

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



Presentado por

Br. CARMEN ETHEL PACHECO LLAMOCCA.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus urticifolius Poir.*)

Asesor:

PhD. FLORENTINO LÁZARO MENDOZA MARÍN

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

ANDAHUAYLAS – APURÍMAC – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus urticifolius Poir.*)

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Presentado por

Br. CARMEN ETHEL PACHECO LLAMOCCA.

Asesor:

PhD. FLORENTINO LÁZARO MENDOZA MARÍN

ANDAHUAYLAS – APURÍMAC – PERÚ

2019



APROBACION DEL ASESOR

Quién suscribe:

PhD. Florentino Lázaro, Mendoza Marín, por la presente:

CERTIFICA,

Que, el Bachiller en Ingeniería Agroindustrial Carmen Ethel Pacheco LLamocca, ha culminado satisfactoriamente el Informe Final de Tesis intitulado: "INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus urticifolius Poir*)" para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

Andahuaylas, 23 de diciembre del 2019.

PhD. Florentino Lázaro, Mendoza Marín.

Asesor

Bach. Carmen Ethel Pacheco LLamocca.

Tesista



FACULTAD DE INGENIERIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL


ACTA DE SUSTENTACION
DE TESIS


En la Av. 28 de julio N° 1103 del Local Académico SL02 (Santa Rosa) en el Salón de Grados de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional José María Arguedas ubicado en el distrito de Talavera de la Reyna de la Provincia de Andahuaylas, siendo las 16:00 horas del día jueves 12 de diciembre del año 2019, se reunieron los docentes: Mg. Denis Hernán Gutiérrez Martínez, Ing. Juvenal Rivas Leguía, Mg. Dianeth Campos Buleje, en condición de integrantes del Jurado Evaluador del Informe Final de Tesis intitulado: "INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL PH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*RUBUS URTICIFOLIUS POIR*)", cuyo autora es la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **CARMEN ETHEL PACHECO LLAMOCCA**, el asesor Dr. Florentino Lázaro Mendoza Marín con el propósito de proceder a la sustentación y defensa de dicha tesis.

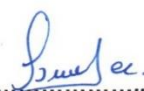
Luego de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Evaluador **ACORDÓ: APROBAR** por **UNANIMIDAD** a la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial **CARMEN ETHEL PACHECO LLAMOCCA**, obteniendo la siguiente calificación y mención:

Nota escala vigesimal		Mención
Números	Letras	
14	CATORCE	BUENO

En señal de conformidad, se procedió a la firma de la presente acta en 03 ejemplares.


Mg. Denis Hernán Gutiérrez Martínez
Presidente del Jurado Evaluador


Ing. Juvenal Rivas Leguía
Primer Miembro del Jurado Evaluador


Mg. Dianeth Campos Buleje
Segundo Miembro del Jurado Evaluador



APROBACIÓN DEL JURADO DICTAMINADOR

LA TESIS: "INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL PH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*RUBUS URTICIFOLIUS POIR*)"; para optar el Título Profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, ha sido evaluado por el Jurado Dictaminador conformado por:

PRESIDENTE: MG. DENIS HERNÁN GUTIÉRREZ MARTINEZ

PRIMER MIEMBRO: ING. JUVENAL RIVAS LEGUÍA

SEGUNDO MIEMBRO: MG. DIANETH CAMPOS BULEJE

Habiendo sido aprobado por UNANIMIDAD, en la ciudad de Talavera el día 12 del mes de diciembre de 2019

Andahuaylas, 17 de diciembre de 2019.

Atentamente

MG. DENIS HERNÁN GUTIÉRREZ MARTINEZ
PRESIDENTE DEL JURADO DICTAMINADOR

ING. JUVENAL RIVAS LEGUÍA
PRIMER MIEMBRO DEL JURADO DICTAMINADOR

MG. DIANETH CAMPOS BULEJE
SEGUNDO MIEMBRO DEL JURADO DICTAMINADOR



DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD

Yo, Carmen Ethel Pacheco LLamocca, identificado (a) con DNI N° 45171283 de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial **Declaro bajo juramento que la Tesis Titulado:** "INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y EL pH EN LA ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS DE LOS FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus urticifolius Poir.*)".

Es auténtico y no vulnera los derechos de autor. Además, su contenido es de entera responsabilidad del autor de Tesis Titulado, quedando la UNAJMA exenta de toda responsabilidad en caso de atentar contra la Ley de propiedad intelectual y derechos de autor.

Andahuaylas, 23 de diciembre del 2019

Firma

N° DNI: 45171283

E-mail: ethelp0508@outlook.com

N° Celular: 938180543

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir y por estar siempre conmigo acompañándome en cada paso que doy, por iluminar mi mente y haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis queridos padres María Llamocca Fernández y Lizardo Pacheco Pariona, quienes me apoyaron en todo momento y brindaron el apoyo incondicional para lograr mis metas, son ellos quienes me guiaron por el buen camino, por la confianza de siempre y la seguridad de saber que este momento llegaría.

A mis hermanas Diana, Sandra, Ximena y Evelyn por ser parte activa de mis triunfos, compartir alegrías, tristezas y a mi persona favorita Lino Huaraca Solgada por apoyarme y creer en mi.

Carmen Ethel.

AGRADECIMIENTOS

- ✓ En primer lugar, agradezco a Dios por acompañarme todos los días y brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencia y felicidad.
- ✓ A mi alma mater, la Universidad Nacional José María Arguedas, la institución que me formo profesionalmente dentro de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial y en ella a los docentes por transmitirme conocimientos valiosos.
- ✓ A mi asesor al PhD. Florentino Lázaro Mendoza Marín, por la dedicación de su tiempo, orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de la ejecución de mi tesis.
- ✓ A los miembros del Jurado Evaluador MSc. Denis Hernán Gutiérrez Martínez, Ing. Juvenal Rivas Leguía, Mg. Dianeth Campos Buleje; por su paciente dedicación, orientación y sus aportes para el mejoramiento del presente trabajo.
- ✓ También agradecer a todos los docentes que han contribuido en mi formación universitaria.
- ✓ Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis grandes amigos, que siempre estuvieron ahí brindándome sus consejos y a ti por el apoyo para culminar satisfactoriamente este presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiv
ABREVIATURAS	xv
SÍMBOLOS	xvi
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CHUMASQA	xix
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	3
1.1. Problema general.....	3
1.2. Problemas específicos	3
CAPÍTULO II: ANTECEDENTES.....	4
CAPITULO III: MARCO TEÓRICO	8
3.1. Zarzamora (<i>Rubus urticifolius</i> Poir)	8
3.1.1. Clasificación taxonómica	8
3.1.2. Nombre común	8
3.1.3. Característica morfológica	9
3.1.4. Origen.....	10
3.1.5. Zonas de Producción	10
3.1.6. Propiedades nutricionales de la zarzamora	11
3.1.7. Hábitat.....	12
3.1.7.1. Condiciones edáficas y clima.....	13
3.2. Antocianinas.....	13
3.2.1. Estructura química de las antocianinas	15
3.3. Origen de las antocianinas.....	16
3.4. Clasificación de antocianinas	16
3.5. Color y estabilidad de las antocianinas	17
3.6. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas.....	19
3.7. Fuentes naturales de antocianinas.....	24
3.8. Beneficios en la salud	26
3.9. Degradación de antocianinas.....	27

3.10.	Extracción de las antocianinas	27
3.10.1.	Extracción Sólido – líquido.....	27
3.11.	Rendimiento	28
3.11.1.	Factores que afectan el rendimiento de extracción	28
3.11.2.	Solventes para la extracción.....	29
3.11.3.	Factores que influyen en la extracción.....	30
3.12.	Importancia de antocianinas	30
3.13.	Espectrofotometría	30
3.13.1.	Parámetros de medición.....	31
3.14.	Determinación de antocianinas en forma total	32
3.15.	Determinación del contenido de antocianinas.....	32
3.15.1.	Método de pH diferencial para antocianinas totales.....	33
3.15.2.	Cuantificación de antocianinas por pH diferencial.....	33
3.15.3.	Evaluación de la absorbancia	34
3.16.	Cinética de las reacciones químicas.....	34
3.16.1.	Constante de velocidad de degradación (k).....	35
3.17.	Orden de reacción	35
3.17.1.	Reacción de orden cero.....	35
3.17.2.	Reacción de primer orden.....	35
3.18.	Modelo de Arrhenius.....	35
3.18.1.	Gráfico de Arrhenius	36
3.19.	Energía de activación (E_a).....	36
3.20.	Análisis de regresión.....	37
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		38
4.1.	Lugar de ejecución	38
4.2.	Material de estudio	38
4.2.1.	Población y muestra	38
4.2.1.1.	Universo y/o población	38
4.2.1.2.	Muestra	38
4.2.2.	Unidad de análisis	38
4.3.	Equipos, instrumentos, materiales, reactivos e insumos.....	39
4.4.	Metodología experimental	41
4.4.1.	Extracción de antocianinas.....	41
4.4.1.1.	Acondicionamiento de muestras.....	43

