lavaron los frutos de capulí de forma manual mediante chorro de agua, teniendo cuidado de no maltratar la materia prima (Gorriti *et al.* 2009).

- **Pelado**

El pelado se realizó de manera manual, retirando la cáscara cuidadosamente. (Gorriti *et al.* 2009).

- **Pesado**

Se pesó 20 g de la cáscara obtenida (Gorriti *et al.* 2009).

- **Envasado**

Se envasó, la cáscara del fruto de capulí en envases de plástico N° 2 (Polietileno de alta densidad) y luego se puso en refrigeración a 4 °C, para mantener la frescura del mismo, y así utilizar la muestra al día siguiente nuevamente (Gorriti *et al.* 2009).

- **Extracción**

En esta operación se extrajo las antocianinas de la cáscara del fruto de capulí utilizando los dos solventes agua y etanol al 20 %, temperaturas de 50 y 70 °C en un tiempo de 15 y 30 minutos, como equipo se usó un agitador magnético y como materiales una barra magnética, matraz de 2 bocas, termómetro, embudo de plástico y el condensador Allihn (Gorriti *et al.* 2009).

- **Filtrado**

Se utilizó un embudo Büchner, matraz kitasato y papel Whatman N° 1 para separar el líquido del sólido (Gorriti *et al.* 2009).

- **Concentración**

El sistema comprende de los siguientes equipos y materiales: agitador magnético, termómetro, varilla capilar, matraz de 2 bocas, condensador recto, matraz de 1 boca, y la bomba de vacío, realizando la concentración del líquido obtenido en la filtración a una temperatura de 30 °C (Gorriti *et al.* 2009).

- **Extracto de antocianinas**

Se utilizó el método del pH diferencial, para lo cual colocamos primero el extracto de antocianinas en una fiola de 50 ml enrazando con agua destilada y agitamos. Luego tomamos 1 ml de esta solución y la colocamos en otra fiola de 50 ml y aforamos con las soluciones buffer de KCl pH = 1 y CH<sub>3</sub>COONa pH = 4,5, agitamos y dejamos en reposo aproximadamente 20 minutos (Goupy *et al.* 2013; Lee *et al.* 2008).

- **Lectura de absorbancia**

Se leyeron en un espectrofotómetro UV – Vis, a 510 y 700 nm las absorbancias de cada uno de los extractos de antocianinas. Teniendo los datos de absorbancia se calculó la concentración de antocianinas totales utilizando la ecuación (1) (Goupy *et al.* 2013; Lee *et al.* 2008).

### **3.4. Trabajo de gabinete**

- Para realizar el tratamiento estadístico de los datos experimentales se utilizó el software Minitab 17.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Serie de experiencias de extracción de antocianinas

Como se describió en la revisión de literatura, existen numerosos procesos de extracción sólido-líquido y son también múltiples los factores que afectan la estabilidad de las antocianinas (Fan *et al.* 2008). Esto hace que haya muchos trabajos de investigación sobre la influencia de los distintos factores involucrados en la extracción de estos compuestos, tales como pH, temperatura, tipo de disolvente utilizado, presencia de oxígeno, tiempo de extracción y luz entre otros. Todo esto pone de manifiesto la importancia de analizar la influencia de dichos factores en cada caso concreto.

En este trabajo, se realizó una primera serie de experiencia de extracción de antocianinas a partir de la cáscara del fruto del capulí y se estudió la influencia de las variables temperatura de extracción (50 y 70 °C), tiempo de extracción (15 y 30 minutos). El solvente utilizado fue agua, el trabajo de laboratorio se realizó de acuerdo a un diseño experimental y como respuesta para evaluar la eficacia de los tratamientos, se consideró tres repeticiones para las dos variables (temperatura y tiempo), teniendo como resultado 12 datos. En una segunda serie de experiencia de extracción se utilizó etanol al 20 % como solvente considerando de igual manera 3 repeticiones para cada variable, teniendo de igual forma 12 resultados, teniendo un total de 24 datos obtenidos en laboratorio.

Se mencionó anteriormente que a pH por encima de 3,5 disminuye el contenido de antocianinas totales. Esto se corrobora con lo señalado por la bibliografía, donde se menciona que la acidez tiene un efecto protector sobre la molécula de antocianina (Garzón *et al.* 2008) al otorgarle mayor estabilidad (Fennema *et al.* 2000). La sensibilidad de las antocianinas a los cambios de pH se debe a que el núcleo de flavilio es deficiente en electrones y por lo tanto muy reactivo (Badui *et al.* 2006).

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del contenido de antocianinas utilizando dos solventes, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción, cuyos datos se han ordenado para facilitar su lectura. Un primer análisis indicaría que con solvente agua a una temperatura de 70 °C y un tiempo de extracción de 30 minutos, se obtiene la mayor cantidad de antocianinas. Pero la eficacia de la extracción de antocianinas en cáscara del fruto de capulí aumentó con el solvente etanol al 20 %, ya que su valor a la temperatura de 70 °C y tiempo de extracción de 30 minutos, superó en gran cantidad al análisis anterior.

**Tabla 2.** Contenido de antocianinas utilizando dos solventes, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción

FACTOR		SOLVENTE			
		AGUA		ETANOL 20%	
		Tiempo 15 min	Tiempo 30 min	Tiempo 15 min	Tiempo 30 min
TEMPERATURA	50 °C	0,117	0,133	0,735	0,927
		0,100	0,125	0,451	0,952
		0,100	0,150	0,518	1,010
	70 °C	0,493	1,687	1,186	1,887
		0,417	1,745	1,327	2,555
		0,423	1,678	1,436	2,413

Por ello para un mejor análisis de los resultados se trabajó por separado los solventes agua y etanol al 20 % para poder observar su comportamiento con las diferentes variables (temperatura y tiempo), con las que se determinarán su valores de media, desviación estándar y coeficiente de variación, para determinar homogeneidad o heterogeneidad en sus resultados con respecto al contenido de antocianinas en mg/g.

Mediante las siguientes tablas se buscó determinar el punto óptimo o el valor más significativo en contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí en mg/g, en una combinación de solvente, temperatura y tiempos de extracción, y así determinar el mejor tratamiento.

**Tabla 3.** Contenido de antocianinas con solvente agua, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción

NÚMERO	DISEÑO			RESULTADOS DE LAS MUESTRAS	ANTOCIANINAS mg/g		
	SOLVENTE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)	ANTOCIANINAS (mg/g)	Media	Desviación Estándar	Coficiente de variación
1				0,117			
2	<b>Agua</b>	50	15	0,100	0,11	0,01	9,30 %
3				0,100			
4				0,493			
5	<b>Agua</b>	70	15	0,417	0,44	0,04	9,50 %
6				0,423			
7				0,133			
8	<b>Agua</b>	50	30	0,125	0,14	0,01	9,40 %
9				0,150			
10				1,687			
11	<b>Agua</b>	70	30	1,745	<b>1,7</b>	<b>0,04</b>	<b>2,10 %</b>
12				1,678			
Indicadores globales solvente agua					0,597	0,682	114 %

**Fuente:** Datos ficha laboratorio

La tabla 3 muestra los indicadores, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual para el contenido de antocianinas de cáscara del fruto de capulí para el solvente agua, 50 °C y 70 °C de temperatura, 15 y 30 minutos de tiempo. El valor más alto con solvente agua, se obtiene a 70 °C y 30 minutos obteniendo 1,7 mg/g de media, una desviación estándar de 0,04 mg/g y 2,10 % de coeficiente de variación, indicando homogeneidad en sus resultados.