4.4.2. Determinación del rendimiento de extracción.....	44
4.4.3. Determinación del contenido de antocianinas totales (CAT) mediante el método pH diferencial	45
4.4.4. Determinación de Energía de activación (E_a).....	49
4.5. Diseño experimental	50
4.5.1. Matriz para el diseño factorial mixto 7 x 3 x 3	50
4.5.2. Análisis estadístico	52
4.5.2.1. Hipótesis.....	53
4.5.3. Prueba de hipótesis.....	54
4.6. Diseño experimental (variables).....	55
CAPÍTULO 5: RESULTADOS	56
5.1. Determinando el rendimiento de extracción.....	56
5.2. Determinación de la estabilidad de antocianinas	56
5.2.1. Análisis de varianza (ANOVA).....	58
5.3. Hallando contenido de antocianinas totales (CAT)	59
5.3.1. Concentración de antocianinas totales (CAT) a 0 °C y pH 3	61
5.3.1.1. Constante de velocidad de degradación a 0 °C y pH 3	61
5.3.2. Concentración de antocianinas totales (CAT) a 10 °C y pH 3	62
5.3.2.1. Constante de velocidad de degradación a 10 °C y pH 3	62
5.3.3. Concentración antocianinas totales (CAT) a 20 °C y pH 3.....	63
5.3.3.1. Constante de velocidad de degradación a 20 °C y pH 3	64
5.4. Determinación de la Energía de activación (E_a)	64
5.4.1. Energía de activación para el extracto a pH 3	64
5.4.1.1. Grafica de Arrhenius (LN k versus 1/ T).....	65
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN	67
6.1. Rendimiento de extracción	67
6.2. Estabilidad de antocianinas	67
6.3. Concentración antocianinas totales (CAT).....	68
6.4. Energía de activación (E_a).....	69
CONCLUSIONES	70
RECOMENDACIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la zarzamora.	12
Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes bayas.....	25
Tabla 3. Color y distribución de antocianinas en algunas frutas y vegetales.....	25
Tabla 4. Contenido de antocianinas totales en algunas frutas.....	25
Tabla 5. Equipos	39
Tabla 6. Materiales.....	39
Tabla 7. Reactivos	40
Tabla 8. Insumos.....	40
Tabla 9. Material vegetal	40
Tabla 10. Matriz de diseño experimental.	51
Tabla 11. Rendimiento de extracción.	56
Tabla 12. Resultado de lectura de las absorbancias	56
Tabla 13. Análisis de varianza.....	58
Tabla 14. Antocianinas totales	59
Tabla 15. Concentración antocianinas totales (CAT).....	61
Tabla 16. Concentración antocianinas totales (CAT).....	62
Tabla 17. Concentración antocianinas totales (CAT).....	63
Tabla 18. Energía de activación para el extracto a pH 3	65
Tabla 19. Energía de activación a diferentes pH	66
Tabla 20. Concentración antocianinas totales (CAT).....	85
Tabla 21. Concentración antocianinas totales (CAT).....	86
Tabla 22. Concentración antocianinas totales (CAT).....	87
Tabla 23. Concentración antocianinas totales (CAT).....	88
Tabla 24. Concentración antocianinas totales (CAT).....	89
Tabla 25. Concentración antocianinas totales (CAT).....	90
Tabla 26. Energía de activación para el extracto a pH 4	91
Tabla 27. Energía de activación para el extracto de zarzamora a pH 5	92

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Flores de zarzamora	9
Figura 2. Frutos de zarzamora	10
Figura 4. Estructura básica de antocianinas.	16
Figura 5. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.	17
Figura 6. Estructuras de las antocianinas a diferentes valores de pH.	20
Figura 7. Estructuras químicas de antocianinas basadas en el pH.	21
Figura 8. Diagrama de flujo para la obtención del extracto.	41
Figura 9. Diagrama de flujo para el acondicionamiento de las muestras.	43
Figura 10. Diagrama de flujo para el rendimiento de extracción.	45
Figura 11. Diagrama de flujo para la determinación de concentración.	47
Figura 12. Diagrama de contrastación y variables	55
Figura 13. Grafica de efectos principales para estabilidad de antocianinas.	59
Figura 14. Grafica de la concentración (mg / L) versus tiempo (h).....	62
Figura 15. Concentración (mg / L) versus tiempo.	63
Figura 16. Concentración (mg / L) versus tiempo.	64
Figura 17. Grafica de Arrhenius para la determinar energía de activación.	65
Figura 18. Grafica de la concentración (mg / L) versus tiempo (h).....	85
Figura 19. Concentración (mg / L) versus tiempo.	86
Figura 20. Concentración (mg / L) versus tiempo.	87
Figura 21. Concentración (mg / L) versus tiempo	88
Figura 22. Concentración (mg / L) versus tiempo	89
Figura 23. Concentración (mg / L) versus tiempo	90
Figura 24. Grafica de Arrhenius para la determinar energía de activación.	91

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Panel fotográfico de los frutos de zarzamora.....	80
Anexo 2. Panel fotográfico de la selección de los frutos de zarzamora.	80
Anexo 3. Panel fotográfico de la extracción de antocianinas	81
Anexo 4. Panel fotográfico de la extracción y acondicionamiento.....	81
Anexo 5. Panel fotográfico de filtrado y centrifugado.....	82
Anexo 6. Panel fotográfico de medición de pH y acondicionamiento.....	82
Anexo 7. Panel fotográfico de la lectura (absorbancia) en el espectrofotómetro.	83
Anexo 8. Panel fotográfico de la medición de pH para antocianinas totales.	83
Anexo 9. Grafica de interacción para la absorbancia.....	84
Anexo 10. Contenido antocianinas totales (CAT) a pH 4	85
Anexo 11. Concentracion antocianinas totales (CAT) a pH 5	88
Anexo 12. Energía de activación a pH 4.....	91
Anexo 13. Energía de activación a pH 5.....	92
Anexo 14. Constancia del traductor del resumen al idioma quechua.....	93
Anexo 15. Matriz de consistencia.....	94

ABREVIATURAS

A	: Absorbancia.
AT	: Antocianinas totales.
ANOVA	: Análisis de varianza.
Cap	: Capacidad
DPHH	: Radical libre 1,1 – Difenil – 2 – Picrilhidrazilo.
ESL	: Extracción solido líquido.
EF	: Extracción por fermentación.
FD	: Factor de dilución.
FT	: Fenoles totales.
K	: Constante de velocidad de degradación.
msnm	: Metros sobre el nivel del mar.
MPS	: Materia prima solvente.
pH	: Potencial de hidrogeniones.
PM	: Peso molecular.
ppm	: Partes por millón.
R	: Rendimiento.
rpm	: Revoluciones por minuto.
RMN	: Resonancia magnética nuclear
UV	: Ultravioleta.

SÍMBOLOS

cm	: Centímetro.
°C	: Grados centígrados
ϵ	: Coeficiente de extinción molar.
g	: Gramos.
KCl	: Cloruro de potasio.
kg	: Kilogramos.
HCl	: Ácido clorhídrico.
L	: Litros.
Meq. ácido	: Mili equivalente del ácido cítrico.
m	: Metro
mm	: Milímetros.
mg	: Miligramos.
NaOH	: Hidróxido de sodio.
nm	: Nanómetros.
%	: Porcentaje.
t	: Tiempo
T	: Temperatura

RESUMEN

El presente trabajo de investigación presento como objetivo general evaluar la influencia de la temperatura y pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), para evaluar la influencia de la temperatura y pH en un periodo de tiempo en la estabilidad se utilizó la metodología propuesta por Fuentes 2005.

Se aplicó un diseño experimental mixto 7 x 3 x 3; tres factores tiempo (7 niveles), temperatura y pH cada uno con 3 niveles, valores de tiempo (0,5,10,15,20,25 y 30 días), temperatura (0, 10 y 20 °C) y pH (3, 4 y 5) realizándose en total 63 tratamientos. Luego de haber realizado la extracción de antocianinas de los frutos de zarzamora, se determino el rendimiento en el zumo de los frutos. Seguido de ello se realizó lecturas de absorbancia (nm) utilizando espectrofotómetro UV – vis cada 5 días durante 30 días, a partir de estos datos se evaluó la influencia de los factores en la estabilidad. Seguido de ello determinamos las antocianinas totales mediante el método del pH diferencial metodología propuesta por Giusti y Wrolstad, 2001.