El agua es uno de los factores que afectan la estabilidad de las antocianinas y observando la tabla anterior se puede observar que la interacción de agua como solvente no es la más adecuada ya que según Kopjar y Pilizota *et al.* (2009); Lewis y Walker *et al.* (1995), la actividad del agua es baja, por lo que las moléculas de ésta tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilo para formar la base carbinol y dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas.

**Tabla 4.** Contenido de antocianinas con solvente etanol al 20 %, a diferentes temperaturas y tiempos de extracción

NÚMERO	DISEÑO			RESULTADOS DE LAS MUESTRAS	ANTOCIANINAS mg/g		
	SOLVENTE	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)	ANTOCIANINAS (mg/g)	Media	Desviación Estándar	Coefficiente de variación
13				0,735			
14	<b>Etanol</b>	50	15	0,451	0,57	0,15	26,10 %
15				0,518			
16				1,186			
17	<b>Etanol</b>	70	15	1,327	1,32	0,13	9,50 %
18				1,436			
19				0,927			
20	<b>Etanol</b>	50	30	0,952	0,96	0,04	4,40 %
21				1,010			
22				1,887			
23	<b>Etanol</b>	70	30	2,555	<b>2,29</b>	<b>0,35</b>	<b>15,40 %</b>
24				2,413			
Indicadores globales solvente etanol					1,283	0,686	53 %

**Fuente:** Datos ficha laboratorio

La tabla 4 muestra los indicadores, promedio, desviación estándar y coeficiente de variación porcentual para el contenido de antocianinas de cáscara del fruto de capulí para el solvente etanol, con 50 °C y 70 °C de temperatura, 15 y 30 minutos de tiempo. El valor más alto con solvente etanol al 20 %, se obtiene a 70 °C y 30 minutos, obteniendo 2,29 mg/g de media, una desviación estándar de 0,35 mg/g y 15,40 % de coeficiente de variación, indicando heterogeneidad en sus resultados.

Se puede observar un resultado más estable con este tipo de solvente a una Temperatura de 70 °C y un tiempo corto de 30 minutos, ya que según: Fennema *et al.* (2000), las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de los 60 °C) se degradan según una cinética de primer orden, por ejemplo Gorriti Gutierrez *et al.* (2009), investigaron la extracción de antocianinas de maíz morado a temperaturas entre 25 y 90 °C. Así, obtuvieron que el mayor rendimiento de extracción se produjo a temperaturas entre 75 °C y 90 °C.

Por lo expuesto se puede decir que la bibliografía señala que las temperaturas más elevadas provocan un efecto adverso sobre la estructura de las antocianinas Sin embargo, los mejores rendimientos de extracción de antocianinas de un determinado producto fueron a temperaturas altas. Probablemente, este último efecto se deba a la mayor transferencia de antocianinas desde la matriz que lo contiene hacia el seno de la disolución extractiva.

Según (Aroni *et al.* 2013) quién realizó el tema de investigación acerca del contenido de antocianinas, utilizando el método del pH diferencial en los siguientes frutos: Hesperomeles escalloniifolia Schltld (CAPACHU), Berberis cummutata Eichler (HUANCACHU), Berberis humbertiana J.F. Macbr (CHEQCHE) y Vaccinium floribundum Kunth (ALAYBILÍ), lo cuales son frutos parecidos a los arándanos, capulí, entre otros. Los cuales fueron recolectados del bosque Kankarhuay ubicado en la localidad de Cotahuacho distrito de Pacucha, provincia de Andahuaylas, departamento de Apurímac.



**Figura 7.** Frutos de capachu, huancachu, cheqche y alaybilí (Aroni *et al.* 2013).



Para la determinación de antocianinas se utilizó como disolvente extractor (etanol al 95 %) y se aforó a volumen conocido (50 ml) de solución y se dejó macerar en un tiempo suficiente hasta que el solvente se sature, de esta forma se realizó la extracción sólido-líquido de antocianinas, para luego estas muestras ya maceradas sean filtradas y se agregue las soluciones de cloruro de potasio (KCl) a pH 1,0 y acetato de sodio (CH<sub>3</sub>COONa) a pH 4,5, para que finalmente sean leídas a longitudes de onda de 520 y 700 nm.

Los resultados de la investigación según Aroni *et al.* (2013), fueron los siguientes:

**Tabla 5.** Contenido de antocianinas en el fruto de capachu (Aroni *et al.* 2013).

MUESTRA	DATOS	VALORES	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (p/p)
Hesperomeles escalloniifolia Schldl (Capachu)	A	0,489	2 026,201 mg/100 g
	MW (mg/mol)	449 600	
	DF	12,5	
	E (L/cm*mol)	26 900	
	L (cm)	1	
	V (L)	0,05	
	Mt (g)	0,502 1	

**Tabla 6.** Contenido de antocianinas en el fruto de huancachu (Aroni *et al.* 2013).

MUESTRA	DATOS	VALORES	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (p/p)
Berberis cummutata Eichler (Huancachu)	A	0,284	1 271,809 mg/100 g
	MW (mg/mol)	449 600	
	DF	14	
	E (L/cm*mol)	26 900	
	L (cm)	1	
	V (L)	0,05	
	Mt (g)	0,511 1	

**Tabla 7.** Contenido de antocianinas en el fruto de cheqche (Aroni *et al.* 2013).

MUESTRA	DATOS	VALORES	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (p/p)
Berberis humbertiana J.F. Macbr (Cheqche)	A	0,549	2 306,297 mg/100 g
	MW (mg/mol)	449 600	
	DF	14	
	E (L/cm*mol)	26 900	
	L (cm)	1	
	V (L)	0,05	
	Mt (g)	0,527 7	