El resultado que obtuvimos del rendimiento de extracción fue de 62,890 % en zumo de los frutos de zarzamora. Los resultados obtenidos después de la evaluación de la estabilidad de las antocianinas fueron que los factores tiempo y temperatura tienen influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora, ya que se obtuvo un valor $-p < 0,05$ así como para la interacción lineal AB, por lo que se rechazaron la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alterna. Sin embargo, para el factor pH el efecto fue contrario ya que se obtuvo un valor $-p > 0,05$ y por ende se aceptó la hipótesis alterna y se rechazó la hipótesis nula, de ello se dedujo que no tiene influencia en la estabilidad de las antocianinas. De acuerdo a los resultados obtenidos en la concentración (antocianinas totales) fue de que a menor temperatura se tiene menor degradación y a mayor temperatura mayor degradación de antocianinas, finalmente determinamos la energía de activación para los diferentes pH: a pH 3 $E_a = 16,99$ kJ / mol, pH 4 $E_a = 51,48$ kJ / mol y pH 5 a $E_a = 13,77$ kJ / mol en el extracto de zarzamora.

PALABRAS CLAVES: *Rubus urticifolius Poir*, zarzamora, antocianinas, rendimiento, estabilidad, antocianinas totales (concentración), energía de activación.

ABSTRACT

The present research work presented as a general objective to evaluate the influence of temperature and pH over a period of time on the stability of anthocyanins of blackberry fruits (*Rubus urticifolius Poir*), to evaluate the influence of temperature and pH in a period of time in stability the methodology proposed by Fuentes 2005 was used. A mixed experimental design 7 x 3 x 3 was applied; three factors time (7 levels), temperature and pH each with 3 levels, time values (0,5,10,15,20,25 and 30 days), temperature (0,10 and 20 °C) and pH (3, 4 and 5) with a total of 63 treatments. After having carried out the extraction of anthocyanins from the blackberry fruits, the yield in the fruit juice was determined. Following this, absorbance readings (nm) were performed using UV-vis spectrophotometer every 5 days for 30 days, from this data the influence of the factors on stability was evaluated. Following this, we determine the total anthocyanins using the differential pH method proposed by Giusti and Wrolstad, 2001.

The result we obtained from the extraction yield was 62,890 % in juice of the blackberry fruits. The results obtained after the evaluation of the anthocyanin stability were that the time and temperature factors influence the anthocyanin stability of the blackberry fruits, since a value - $p < 0.05$ was obtained as well as for the interaction linear AB, so the null hypothesis was rejected and the alternate hypothesis was accepted. However, for the pH factor the effect was opposite since a value - $p > 0.05$ was obtained and therefore the alternative hypothesis was accepted and the null hypothesis was rejected, it was deduced that it has no influence on the stability of anthocyanins According to the results obtained in the concentration (total anthocyanins) it was that at a lower temperature there is less degradation and at a higher temperature greater degradation of anthocyanins, we finally determined the activation energy for the different pH: at pH 3 $E_a = 16,99$ kJ / mol, pH 4 $E_a = 51.48$ kJ / mol and pH 5 at $E_a = 13.77$ kJ / mol in the blackberry extract.

KEY WORDS: *Rubus urticifolius Poir*, blackberry, anthocyanins, yield, stability, total anthocyanins (concentration), activation energy

CHUMASQA

Kay llamkay taqwiri y qatipaymi churakurqa hatun aypayman chaypaqmi qatipakurqa imaynatam churapakun quñiriynin hinaspa pH huk chanin pachapi takyapakusqanta chay antocianinasnisqa zarzamorapa rurunkunapi (*Rubus urticifolius Poir*), churapakuyninta tupunapaqmi chay quñiriyninta hinaspa pH huk chanin pachapi takyapakusqanta qatikurqa Fuentespa yachay churasqanmanhina 2005.

Chay ruraymi chantakurqa qawachiy mixtonisqa 7 x 3 x 3; kimsa qatipay pachapi (7 patara sayaynin), quñiriynintaq hinaspa pH nisqa sapakama 3 patara sayaywan, pachapa puriyintaq (0,5,10,15,20,25 hinaspa 30 punchawpi), quñiriynintaq (0, 10 hinaspa 20 °C) chaynataq pH (3, 4 hina 5) rurakurqa huntasqa 63 allinchayta. Chaymanta chuyman rurakurqa chay antocianinasnisqa zarzamoranasqapa rurunmanta, qawarikurqa yaku chuymasqa rurukunapi atiyin. Qatinqinpi rurakurqa ñawinchariy chakiriyninta (nm) chay espectrofotómetronisqawan UV – vis sapa 5 punchawmanta 30 punchawkama, chay qawachiykunamanta qatipakurqa churapakuyninta sayapakuyninpi qatinqinpi qawakurqataq antocianinasnisqa llapanta chay qatipaypa rikchaq pH churasqan kay yachay Giusti hinaspa Wrolstad, 2001.

Ruruynin taripayman aypakurqa imaynatachus kallpanchakun sumun hurqusqa chay 62,890 % añawi zarzamorapa rurunmanta. Chayakurqaqmi urquyman chay qatipakuypa chawpinta antocianinaspa taqyasqanta qawakurqa pacha risqanpi hinaspa quñiriyninta imaynata churapakun takyapakunanpaq antocianinasnisqapa añawi zarzamoranasqapa rurunmanta, chayqa urqukurqa huk chaninchayninta – $p < 0,05$ chaynataq imaynatachus atipankunqa AB, ichaqa chaypaqmi qipanchakurqa rimariypi chaninchayninta chusaqman, hinaspa allinmi kanqa nikurqa huknin sayapakuq rimariyta, ichaqa, chay yaykupakuq pH chaypaqmi sasakarqa, ichapas urqukurqa huk chaninchay – $p > 0,05$ chayraykum chaskisqa karqa huknin ñawpaq kaq rimariy, qipanchasqataq chusaqkaq ñawpaq rimariy, chaymi rimariyman chayakurqa manam kanchu yanapakuynin allin taqyapakunanpaq chay antocianinasnisqapa. Chay churakuyninmanhina urqusqa rikukurqa tinkuynin (llapan antocianinasnisqa) rikukurqa pisi quñiriypim pisi hukmanyariy, ichaqa nisyu quñiriypitaq yapakurqa hukmanyaynin chay antocianinasnisqa, tukupayninpi churakurqa micha rupapakuyninta huk niraq

qawachiykunapi pH: a pH 3 $E_a = 16,99$ kJ / mol, pH 4 $E_a = 51,48$ kJ / mol y pH 5 a $E_a = 13,77$ kJ / mol chuymasqa chay añawi zarzamoranisqapi.

Pisi rimayllapi riqsichiy simi: *Rubus urticifolius* Poirnisqa, añawi zarzamoranisqa, antocianinasnisqa, atikuynin, takyapakuynin, llapa antocianinasnisqa (tinkuy), micha kawsarichiy.

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β – glucosídico.

La zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), es considerada como una fuente potencial de antocianinas, la caracterización de esta fruta es la abundancia de pigmentos naturales (antocianinas), que además de conferirle su color y sabor característico, tienen acción antioxidante y por tanto neutralizan los radicales libres evitando los efectos dañinos en el organismo.

Las antocianinas presentan serios inconvenientes relacionados a su estabilidad, ya que en solución ellas son afectadas por el pH, la temperatura, luz y la presencia de otros flavonoides.

El objetivo general de esta investigación fue evaluar la influencia de la temperatura y el pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*).

Se tuvieron como objetivos específicos:

- ✓ Determinar el rendimiento de extracción de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*).
- ✓ Determinar la concentración de antocianinas por efecto de diferentes temperaturas y pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*).
- ✓ Determinar la energía de activación por efecto de diferentes temperaturas y pH en un periodo de tiempo de las antocianinas de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*).