**Tabla 8.** Contenido de antocianinas en el fruto de alaybilí (Aroni *et al.* 2013).

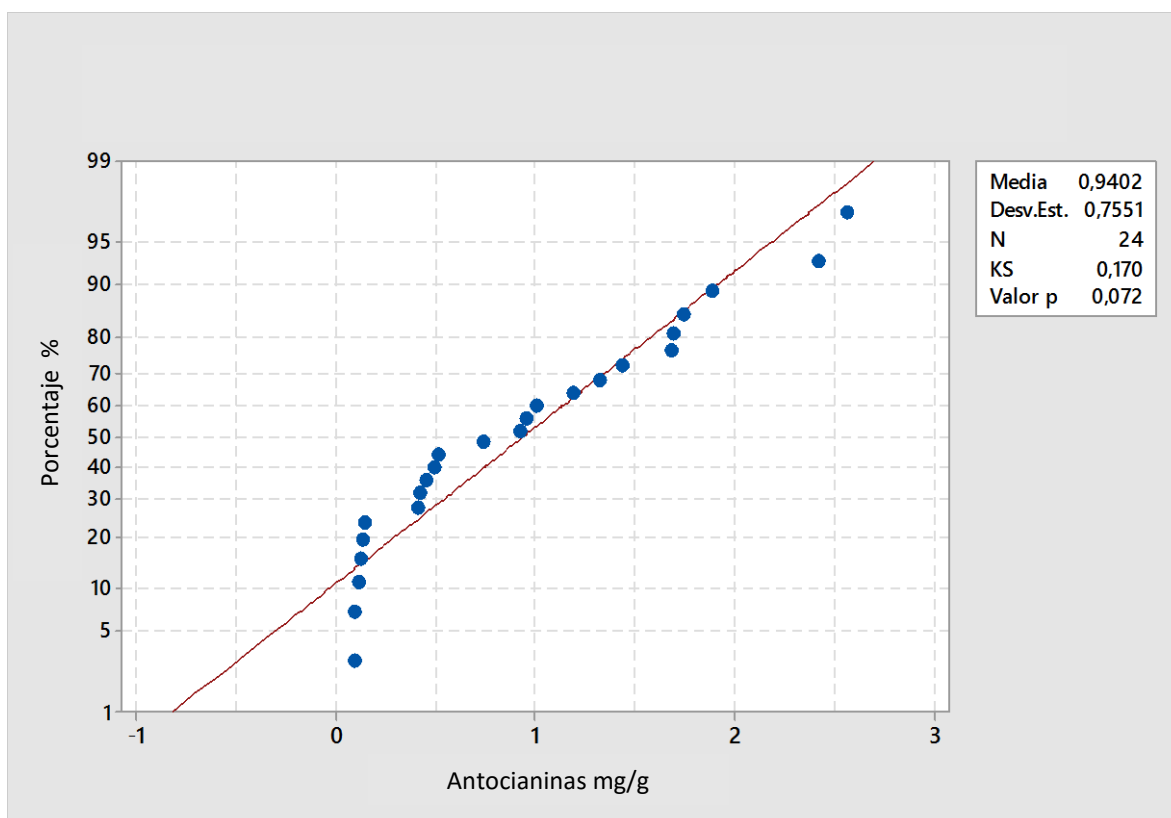
MUESTRA	DATOS	VALORES	CONTENIDO DE ANTOCIANINAS (p/p)
Vaccinium floribundum Kunth (Alaybilí)	A	0,096	319,170 mg/100 g
	MW (mg/mol)	449 600	
	DF	12,5	
	E (L/cm*mol)	26 900	
	L (cm)	1	
	V (L)	0,05	
	Mt (g)	0,560 5	

Cuantificándose el contenido de antocianinas totales tenemos que para el fruto de capachu tienen un valor de (2 026,201 mg/100 g), huancachu (1 271,809 mg/100 g), cheqche (2 306,297 mg/100 g) y alaybili (319,170 mg/100 g), quiere decir que en 100 gramos de fruto sin semillas deshidratado encontramos cada unos de los valores ya descritos anteriormente.

Comparando con el resultado más significativo que obtuvimos fue de (2,285 mg/g = 228,5 mg/100 g de antocianinas en cáscara del fruto de capulí), utilizando el mismo solvente etanol, pero en un porcentaje mucho menor que fue el 20 %, nos damos cuenta que este sería un factor que influye en el resultado final, ya que el solvente usado por el autor fue de 95 % teniendo una mayor concentración incrementando el rendimiento de extracción.

Otro factor que estaría influyendo es el fruto ya que todos estos frutos que están siendo objeto de estudio según Aroni *et al.* (2013), son frutos deshidratados (humedad de 15-18 %), y aquí se usó la cáscara del fruto del capulí fresco, esto también puede estar interviniendo en la variación del contenido de antocianinas, de la misma manera el que en éste trabajo de investigación de Aroni *et al.* (2013) se haya usado un método de fermentación y no de calentamiento (uso de diferentes temperaturas), también podría tener influencia, tratando de explicar que podría ser un mejor tratamiento el hecho de fermentar el fruto con las soluciones, en lugar de exponerlas al calor, quizás se obtendrían mejores resultados, pues nos damos cuenta que los niveles de contenido de antocianinas alcanzados por Aroni *et al.* (2013), para estos 4 frutos se encuentran sobre el valor máximo encontrado en la presentes tesis, quizás por todos los factores antes mencionados, siendo su valor más elevado de contenido de antocianinas 2 026,201 mg/100 g que es del fruto de capachu, representando con un 20,26 mg/g.

#### 4.1. Prueba de normalidad



**Figura 8.** Curva de probabilidade de antocianinas mg/g normal, muestra que el contenido general de antocianina en mg/g sigue una distribución normal porque p es mayor a 0,05, condición necesaria para realizar inferencias de análisis de varianza.

#### 4.2. Hipótesis del diseño de experimento con tres factores a dos niveles cada factor con interacción

**Tabla 9.** Anova para antocianinas totales mg/g vs. solvente, temperatura, tiempo

FACTOR	TIPO	NIVELES	VALORES
Solvente	Fijo	2	Agua ; Etanol
Temperatura	Fijo	2	50 ; 70
Tiempo	Fijo	2	15 ; 30

**ANOVA: ANTOCIANINAS mg/g vs. SOLVENTE; TEMPERATURA; TIEMPO**

**Tabla 10.** Resultados del ANOVA para el contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí

<b>FUENTE DE VARIABILIDAD</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>MC</b>	<b>F calculado</b>	<b>F tabla</b>	<b>P</b>
Solvente	1	28,215	28,215	135,35	4,494	0,000
Temperatura	1	59,292	59,292	284,42	4,494	0,000
Tiempo	1	26,394	26,394	126,61	4,494	0,000
Solvente*Temperatura	1	0,0101	0,0101	0,49	4,494	0,496
Solvente*Tiempo	1	0,0021	0,0021	0,10	4,494	0,757
Temperatura* Tiempo	1	12,182	12,182	58,43	4,494	0,000
Solvente*Temperatura*Tiempo	1	0,1609	0,1609	7,72	4,494	0,013
Error	16	0,3335	0,0208			
Total	23	131,149				

S = 0,144384 R-cuad. = 97,46 % R-cuad.(ajustado) = 96,34 %

Coeficiente de variación de anova 15,34 %

- **Solvente**

**Ho:** El solvente no interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** El solvente interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,000 menor a 0,05, en consecuencia, se rechaza Ho.

Por tanto, el solvente interviene en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Temperatura**

**Ho:** La temperatura no interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** La temperatura interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,000 menor a 0,05, en consecuencia, se rechaza Ho.

Por tanto, la temperatura interviene en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Tiempo**

**Ho:** El tiempo no interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** El tiempo interviene en el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,000 menor a 0,05, en consecuencia, se rechaza Ho.

Por tanto, el tiempo interviene en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Interacción Solvente Temperatura**

**Ho:** No existe interacción entre el solvente y la temperatura para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** Existe interacción entre el solvente y la temperatura para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,496 mayor a 0,05, en consecuencia, no se rechaza Ho.

Por tanto, el solvente y la temperatura no interactúan en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Interacción Solvente Tiempo**

**Ho:** No existe interacción entre el solvente y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** Existe interacción entre el solvente y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,757 mayor a 0,05, en consecuencia, no se rechaza Ho.

Por tanto, el solvente y el tiempo no interactúan en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Interacción Temperatura Tiempo**

**Ho:** No existe interacción entre la temperatura y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** Existe interacción entre la temperatura y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**Alpha = 5 %**

P valor = 0,000 menor a 0,05, en consecuencia, se rechaza Ho.

Por tanto, la temperatura y tiempo interactúa en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

- **Interacción Solvente Temperatura Tiempo**

**Ho:** No existe interacción entre el solvente, la temperatura y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

**H1:** Existe interacción entre el solvente, la temperatura y el tiempo para explicar el contenido de antocianina en mg/g.

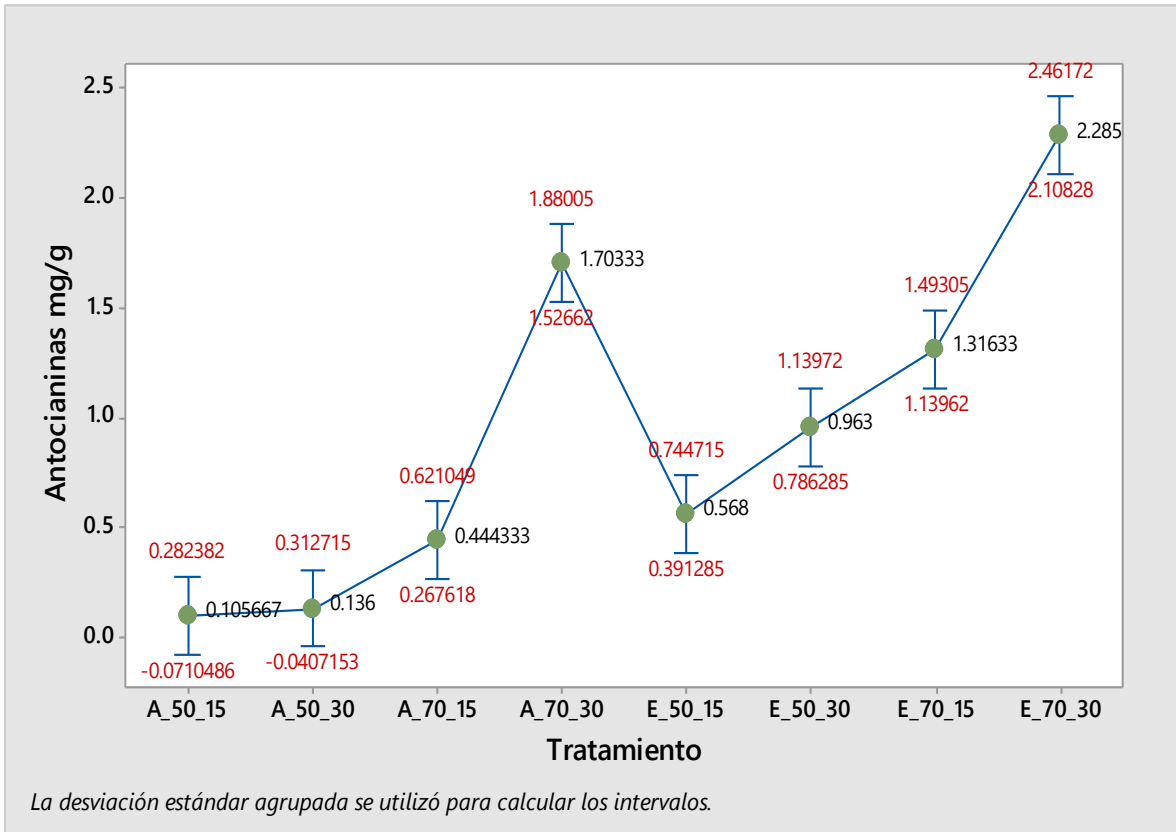
**Alpha = 5 %**

P valor = 0,013 menor a 0,05, en consecuencia, se rechaza Ho.

Por tanto, el solvente, temperatura y tiempo interactúa en el contenido de antocianina en cáscara del fruto de capulí en mg/g.

R cuadrado o coeficiente de determinación supera el 80 %, nivel deseado para que se permita determinar el contenido de antocianinas favorable en una combinación de solvente, temperatura y tiempo.

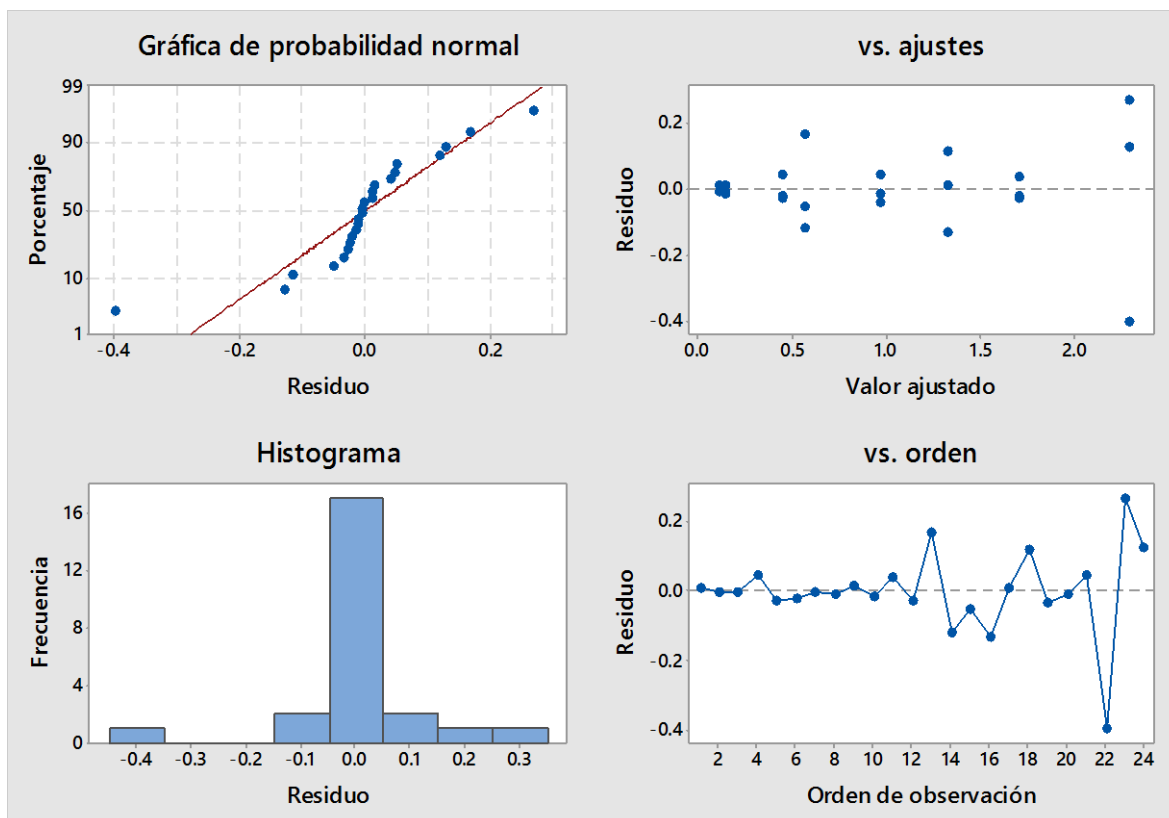
El coeficiente de variación del diseño es 15.34 %, indicando que es aceptable el diseño y trabajo de laboratorio.