Este trabajo está estructurado en seis capítulos, los cuales se detallan a continuación:

- ✓ En el primer capítulo se expone el problema de investigación.
- ✓ En el segundo capítulo trata de los antecedentes de la investigación, se revisa investigaciones anteriores relacionadas con la estabilidad de antocianinas.
- ✓ En el tercer capítulo se expone el marco teórico, los cuales son conceptos de temas tratados en esta investigación.
- ✓ En el cuarto capítulo se detalla las metodologías empleadas para lograr los objetivos, en ello se detalla el paso a paso de los procedimientos experimentales y estadísticos.
- ✓ En el quinto capítulo se expone los resultados obtenidos de la investigación.
- ✓ Y en el sexto capítulo se expone las discusiones, las cuales se discuten los mismos con bibliografías revisadas.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La zarzamora es un fruto silvestre que presenta una coloración negra, con una creciente demanda, el mayor productor de zarzamora en el mundo es México, con tres mil setecientas cincuenta hectáreas y una producción de treinta mil toneladas por año, de las cuales el noventa por ciento se exporta a Estados Unidos, Europa y Japón. En el Perú, se han identificado algunas zonas de producción por ejemplo en el departamento de Huancavelica (Pampas, Surcobamba, Sambocache, San Antonio, Huachocolpa, Tintay punco), Huánuco, Ayacucho, Apurímac y en la sierra de lima entre otros lugares.

El Distrito de Ranracancha de la Provincia de Chincheros, dentro de su ecosistema presenta diferentes frutos silvestres y uno ellos es la zarzamora, el cual es consumido por los pobladores de la zona en forma natural y otras veces procesados como mermelada o como colorante en bebidas. Los frutos coloreados presentan compuestos bioactivos debido a su contenido de antocianinas y siendo responsable de la capacidad antioxidante, no obstante, la estabilidad de las antocianinas depende de factores físicos y químicos en el fruto natural o durante su procesamiento. Entre los pigmentos naturales de interés para la industria alimentaria, están las antocianinas que se podrían utilizar como aditivo alimentario, es por ello el interés de estudiar su estabilidad. Sin embargo, existen inconvenientes relacionados a su estabilidad, ya que en solución ellas son afectadas por la luz, cambios de pH, temperatura de almacenamiento, oxidación, presencia de otros flavonoides, por ello se plantean los objetivos ya antes mencionados.

1.1. Problema general

- ✓ ¿Cuál es el efecto de la temperatura y el pH en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)?

1.2. Problemas específicos

- ✓ ¿Cuál es el rendimiento de extracción de los frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)?
- ✓ ¿Cuál es el efecto de temperatura y pH en el contenido de antocianinas (concentración) de los frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)?
- ✓ ¿Cuál es la energía de activación a diferentes temperaturas y pH de las antocianinas de los frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)?

CAPÍTULO II: ANTECEDENTES

Huarancca (2019), el objetivo de esta investigación fue estudiar la cinética de degradación de las antocianinas en extractos alaybili (*Vaccinium floribundum* Kunth) y macha macha (*Gaultheria glomerata* (Cav.) Sleumer). La degradación térmica de las antocianinas, fueron evaluadas a temperaturas 30, 40, 50 y 60 °C utilizando modelos de orden cero, primer orden y segundo orden, así mismo utilizaron el modelo de Arrhenius para evaluar la dependencia de la velocidad de degradación con respecto a la temperatura. Los resultados obtenidos en la degradación de las antocianinas fueron evaluados para cada temperatura, siguieron una cinética de primer orden con alta correlación en extracto alaybili ($R^2 = 0,9943$; $0,9909$; $0,9882$ y $0,9749$) y macha macha ($R^2 = 0,9873$; $0,9989$; $0,9981$ y $0,9978$). Además, se determinaron que las antocianinas se degradan a menor velocidad y a temperatura más baja 30 °C. Así mismo, a partir de las constantes de velocidad determinaron las energías de activación $Ea = 13,783$ kcal / mol y $Ea = 15,223$ kcal / mol de alaybili y macha macha, respectivamente.

Torres y Pulgar (2017), el objetivo fue extraer el pigmento del mortiño y evaluar su estabilidad como colorante en la industria alimentaria. Aplicaron la extracción sólido-líquido, emplearon como solvente etanol a 96° con una concentración de ácido cítrico en relación peso / volumen del 0.03% y evaluaron la estabilidad del pigmento de mortiño (*Vaccinium meridionale*) como colorante en la industria alimentaria, estudiaron su estabilidad teniendo en cuenta variables como: temperatura (4, 14 y 68 °C), pH (4, 5 y 6), ambientes de almacenamiento (luz, oscuridad) durante cuatro semanas. Los resultados que obtuvieron fue que las variables influenciaron significativamente en el pigmento, la degradación de las antocianinas aumento con el incremento de temperatura, manteniéndose estable a bajas temperaturas, con respecto al pH, el efecto fue contrario, a menor pH, es más estable y a pH superior se decolora, la exposición a la luz afecta la estabilidad, siendo más estable a condiciones de oscuridad.

Torres y Vidaurre (2015), estudiaron el estudio cinético de degradación a una bebida funcional a base de arándanos (*Vaccinium myrtillus*) edulcorado con stevia a temperatura de 30, 40 y 50 °C utilizando modelos de orden cero y primer orden; donde evaluaron el modelo de Arrhenius para evaluar la dependencia de la velocidad de degradación con respecto a la temperatura. La concentración de compuestos

fenoles es de 1299 mg de ácido gálico / L, y en antocianinas 61 mg cianidina – 3 – glucósido / L. Su degradación de los dos compuestos estudiados, llevaron una cinética de primer orden con una energía de activación de 13,4571 kcal /mol para fenoles y 12,7957 kcal /mol para antocianinas. Además, evaluó la degradación de dichos compuestos en la bebida sin stevia y con stevia a 50 °C, obteniendo como resultado, que con stevia los compuestos bioactivos incrementan y se conservan.

Zapata (2014), determino la influencia de las principales variables de proceso en la extracción, tipo de solvente y proporción de materia prima / solvente (MP / S), evaluó dos metodologías de extracción: extracción sólido – líquido (ESLA) y extracción por fermentación (EAF), en ello se observó que todas las variables estudiadas tuvieron influencia significativa en la extracción de antocianinas de arándanos (*Vaccinium myrtillus*), en cuanto al pH hay un efecto contrapuesto. Así cuanto menor es el pH, mas se ve favorecida la estructura del catión flavilio (forma mas estables de las antocianinas). A pH 5 se ve favorecida la formación de especies pseudobase carbinol que son incoloras. Con respecto al método de extracción, la extracción sólido líquido fue con la que se logró un rendimiento con mayor estabilidad de las antocianinas; además, obtuvo un valor de energía de activación de $E_a = 51,60$ kJ / mol en el sistema de extracción sólido – líquido y $E_a = 61,94$ kJ / mol en el sistema de extracción por fermentación.

Chávez (2014), determino la cinética de degradación de las antocianinas, y para ello evaluó la estabilidad a la temperatura (60,70,80 y 90 °C) y al pH (3,4,5,6, y 7) de los tres extractos: camote morado (*Ipomoea batatas*), el rábano (*Raphanus sativus*) y la campanilla roja (*Ipomoea purpurea*), en ello comprobó que al aumentar la temperatura y el pH de las antocianinas son menos estables ya que el valor de la constante de rapidez aumenta y el tiempo de vida media disminuye. Concluyo que de los tres extractos, el de rábano es el mas estable ya que sus valores de constante de rapidez fueron los menores y los de tiempo de vida media los mayores, mientras que el extracto de camote es el menos estable.

Aroni (2013), tuvo como objetivo evaluar la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de Capachu, Huancachu, Cheqche y Alaybili frente al pH (3,4 y 5) y temperatura (10,20 y 30 °C). Los resultados que obtuvo después de la evaluación de la estabilidad de las antocianinas, es que encontró menor variación estabilidad en el fruto Capachu, a una temperatura de 20 °C y pH 3, en 30 días varió en 4.53% la

absorbancia, Huancachu, a una temperatura de 20 °C y pH 5, en 30 días varió en 7.22% la absorbancia, Cheqche, a una temperatura de 20 °C y pH 3, en 30 días varió en 2.58 % la absorbancia y Alaybilí, a una temperatura de 30 °C y pH 5, en 30 días varió en 13.15 % la absorbancia. Consecuentemente la interacción de los dos factores estudiados influyeron significativamente en la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos.

Almeida (2012), dedujo al estudiar la extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (*Zea mays L.*) y determinación de su actividad antioxidante, que las antocianinas, al igual que otros pigmentos de origen natural, son sensibles a la temperatura y el pH. Se determinó que el extracto colorante de las antocianinas del maíz negro permanece estable a rangos de pH 2 – 6 y a temperatura de 10 y 50 °C y el tiempo de vida útil del extracto sólido de las corontas de maíz negro es de 60 días, si se almacena sellado al vacío en envases de color ámbar y en un lugar fresco y seco, a diferencia del extracto líquido, que debido a su elevada actividad de agua se degrada en 30 días.