**Figura 9.** Contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí en mg/g; para diferentes solventes, temperaturas y tiempos.

La figura 8 presenta los intervalos de confianza para el contenido de antocianinas en mg/g. La fórmula óptima se aprecia para etanol 20 %, temperatura 70 °C y tiempo de 30 minutos. Encontrándose el contenido promedio de antocianinas entre 2,11 y 2,46 mg/g, con una confianza del 95 %, con un promedio de 2,285 mg/g.

Se logró así determinar satisfactoriamente la cantidad promedio del contenido de antocianinas en cáscara del fruto de capulí, pues según: Blok *et al.* 1992, los productos como el capulí, sauco, maíz morado, camote, manzana, fresa, cebolla morada, entre otros contienen el colorante antocianina, que puede ser extraído utilizando métodos de extracción adecuados; en este caso el método del pH diferencial, En estos colorantes se encuentran las antocianinas que están en el reino vegetal y están presentes en raíces, tallos, hojas, flores y frutos de las plantas superiores. El fruto del capulí contiene el pigmento denominado antocianina, el cual se encuentra en mayor cantidad en la cáscara y en menor proporción en la pulpa.



**Figura 10.** Validación del modelo, ésta gráfica de probabilidad normal asegura una distribución normal en los residuos, la gráfica de ajustes garantiza la homogeneidad de las varianzas, el histograma garantiza el valor esperado cero en los residuales o ruido, y las perturbaciones no son auto correlativas en orden uno por uno por la gráfica de orden.

**Tabla 11.** Composición por parejas según Tukey para la concentración de antocianinas totales en mg/g

Solvente	Tratamiento			Indicador		
	Temperatura °C	Tiempo (min)	n	Media	Agrupación	
Etanol	70	30	3	2,29	A	
Agua	70	30	3	1,70	B	
Etanol	70	15	3	1,32	B	C
Etanol	50	30	3	0,96	C	D
Etanol	50	15	3	0,57	D	E
Agua	70	15	3	0,44	E	F
Agua	50	30	3	0,14	F	
Agua	50	15	3	0,11	F	

Según las comparaciones múltiples de Tukey el mejor tratamiento es con solvente etanol, a 70 °C y tiempo de 30 minutos, le sigue agua con 70 °C y tiempo de 30 minutos.



## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **5.1. CONCLUSIONES**

- El contenido de antocianinas obtenido en cáscara del fruto de capulí más significativo usando agua como solvente, se obtuvo a una temperatura de 70 °C y a un tiempo de 30 minutos de extracción, obteniéndose como resultados una media de 1,7 mg/g, una desviación estándar de 0,04 mg/g y un coeficiente de variación de 2,10 % de, indicando homogeneidad en sus resultados.
- El contenido de antocianinas obtenido en cáscara del fruto de capulí más significativo usando etanol al 20 % como solvente, se obtuvo a una temperatura de 70 °C y un tiempo de 30 minutos de extracción, obteniéndose como resultados una media de 2,285 mg/g, una desviación estándar de 0,35 mg/g y un coeficiente de variación de 15,40 %, indicando heterogeneidad en sus resultados, y teniendo una confianza del 95 %, se podría decir que las antocianinas extraídas con este solvente fueron las más estables frente al calentamiento y tiempo.

#### **5.2. RECOMENDACIONES**

- Se recomienda tener en cuenta el grado de madurez comercial del fruto de capulí es decir que halla alcanzado su máximo tamaño, y tenga una consistencia firme que permitirá el manejo de éste, ya que esto influirá en la obtención del contenido de antocianinas. Ésta madurez intermedia la podremos determinar mediante la visión al momento de adquirir el fruto, el cual debe tener una cáscara de color negro rojizo y su textura no debe ser demasiado blanda.
- Dado que los alimentos funcionales marcan las nuevas tendencias en producción y desarrollo del mercado, entre ellos, los que tienen propiedades antioxidantes ocupan un importante segmento, esto, unido a la necesidad de encontrar sustitutos para algunos ingredientes potencialmente tóxicos o alérgenos, obliga a la búsqueda permanente de productos naturales, por ello los colorantes naturales obtenidos por diferentes métodos representa una alternativa buena para desplazar del mercado a los colorantes sintéticos, además que los colorantes naturales cuentan con potenciales propiedades funcionales, excelente para la salud.

### 5.3. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera Ortíz, M. 2011. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*.16-22 p.
- Alveano, I; Rojas, D; Oomahb, J; Drover, C. 2011. Characteristics of *Prunus serotina* seed oil, *Food Chemistry*. 983–990 p.
- Aroni, J. 2013. Evaluación de la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de *Hesperomeles escalloniifolia* Schldl (CAPACHU), *Berberis cummutata* Eichler (HUANCACHU), *Berberis humbertiana* J.F. Macbr (CHEQCHE) Y *Vaccinium floribundum* Kunth (ALAYBILÍ) frente al pH y temperatura. Tesis. 85-89 p.
- Astiasarán, AI; Las Heras, AB; Ariño, PAH; Martínez, HJA. 2033. Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Badui, S. 2006. Química de los alimentos. 4ta ed. Editorial Pearson Educación, México, 738 pp.
- Baulis, A; Spomer, A; Berber-Jiménez, M. 1994. Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of food science*. 59: 1219-1221.
- Birks, S. 1999. The Potential of Carrots. *Food-Manuf*. 47(4):22-23.
- Block, G; Patterson, B; Subar, A. 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr Cancer*. 18, 1-29 p.
- Breakey, J; Reilly, C; Connell, H. 2002. The Role of Food Additives and Chemicals in Behavioral, Learning, Activity, and Sleep Problems in Children. In: Branen AL, Davidson PM, Salminen S, Thorngate III JH, editors. *Food additives*. New York: Marcel Dekker Inc. 87-88 p.
- Bridgers, EN. 2010. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products*, 32: 613–620 p.

- Cacace, JE; Mazza, G. 2003. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol, en: *Journal of Food Science* 68(1): 240-248.
- Castañeda-Ovando, A; Pacheco-Hernández, ML; Páez-Hernández, ME; Rodríguez, JA; Galán-Vidal, CA. 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113: 859–871.
- Corbella, C. 1995. Cultivo de capulí en la Costa central. Lima-Perú. Folleto INIA. N° 17-95.
- Crisosto, CH. 1999. Optimum procedures for ripening stone fruit. In: Management of Fruit Ripening. University of California, Davis, Postharvest Horticulture Series 9, 28-30 p.
- Delgado-Vargas, F; Jiménez, AR; Paredes-López, O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Food Science and Nutrition*, 40:173-289 p.
- Ersus, S; Yurdagel, U. 2007. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota* L.) by spray drier. *Journal of Food. Engineering*, 80: 805-812 p.
- Fan, G; Han, Y; Gu, Z; Che, D. 2008. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM), *LWT - Food Science and Technology*. 41:155–160.
- Faria, A; Oliviera, J; Neves, P; Gameiro, P; Santos-Buelga, C; De Freitas, V; Mateus, N. 2005. Antioxidant Properties of Prepared Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6896-6902.
- Fennema, OR. 2000. *Química de los Alimentos*, 2a ed. Editorial Zaragoza: Acribia SA, 1250 p.
- Fennema, O. 1993. *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Ferrer, A; Remón, S; Oria, R. 2001. Mantenimiento poscosecha de la calidad del melocotón. Grupo de investigación en Tecnología Poscosecha de la Universidad de Zaragoza. *Horticultura profesional* N°117.

- Francis, FJ. 1989. Food colorants: anthocyanins. *Critical Reviews Food Science and Nutrition*.
- Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Gavilanes, F. 1990. Evaluación de siete tratamientos pre germinativos y seis sustratos para la germinación de la semilla de capulí. Trabajo de grado. Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Ambato. Facultad Agronomía. Ambato. 90 p.
- Ghiselli, A; Nardini, M; Baldi, A; Scaccini, C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 46(2), 361-367.
- Giusti, MM. 2008. Analysis of anthocyanins. *In: Food Colorants: Chemical and Functional*. Socaciu C. (ed.). CRC Press LLC. USA. 480-497 pp.
- Giusti, MM; Wroslad, RE. 2001. Characterization and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy. *In Current protocols in Food Analytical Chemistry*, New York, 13 pp.
- Gorriti Gutiérrez, A; Arroyo Acevedo, J; Negron Ballarte, L; Jurado Teixeira, B; Purizaca Llajaruna, H; Santiago Aquise, I; Taype Espinoza, E; Quispe Jacobo, F. 2009. Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante de frutos: Método de extracción. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 509-518 pp.
- Goupy, P; Abert, M; Chematb, F; Caris-Veyrat, C. 2013. Identification and quantification of flavonols, anthocyanins and lutein diesters in tepals of *Crocus sativus* by ultra performance liquid chromatography coupled to diode array and ion trap mass spectrometry detections. *Industrial Crops and Products* 44: 496– 510.
- Hagiwara, A; Yoshino, H; Ichiharam, T; Kawabe, M; Tamanos, S; Aoki, H. 2002. Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-B]pyridine (phip)-associated colorectal carcinogenesis in rats. *Journal of Toxicology Science*, 27:57-68.

- Hallagan, JB. 1991. The Use of Certified Food Color Additives in the United States. *Cereal Food World*; 36:945-948.
- Huck, P; Wilkes, MC. 1996. Beverage Natural Colors: Chemistry and Application. In: International Congress and Symposium on Natural Colorants, Puerto de Acapulco. Abstracts. México: Asociación Mexicana de Especialistas en Colorantes y Pigmentos Naturales, A.C, p. 11.
- Ibarra, C; Rojas, F; Luna, I; Rojas, B; Rivero, J. 2009. Vasorelaxant constituents of the leaves of *Prunus Serotina* "Capulin", *Revista Latinoamericana de Química*: 37(2), 164-173.
- Joseph, JA; Shukitt-Hale, B; Denisova, NA; Bielinski, DB; Martin, A; McEwen. 1999. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive and motor behavioral deficits with blueberry, spinach or strawberry dietary supplementation. *Journal of Neuroscience*, 19:8114-21.
- Kamei, H; Hashimoto, Y; Koide, T; Kojima, T; Hasegawa, M. 1998. Effect of metanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 13(6):447-52.
- Koide, T; Kamei, H; Hashimoto, Y; Kojima, T; Hasegawa, M. 1997. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals*, 12(4), 277-280.
- Kong, JM; Chiam, LS; Goh, NK; Chia, RF; Brouillard, C. 2003. Análisis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64: 923-933.
- Kopjar, M; Piližota, V. 2009. Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1: 16-20.
- Laleh, GH; Frydoonfar, H; Heidary, R; Jameel, R; Zare, S. 2006. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5: 90-92.

- Lauro, GJ. 1991. A primer on Natural Colors. *Jam Assoc Cer Chem*; 36(11):949-953.
- Lee, J; Rennaker, C; Wrolstad, R. 2008. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 110: 782–786.
- Leyva, DE. 2009. Determinación de antocianinas, fenoles y actividad antioxidante en licores y jugo de uva. Oxaca.
- Lewis, C; Walker, J. 1998. Effect of polysaccharide son the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54: 315-319.
- López-Alarcón, C; Denicolab, A. 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 763: 1-10.
- Luna, FJ. 2013. Nutraceutical value of black cherry *Prunus serotina* Ehrh. fruits: antioxidant and antihypertensive properties. *Molecules*: 18 (11), 14597-14612.
- Luthria, D. 2012. A simplified UV spectral scan method for the estimation of phenolic acids and antioxidant capacity in eggplant pulp extracts. *Journal of functional foods* 4: 238–242.
- Markakis, P. 1989. Stability of anthocyanins in food. In *Anthocyanins as food colors by*, New York, 163-180 pp.
- Mazza, G. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 35: 341-371.
- Mccann, D; Barrett, A; Cooper, A; Crumpler, D; Dalen, L; Grimshaw, K. 2007. Food Additives and Hyperactive Behaviour in 3-Year-old and 8/9-Year-old Children in the Community: A Randomised, Double-Blinded, Placebo-controlled Trial. *Lancet*. 370(9598):1560-1567.
- Minag - Oficina de Estudios Económicos y Estadísticos. 2010. Elaboración: Asociación Regional de Exportadores- AREX. Lambayeque.
- Min-Sheng, S; Po-Jung, Ch. 2007. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). *Food Chemistry* 104: 182–187.

- Miyazawa, T; Nakagawa, K; Kudo, M; Muraishi, K; Someya, K. 1999. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyaniding-3-glucoside and cyaniding-3,5-diglucoside, into tracts and humans. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1083-1091.
- Moldovan, B; David, L; Chişbora, C; Cimpoiu, C. 2012. Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules* 2012, 17: 11655-11666.
- Nunes, MCN. 2008. Color atlas of quality of fruits and vegetables, 2a ed. USA: Blackwell Publishing.
- Ohgami, K; Ilieva, I; Shiratori, K; Koyama, Y; Jin, XH; Yoshida, K. 2005. Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46, 275-281.
- Olaya, C. 2009. Stability of anthocyanins from *Rubus glaucus* Benth and *Solanum betaceum* Cav. dark-red strain as affected by temperature, storage time and water activity. *Acta Biológica Colombiana* 14 (3): 141-156.
- Ordaz, A. 1999. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh.) anthocyanins, *Food Chemistry*: 65(2), 201-206.
- Ottesaater, G. 1999. Coloring of Food, Drugs and Cosmetics. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.
- Owusu, A. 2005. Chemistry Postharvest. En: Introduction to Food Chemistry. Primera Edición. Editorial CRC Press. United States of America. P. 219.
- Pereira Kechinski, C. 2010. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Food Science*, 75: 173-176.
- Poo, B. 2005. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nanofiltración. Tesis de Licenciado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Austral de Chile. Chile.