Farfán (2011), pretendió valorar la extracción y utilización de las antocianinas como aditivo alimentario, a partir de frutas nativas de la región de Apurímac, por lo que su trabajo de investigación tuvo como objetivo obtener dicho colorante y evaluar la influencia de temperatura (15, 30 y 40 °C) y el pH (3.0, 3.5 y 4.5), sobre la cantidad de antocianinas en la etapa de extracción por lixiviación, además evaluó la influencia de la temperatura (180 y 190 °C), y la concentración de encapsulante (3 y 5 %), sobre la cantidad de antocianinas en la etapa del secado por atomización, resultando la más óptima a una temperatura de 180 °C y a 3 % de encapsulante (maltodextrina DE10), otorgando un rendimiento de 11.24 % como producto final en polvo. La concentración de antocianinas que presentaron los frutos de la siraca, como son en la etapa de lixiviación, maduro y la solución concentrada, así como el colorante en polvo fueron expresados en cianidina – 3 – glucosídico / 100 ml de muestra, llegando a concluir que el que tuvo mayor concentración de antocianinas fue el fruto maduro con 76,871 mg / ml de muestra, la solución concentrada con 70,358 mg / ml de muestra, las antocianinas en polvo con 67,964 mg / ml de muestra y 16.21 mg / ml de muestra producto de la lixiviación, obtuvo un rendimiento de 40 % en 1 kg de los frutos de siraca (*Rubus urticifolius Poir*).

Juli y Arias (2011), determinaron el efecto de pH (3.0 y 4.0) y solvente (acetona, etanol) en la extracción sobre el contenido de antocianina, de acuerdo a los resultados del análisis estadístico realizado para ambos clones indica que existen diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05 en el contenido de antocianinas entre los dos solventes, sin embargo existe diferencia significativa en el pH para el clon 304239 y no así para el clon 303851 fueron 0.8044 y 0.1683 mg cy – 3 – glu / g MF respectivamente.

Mandujano (2006), en su investigación tuvo como objetivo establecer las condiciones de extracción y estudiar la estabilidad del pigmento proveniente de la cascara de pitaya (*Stenocereus stellatus*), afirmo que el principal factor que afecto significativamente la estabilidad del pigmento fue la temperatura y degrado casi en su totalidad al pigmento. A mayor temperatura mayor degradación del pigmento. La temperatura de 4 °C retuvo un 40 – 50 % más de pigmento que las de 25 y 68 ° C, que el pH fue otro factor que tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad del pigmento, siendo más estable a pH bajos. El extracto de las cascara de pitaya fue más estable a temperaturas de 4 ° C, con un pH de 5 y en ausencia de luz. Concluyo que el pigmento obtenido del mortiño (*Vaccinium meridionale*) como aditivo colorante en alimentos que mantengan condiciones adecuadas para asegurar su estabilidad, es decir aquellos con pH bajos, almacenados a bajas temperaturas (refrigeración o preferentemente congelados) y protegidos de la luz.

Fuentes (2005), concluyó que se llevó acabo la extracción de los pigmentos presentes y se cuantificaron por medio de espectrofotometría ultravioleta – visible; finalmente evaluó la estabilidad de los pigmentos sometidos a diferentes valores de temperatura (30 y 50°C) y pH (4 y 5) con el fin de determinar a qué temperatura y pH son más estables los pigmentos extraídos; dedujo que únicamente los pigmentos presentes en los frutos de Cereza (*Prunus capulí Cav.*) pH 4 y 5, mora (*Rubus urticae folius Poir*) pH 5 y sauco (*Sambucus canadensis L.*) pH 5, presentan las características para ser utilizadas como alternativas naturales , en bebidas comprendidas en el rango de pH 4 y 5.

CAPITULO III: MARCO TEÓRICO

3.1. Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)

Es un fruto de tamaño pequeño, redondo o ligeramente alargado compuesto por pequeños glóbulos que contienen en su interior una semilla diminuta. Tienden a ser de color negro brillante, tiene propiedades diuréticas, astringentes, anti ulcerosas, fortifica las encías. La zarzamora aporta mucha fibra y pocas calorías, al ser pobre en proteínas y grasas, contiene propiedades medicinales como astringentes, diuréticas, antidiabéticas y hemostáticas (Andrade, Morales y Ortiz, 2006).

La caracterización de esta fruta es la abundancia de pigmentos naturales (antocianinas) que además de conferirle su color y sabor característico, tienen acción antioxidante y por tanto neutralizan los radicales libres evitando los efectos dañinos en el organismo. Para esto será necesario evitar pérdidas de los compuestos químicos durante el procesamiento, lo que conlleve a realizar investigaciones para determinar el grado de conservación de tales compuestos por efecto de las operaciones unitarias a la que se expone la materia prima (Chávez, 2011).

3.1.1. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica lo realizaron en la instalación del herbario de la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional Agraria La Molina.

Reino: Plantae

Orden: Rosales

Familia: Rosaceae

Género: *Rubus L.*

Especie: *Rubus urticifolius Poir.*

Fuente: Herbario de la Facultad de Ciencias Universidad Nacional Agraria La Molina 2011.

3.1.2. Nombre común

La zarzamora es también llamada como: siraca (mora silvestre), la zarza o zarzamora silvestre. Las moras o zarzamoras son comestibles y los diversos colores que adopta dependen del grado de maduración que tenga (verde, rojo y negro) (López, 2006).

3.1.3. Característica morfológica

La zarzamora es una planta de vegetación perenne, de porte arbustivo semirrecto, conformada por varios tallos espinosos que pueden crecer hasta 3 metros. Las hojas tienen tres folíolos ovoides de 4 a 5 cm de largo con espinas ganchudas. Los tallos son espinosos con un diámetro entre 1 a 2 cm y de 3 a 4 m de longitud. Tanto los tallos como las hojas están cubiertos por un polvo blanquecino. Los peciolo también tienen espinas de color blanco y de forma cilíndrica. Las flores son blancas o rosadas (figura 1). Nacen en racimos, dando lugar a inflorescencias de forma oblonga o piramidal (López, 2006).



Figura 1. Flores de zarzamora

Fuente: López (2006)

Fruto: Son frutos carnosos negros constituidos por pequeñas drupas reunidas alrededor de un eje común (polidrupas). Florece del mes de mayo hasta bien entrado el mes de octubre (figura 2) (Coronado, García, Santiago, Córdova y Vásquez, 2014).

El género *Rubus* es uno de los de mayor número de especies en el reino vegetal. Las especies más conocidas son *Rubus idaeus* (frambuesa), *Rubus occidentalis*, las cuales se cultivan en zona templada (López, 2006).



Figura 2. Frutos de zarzamora

Fuente: López (2006).

3.1.4. Origen

La zarzamora es una fruta producida en diferentes partes del mundo, siendo México el país productor del 30 % de la producción mundial, comercialmente la frambuesa y zarzamora, conjuntamente con el arándano y la fresa pertenecen al grupo de los llamados berries, especies poco producidas en México, pero de gran popularidad en Norteamérica y Europa, donde su cultivo constituye inversiones considerables de capital (Muratalla, 1993).

Los berries, grupo al que pertenece la zarzamora, son productos agrícolas que han venido registrando un incremento sostenido en su cultivo. Las zarzamoras son frutas que por su rentabilidad representan una opción para productores y agroindustriales, al generar un rápido retorno de ganancia. México es uno de los principales proveedores de zarzamora congelada. Esta se cultiva en los estados de Michoacán, México, Guanajuato e Hidalgo, con un volumen de producción cercana a 26 mil 696 toneladas (Sagarpa, 2006).

3.1.5. Zonas de Producción

En el Perú se han identificado algunas zonas de producción por ejemplo en el departamento de Huancavelica (Pampas, Surcobamba, Sambocache, San Antonio, Huachocolpa, Tintay punco), Huánuco, Ayacucho, Apurímac y en la sierra de lima entre otros lugares. En otros países que producen este tipo de zarzamora destacan:

Colombia, Bolivia, Ecuador, Brasil, México, Puerto Rico, Haití, entre otros países europeos (Sagarpa, 2006).

El mayor productor de zarzamora en el mundo es México, con tres mil setecientas cincuenta hectáreas y una producción de treinta mil toneladas por año, de las cuales el noventa por ciento se exporta a Estados Unidos, Europa y Japón (Ibarra, Romero, Meuly y Hurtado, 2013).