- Prado-Lobato, SC. 2012. Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. *Pediatría de México*, 14: 172-175.
- Provenzi, G. 2006. Estabilidad de Antocianinas de Uvas Cabernet Sauvignon con  $\beta$ - e  $\gamma$ -Ciclodextrinas. *Braz. J. Food Technol.* 9 (3): 165-170.
- Rein, M. 2005. Copigmentation reactions and color stability of Berry anthocyanins. Academic dissertation. University of Helsinki. department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division, 87 pp.
- Restrepo Gallego, M. 2007. Sustitución de colorantes en alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4: 35-39.
- Riva, R. 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current science*, 92: 916-925.
- Rodriguez, L; Wolstrad, R. 2001. Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Romojaro, F. 1996. Nuevas tecnologías de conservación de frutas y hortaliza: Atmósfera modificadas Ed. Mundi-prensa.
- Sánchez-Moreno, C. 2002. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. *Actividad antioxidante. Alimentaria.*, ene-feb: 29-40.
- Shukitt-Hale, B; Galli, RL; Meterko, V; Carey, A; Bielinski, DF; Mcghie, T. 2005. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and stress. *Age the Journal of American Aging Association*, 27(1), 49-57.
- Siva, R. 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*, 92: 916-925.
- Springob, K; Nakajima, JI; Yamazaki, M; Saito, K. 2003. Recent advances in the Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins. *Nat Prod Rep.* 20:288-303.



- Stleger, AS; Cochrane, AL; Moore, F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wines. *Lancet*, 1, 1017-1020.
- Stintzing, FC; Stintzing, AS; Carle, R; Frei, B; Wrolstad, RE. 2002. Color and antioxidant properties of cyaniding-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6172-6181.
- Tristan, F; Kraft, B; Schmidt, BM; Yousef, GG; Knigh, CTG; Cuendet, M. 2005. Chemopreventive potential of wild lowbush blueberry fruits in multiple stages of carcinogenesis. *Journal of Food Science*, 70(3), S159-S166.
- Vargas-Simón, G; Soto-Hernández, RM; Rodríguez-González, MT. 2002. Análisis preliminar de antocianinas en frutos de icaco (*Chrysobalanus icaco* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25:261-264.
- Vourela, S; Kreander, K; Karonen, M; Nieminen, R; Hamalainen, M; Galkin, A. 2005. Preclinical evaluation of rapessed, raspberry and pine bark phenolics for health related effects. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53(15), 5922-5931.
- Wang, J; Mazza, G. 2002. Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN gamma-activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 850-857.
- Wang, SY; Jiao, H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5677-5684.
- Wang, SY; Lin, HS. 2000. Antioxidant activity in fruit and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry is affected by cultivar and maturity. *J Agric Food Chem.*; 48:140-146. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 140-146.
- Wang, WD; Xu, SY. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*. 82: 271-275.

Wrolstad, RE. 2004. Acylated anthocyanin from edible sources and their applications in food systems. *Biocheml eng*, 217-225 pp

Wrolstad, RE. 2000. Anthocyanins. In: Lauro Gj, Francis Fj, editors. *Natural Food colorants*. New York, 237-252 pp.

Yean-Yean, S; Barlow, PJ. (2004). Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit sedes. *Food Chemistry*, 88: 411-417.

Youngson, R. 2004. ¿Qué son los radicales libres? En: *Antioxidantes y radicales libres*. Madrid: Acribia.

## ANEXOS

### ANEXO 1. RECEPCIÓN DE LA MATERIA PRIMA, ETAPAS PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS.



Figura 11. Materia prima

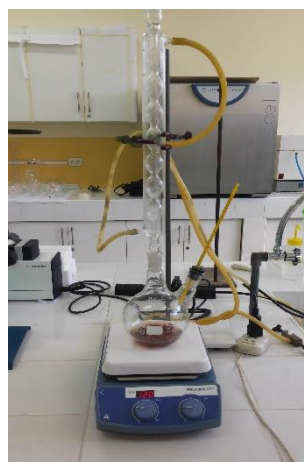
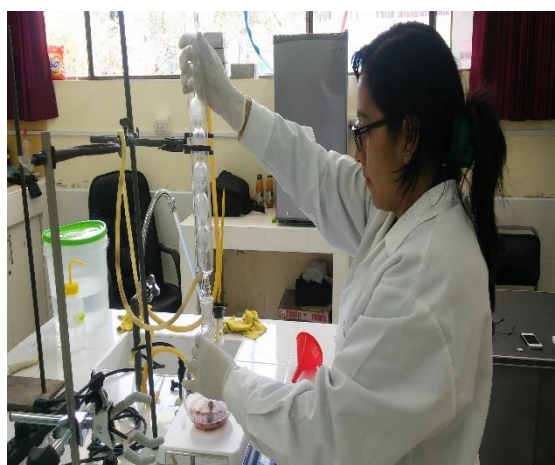
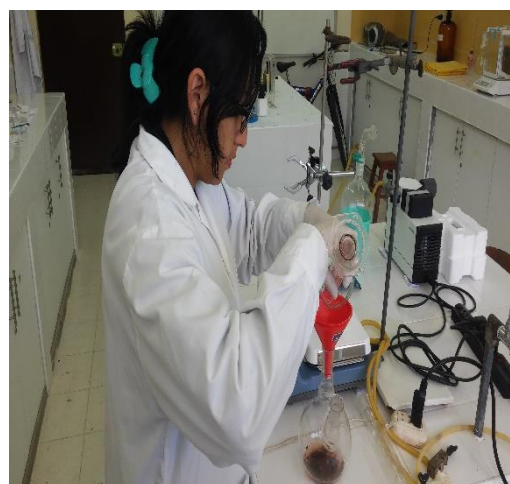
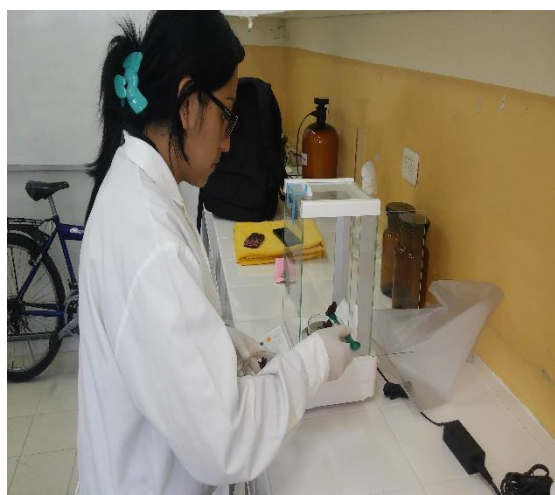