3.1.6. Propiedades nutricionales de la zarzamora

Los frutos de zarzamora contienen un elevado porcentaje de agua, alrededor de 80% de su peso total, posee vitaminas especialmente las vitaminas C, E y A, sales de calcio, potasio, hierro, manganeso y ácidos orgánicos (málico, cítrico, láctico, succínico, oxálico y salicílico). Tienen un alto contenido en fibra (tabla 1), sin embargo, lo que en realidad caracteriza a estas frutas es su abundancia de pigmentos naturales que además de conferirle su color y sabor característico tienen acción antioxidante (Cajuste, López, Rodríguez y Reyes, 2000).

Tabla 1. Composición nutricional de la zarzamora.

Componente	Valor /100 g. de porción comestible.	Unidad
Agua	88.15	g
Proteína	1.39	g
Grasa	0.49	g
Carbohidratos	9.61	g
Fibra cruda	4.88	g
Ceniza	0.37	g
Calcio	29	mg
Fósforo	22	mg
Potasio	162	mg
Magnesio	20	mg
Sodio	1	mg
Ácido pantoténico	0.276	mg
Vitamina C	21	mg
Vitamina A	214	mg
Vitamina E	1.17	mg
Beta caroteno	128	mg

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

3.1.7. Hábitat

Esta fruta crece en muchas zonas, llanuras, montañas, claros de bosques y sobre todo pendientes y márgenes soleados, en terrenos húmedos, es un fruto constituido por pequeños granos que se agrupan entre sí: primero son de color verde, después rojas y cuando están maduras adquieren un color negro brillante. El género *Rubus* es prácticamente cosmopolita, se pueden encontrar todavía zarzamoras silvestres en

muchas partes del mundo. Forma zarzales en márgenes de caminos, al lado de paredes y dentro de torrentes (Sagarpa, 2006).

Florece desde finales de mayo hasta el mes de agosto, en primavera y verano, la parte aprovechable son los brotes tiernos que se recolectan en primavera y los frutos que maduran en verano (Tardío, Pascual y Morales, 2002).

3.1.7.1. Condiciones edáficas y clima

No toleran encharcamiento ni suelos pesados, pero tampoco requieren alta fertilidad. Es ideal un suelo arenoso o limoso con pH 4,5 a 7,0. Los frutos del género *Rubus* son tolerantes a la sequía, pero los rendimientos se incrementan bajo riego. Es deseable un buen contenido de materia orgánica en los suelos (Calzada, 2016).

Los frutos del género *Rubus* en general poseen mayor requerimiento de horas de frío. La resistencia al frío no es en general un problema, salvo en cultivares adaptadas a zonas templadas. Las heladas en general no son un problema debido a que la floración es tardía (Calzada, 2016).

3.2. Antocianinas

Son un grupo de pigmentos de color rojo, hidrosolubles, ampliamente distribuidos en el reino vegetal (Fennema, 2012). Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β – glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio (Badui, 2006), también llamado 2 – fenil – benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión (Badui, 2006). Las agliconas libres raramente existen en los alimentos, excepto posiblemente como componentes traza de las reacciones de degradación (Fennema, 2012).

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de estas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Los carbohidratos que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa. El color de las antocianinas depende de varios

factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación del color rojo (Badui, 2006).

Las antocianinas son interesantes por dos razones: la primera por su impacto sobre las características sensoriales de los alimentos, las cuales pueden influenciar su comportamiento tecnológico durante el procesamiento de alimentos y la segunda por su implicación en la salud humana a través de diferentes vías (De Pascual – Teresa y Sánchez – Ballesta, 2008). Las antocianinas son de interés particular para la industria de colorantes alimenticios debido a su capacidad para impartir colores atractivos.

Recientemente diversos materiales conteniendo antocianinas están siendo incorporados a productos alimenticios, donde tales productos requieren investigación a futuro para demostrar sus efectos fisiológicos. Actualmente, las antocianinas de maíz morado y azul están siendo usadas para la producción de tortillas azules coloreadas naturalmente. La incorporación de antocianinas como colorantes alimenticios, además de mejorar la apariencia total, son muy benéficas para nuestra salud (Paramo y Peck, 2006).

Están ampliamente distribuidos en frutas y verduras como: moras, frambuesas, arándanos, fresas, grosellas, bayas de sauco, uva, arándanos rojos, repollo, berenjena, rábanos rojos y espinacas, aunque son más abundantes en frutas. Son pigmentos disueltos en la savia vacuolar de los tejidos epidérmicos de flores y frutas, a los que aportan un color rosa, rojo, azul o color púrpura. Los colores rosa, rojo, azul, malva y violeta de las flores, frutas y verduras se deben a la presencia de estos pigmentos localizándose principalmente en la piel de frutas como manzanas, peras, uvas, zarzamoras y ciruelas; así como también en flores como la Jamaica, rosas y verduras como col morada y maíz morado, la diferencia de color en las frutas, vegetales y verduras dependen de la naturaleza y la concentración de antocianinas, para ello intervienen factores adicionales que afectan el color como el pH de la célula, el efecto de copigmentación determinado por la presencia de otros flavonoides, temperatura y luz (Wrolstad y Giusti, 2003).

La cianidina es un compuesto orgánico natural que ha sido clasificado como un flavonoide al igual que una antocianina. Es un pigmento encontrado en las moras, zarzamoras, frambuesas, uvas, cerezas, arándanos y maíz morado, etc. Las más altas concentraciones se encuentran en la cascara de las frutas. Últimamente ha podido ser biosintetizado el 3 – glucósido de cianidina en la bacteria intestinal *Escherichia coli* (Metabolic engineering of anthocyanin biosynthesis, 2005).

3.2.1. Estructura química de las antocianinas

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides ya que poseen el esqueleto característico C6 - C3 - C6 y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro. Hay antocianidinas (agliconas de las antocianinas) comunes, siendo la cianidina la más común y responsable del color magenta, los colores rojo -naranja se deben a la pelargonidina (con un grupo hidroxilo menos que la cianidina); mientras que los colores violeta y azul, la delphinidina (con un grupo hidroxilo más). También son muy comunes tres metiléteres: peonidina, derivadas de la cianidina, petunidina y malvidina, basadas en la delphinidina. Cada una de las 6 antocianidinas ocurre con unidades de azúcar, la variación está en el tipo del azúcar, del número y de la posición en los que están unidos (Lfevre y Cols, 2006).

Las antocianinas son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos, variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas, como se observa en la figura 4 (Garzón, 2008).

La glicosidación de estos pigmentos en posiciones 3,5 o 7 o una combinación de estos, resulta en la formación de antocianinas. El azúcar en la molécula confiere solubilidad y estabilidad a las antocianinas. La naturaleza anfotérica es una propiedad característica de estos componentes, debido a esto, las antocianinas se comportan sea como ácido o base dada la naturaleza del medio. Los azúcares unidos al aglucón mediante enlace glucosídico son pentosas, hexosas, biosas y triosas (Delgado 1989).

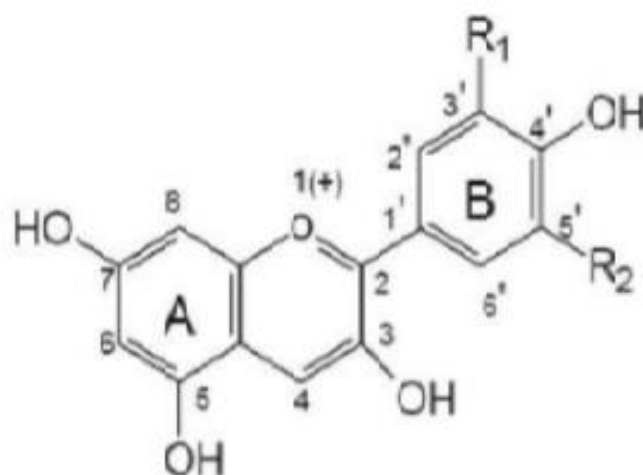


Figura 3. Estructura básica de antocianinas.

Fuente: Garzón (2008).

3.3. Origen de las antocianinas

Antocianinas (del griego anthos = flor y kianos = azul) son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares, son inofensivas y de fácil incorporación en medios acuosos, que les hace interesantes para su uso como pigmentos naturales solubles en agua. Estos son los responsables de la naranja brillante, rosa, violeta y colores azules en las flores y frutos de algunas plantas (Giusti y Wrolstad, 2001).

3.4. Clasificación de antocianinas

Existe una gran diversidad de antocianinas presentes en la naturaleza las convierte en un grupo muy complejo e interesante, con variadas estructuras base. Se han reportado alrededor de 635 antocianinas diferentes (Castañeda y Guerrero, 2015).

Según Estevez y Mosquera (2009); citados por Castañeda y Guerrero (2015) las variaciones estructurales del anillo B dan lugar a seis antocianinas más frecuentes, encontradas en plantas superiores (figura 5) y son:

- ✓ Pelargonidina: tiene dos sustituyentes hidrógeno y es responsable del color rojo.
- ✓ Cianidina: tiene un sustituyente hidroxilo y un hidrógeno, es la más común e imparte color magenta.
- ✓ Delfinidina: tiene dos sustituyentes hidroxilo y es responsable del color azul.

- ✓ Peonidina: su estructura es derivada de la cianidina.
- ✓ Petunidina: su estructura basada en la delfinidina.
- ✓ Malvinidina: al igual que la petunidina, está basada en la delfinidina.

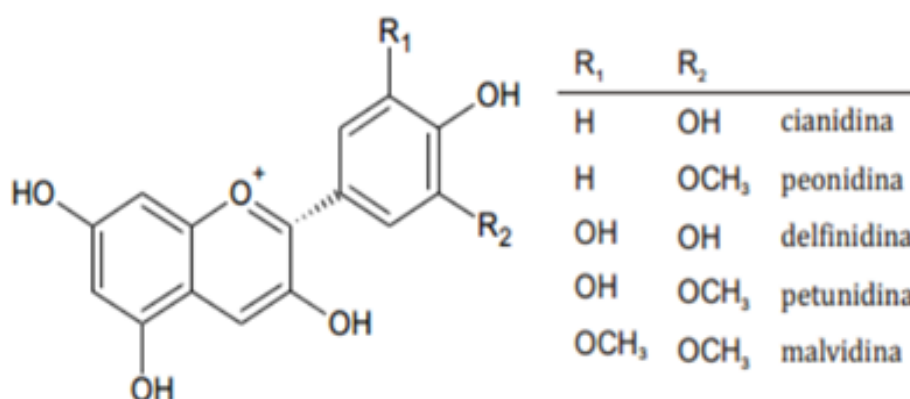


Figura 4. Estructura y sustituyentes de las antocianinas.

Fuente: Estevez y Mosquera (2009).

Las variaciones estructurales de las antocianinas se deben a las diferencias en el número de grupos hidroxilo en la molécula, al grado de metilación, a la naturaleza y número de moléculas de azúcares y la posición de ésta, así como a la naturaleza y número de ácidos aromáticos y alifáticos unidos a los azúcares (Durst, 2001).

La distribución promedio de antocianinas en vegetales es la cianidina en un 30%, delfinidina en un 22 %, pelargonidina en un 18 %, peonidina en un 7.5 %, malvidina en un 7.5 % y petunidina en un 5 %. La diversidad de antocianinas puede incrementar en base a la naturaleza y al número de azúcares unidos a la antocianidina (Clifford, 2000).

3.5. Color y estabilidad de las antocianinas

El color y las tonalidades de las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula, incrementos en la hidroxilación producen tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Zapata, 2014).

El color de las antocianinas y antocianidinas resulta de la excitación de la molécula por la luz visible. La facilidad con la que la molécula es excitada depende de la movilidad relativa de los electrones de la estructura. Los dobles enlaces, que son

abundantes en antocianinas y en antocianidinas, son excitados más fácilmente y su presencia es esencial para el color (Fennema, 2000).

El aumento de sustituyentes en la molécula da como resultado un color más profundo. La profundidad del color da como resultado de un cambio batocrómico (mayor longitud de onda), lo que significa que la banda de absorción de la luz en el espectro visible se desplaza de la violeta hacia el rojo. El cambio opuesto se conoce como desplazamiento hipsocrómico. Los efectos batocrómicos son causados por grupos auxóchromos. Los grupos auxóchromos son donadores de electrones y en el caso de las antocianidinas son los grupos hidroxilo y metoxilo.

La gran variedad de colores, matices y tintes que ocurren en la naturaleza, son el resultado de cierto número de factores, entre los principales son:

- ✓ A pH bajo esos pigmentos son rojos, el matiz puede ser diferente, pero ellos son todos rojizos. Así la pelargonina es rojo naranja en solución ácida, mientras que la delphinidina es rojo azulino.
- ✓ A pH alto las antocianinas pasan a través de un color violeta hasta alcanzar un color azul; a valores muy altos de pH, hay un viraje a verde y luego a amarillo (esto no es encontrado en plantas).
- ✓ La concentración de pigmentos altera los matices. Cuando una solución ácida de delphinidina sintética es vertida sobre papel filtro, una solución diluida da un color azul, mientras que una solución intermedia da un color púrpura.
- ✓ Frecuentemente las antocianinas ocurren como mezclas. Los matices de éstas dependen de la composición de la mezcla.
- ✓ Algunas veces las plantas celulares no contienen únicamente antocianinas como pigmento, sino también algunas de las antoxantinas que pueden ser amarillas y con frecuencia carotenoides amarillos.
- ✓ Los taninos están frecuentemente asociados con antocianinas y alteran el color (Fennema , 2010).

La degradación de las antocianinas ocurre no solo durante la extracción del tejido vegetal sino también durante el procesado y conservación de los alimentos. Los

principales factores que gobiernan la degradación de las antocianinas son el pH, la temperatura y la concentración de oxígeno (Fennema , 2010).

La degradación de las antocianinas por lo general sigue una cinética de primer orden; es decir, el contenido de antocianinas disminuye exponencialmente con el tiempo (Tonan, Brabet y Hubinger, 2010).

3.6. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas

Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas. La estructura de estas puede verse afectada durante el proceso tecnológico como, por ejemplo: proceso de extracción de antocianinas de un material vegetal, como así durante el tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene (Zapata, 2014).

Las antocianinas presentan serios inconvenientes relacionados a su estabilidad, ya que en solución ellas son afectadas por la luz, cambios en pH, temperatura, oxidación, presencia de otros flavonoides y metales. Debido a la deficiencia electrónica del núcleo flavilio las antocianidinas tienden a reacciones que alteran su estructura. Su estabilidad se incrementa a mayor número de grupos metoxilos en el anillo B y decrece a mayor cantidad de grupos hidroxilos en la molécula (Peguero, 2007).

a) pH

Las antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad. A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas, a valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas preferentemente bajo la forma quinuedales de color azul. A pH entre 5 y 6 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora, y chalcona, de color amarillo, ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire, figura 6 (Moldovan, 2012).

La acidez tiene un efecto protector sobre las estructuras de las antocianinas, donde cuanto más se eleva el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. Es por esto las aplicaciones de las antocianinas en los sistemas alimenticios

son preferentemente usadas en alimentos de acidez intermedia para que predomine el catión flavilio (Aguilera, 2011).

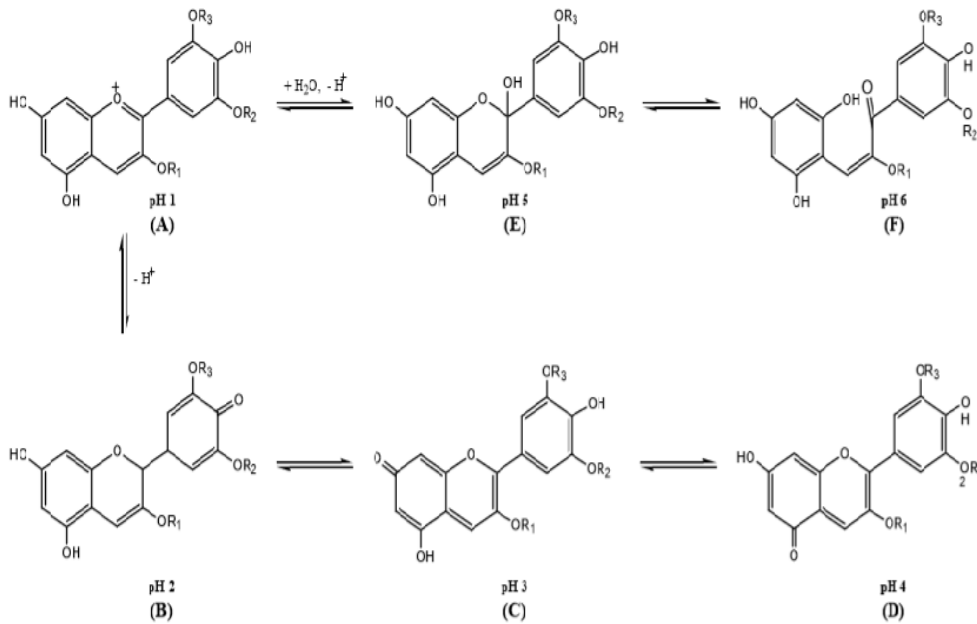


Figura 5. Estructuras de las antocianinas a diferentes valores de pH.