Figura 12. Extracción de antocianinas

## ANEXO 2. PROCESO DE CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS.

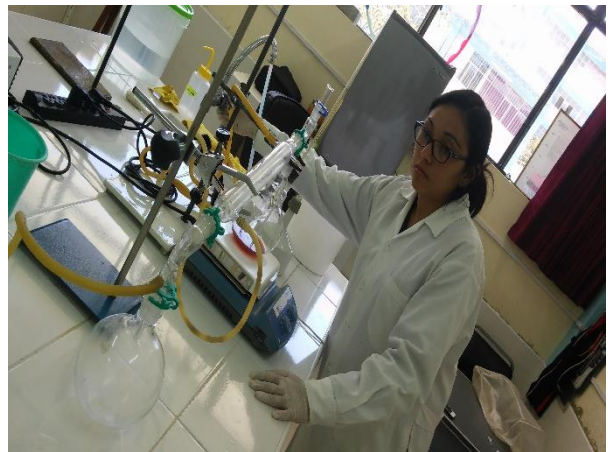
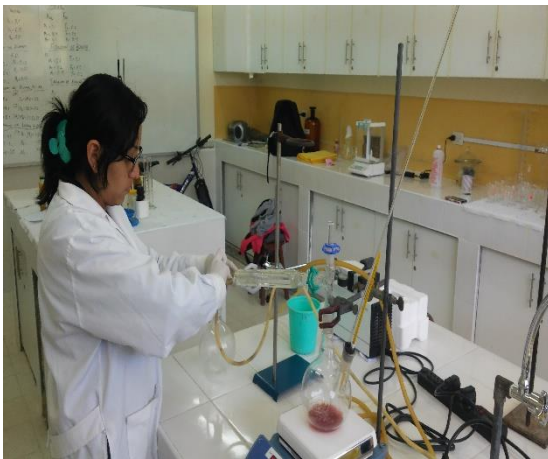
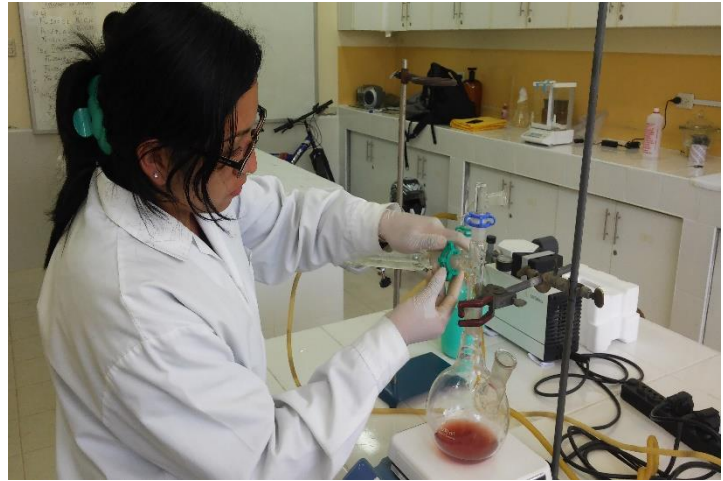


Figura 13. Concentración de antocianinas

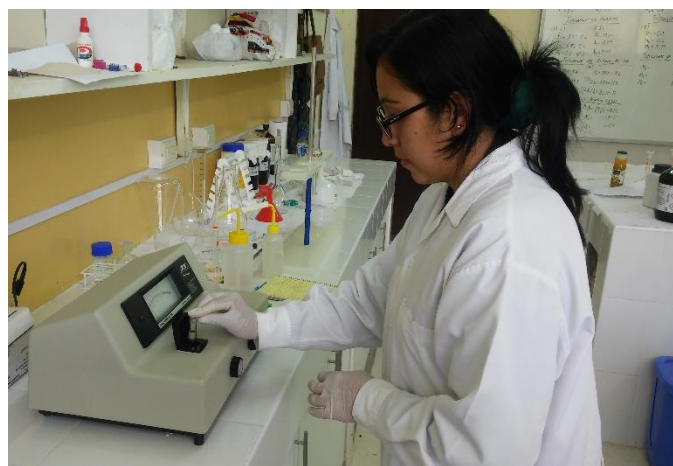
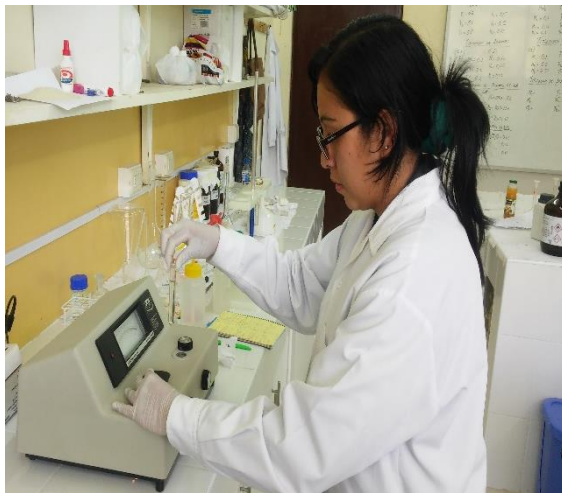
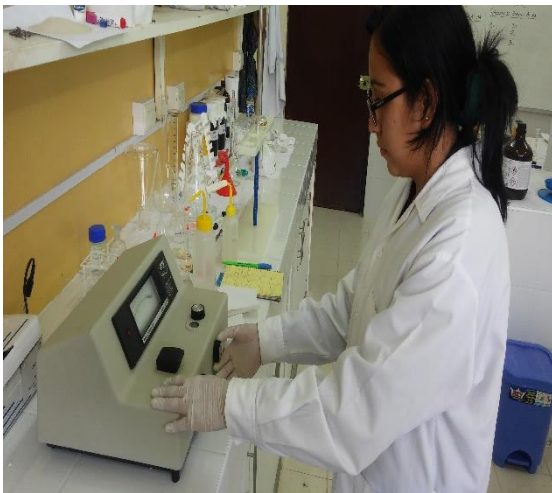
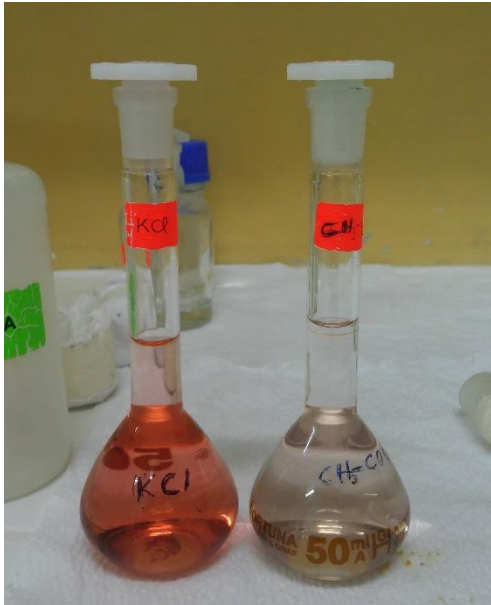


### ANEXO 3. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES



Figura 14. Preparación de las soluciones

**ANEXO 4. ANÁLISIS DE CONTENIDO DE ANTOCIANINAS, LECTURA DE LA ABSORBANCIA - ESPECTROFOTÓMETRO**



**Figura 15.** Lectura de la absorbancia - Espectrofotómetro