Fuente: Moldovan (2012)

Entre valores de pH 4 y 7, coexisten cuatro formas estructurales de antocianinas: catión flavilio, base quinoidal anhidra, base de carbinol incolora y chalcona de color amarillo pálido. El equilibrio entre las bases quinoidales y el carbinol se produce a través del catión de flavilio tal como se muestra en la figura 7 (Cooper, 2001).

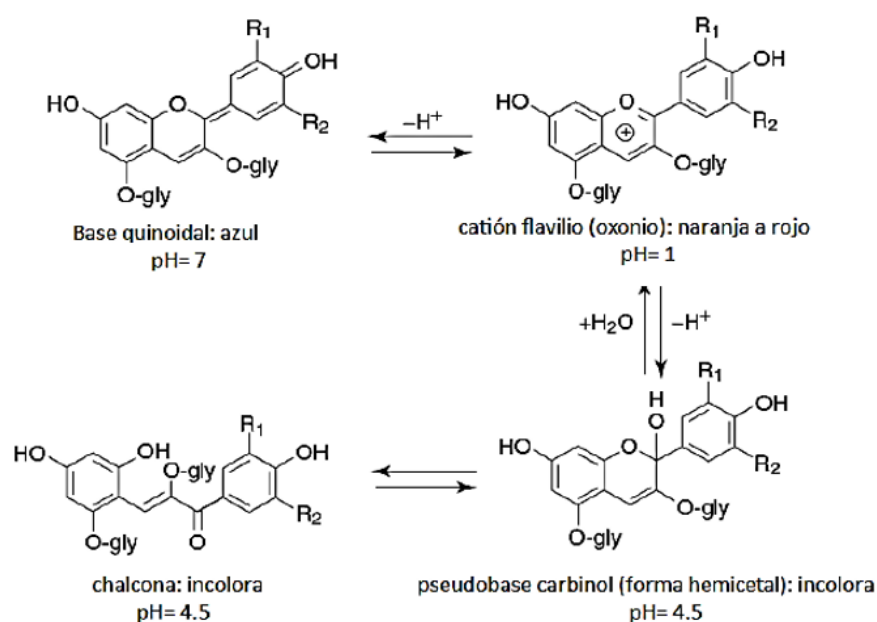


Figura 6. Estructuras químicas de antocianinas basadas en el pH.

Fuente: Giusti y Wrolstad (2001).

Por debajo de pH 3, las soluciones de antocianinas muestran una coloración roja intensa. Cuando el pH incrementa, su color rojo normal cambia hasta el punto en que aparece descolorido en el rango de pH de 4 a 5. Conforme incrementa el pH, se presentan cambios en el color violeta o azul, y esas bajo almacenamiento o tratamientos térmicos, se han observado un cambio en su pigmentación de azul a amarillo (Wrolstad, 2004).

Por otra parte, Bordignon, Francescato, Nienow, Calvete y Reginatto (2009), estudiaron la extracción de antocianinas de frutillas en el rango de pH de 1,0 a 13,0 y obtuvieron que la mejor extracción fue al valor más bajo de pH.

Los alimentos que poseen antocianinas, durante el procesamiento sufren la degradación de estos compuestos; cuanto más bajos es el pH menor es el deterioro; es decir, la acidez tiene efecto protector sobre la estructura de las antocianinas, mientras que, cuanto más elevado es el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez (Zapata, 2014).

También, Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameel y Zare (2006), comenta que la influencia del pH en extractos de antocianinas de 4 especies de berberies,

observando que cuanto más bajo fue el pH menor fue el deterioro de las antocianinas (Aguilera, 2011).

b) Temperatura

La temperatura es uno de los factores más críticos que influyen en la degradación de antocianinas. Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo. 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 (Garzón, 2008).

Los estudios realizados con las antocianinas han demostrado que estos pigmentos son fácilmente degradados por el calor, el porcentaje de degradación depende de la estructura que presente dicha antocianina. La velocidad de degradación de las antocianinas aumenta al elevar la temperatura. Para mejorar la retención de pigmentos es recomendable aplicar un tratamiento a alta temperatura por corto tiempo y luego almacenar el producto a bajas temperaturas (Medina, 2012).

La degradación de las antocianinas por efecto de la temperatura ocurre por dos mecanismos: hidrólisis del enlace glucosídico que da lugar a la formación de aglicona o por la ruptura hidrolítica que origina la formación de chalconas (Castañeda y Guerrero, 2015).

Hager, Howard y Prior (2008), reportan como influye la temperatura en el rendimiento de antocianinas monoméricas, indicando que hay un decremento de las cinéticas de degradación de primer orden.

c) Oxígeno

Las antocianinas se oxidan por reacción directa con oxígeno o de manera indirecta al reaccionar con compuestos que han sido oxidados previamente, resultando en la formación de productos amarronados o incoloros. Adicionalmente pueden reaccionar con radicales de oxígeno cumpliendo la función de oxidantes, reacción que se ve favorecida con los aumentos de temperatura (Rein, 2005).

También se ha observado que el ácido ascórbico reacciona con las antocianinas en presencia de oxígeno, formando peróxido de hidrogeno y produciendo esterés

incolores y derivados de la cumarina, reacción que se cataliza con la presencia de cobre y se inhibe con la de flavonoles (Fennema, 2000). Este efecto del ácido ascórbico sobre la estabilidad de la antocianina es explicado como una reacción de condensación entre el ácido y los pigmentos (Garzón, 2008). Por ello los métodos donde hay eliminación del oxígeno, como el envasado al vacío, muestran prevalencia de color (Fennema, 2000).

d) El agua

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C - 2 formando la base carbinol incolora. Sin embargo, esta degradación puede variar dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación (Kopjar y Pilizota, 2009).

Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación aceleran la degradación de las antocianinas. 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 Pilizota, 2009).

e) La luz

La luz acelera la degradación de las antocianinas, este efecto adverso se ha demostrado en diversos zumos de frutas y en el vino tinto. Los sulfonatos de las flavonas polihidroxiladas, las isoflavonas y las auronas ejercen un efecto protector contra la foto degradación (Fennema, 2000).

La luz es esencial para la biosíntesis de las antocianinas, pero también acelera la degradación. Preservan mejor su color cuando se mantienen en la oscuridad. La pérdida más vigorosa de antocianina (70 %) se observó bajo luz fluorescente con ligera temperatura elevada de almacenamiento (Markakis, 1982).

Afecta a las antocianinas en dos formas diferentes: la luz es esencial para la biosíntesis de antocianinas, pero también acelera su degradación. Las antocianinas preservan mucho mejor su color cuando se mantienen en la oscuridad (Rein, 2005).

Laleh, Frydoonfar, Heidary, Jameel y Zare (2006), llegaron a la misma conclusión en su investigación referida a la estabilidad de antocianinas presentes en extractos de frutos de 4 especies de berberies, como así también Devi, Saravanakumar y Mohandas (2012) al estudiar la estabilidad de antocianinas extraídas de salvado del sorgo rojo. Por lo tanto, resulta importante proteger no solo del oxígeno, sino también de la luz a los productos ricos en antocianinas.

f) Enzimas

Se han identificado dos grupos de enzimas implicadas en la decoloración de las antocianinas: glicosidasa y polifenoloxidasa, en conjunto se les conoce como antocianinasas. Las glicosidasas hidrolizan los enlaces glucosídicos, dando el azúcar o azúcares y la aglicona. La pérdida de intensidad de color se debe al descenso de la solubilidad de las antocianinas y su transformación en productos incoloros. Las polifenoloxidasas actúan en presencia de o - difenol a o – benzoquinona, que a su vez reacciona con las antocianinas por un mecanismo no enzimático para formar antocianinas oxidadas y productos de degradación (Fennema, 2000).

3.7. Fuentes naturales de antocianinas

Las antocianinas están presentes en diferentes órganos de las plantas, tales como frutas, flores, tallos, hojas y raíces. Estos pigmentos son normalmente encontrados disueltos uniformemente en la solución vacuolar de células epidérmicas. Sin embargo, en ciertas especies las antocianinas son localizadas en regiones discretas de la vacuola celular, llamadas antocianoplastos (Aguilera *et al.*, 2011).

Se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales rojos. Como es el caso de los pigmentos rojos en rábanos, cebollas rojas, cerezas, frambuesas, arándanos, entre otros. Las antocianinas se localizan principalmente en la piel de frutas como las bayas de mora azul, frambuesa, arándano, fresa y zarzamora (tabla 2).

Tabla 2. Contenido de antocianinas en diferentes bayas

Bayas	Antocianinas (mg / 100 g)
Mora azul	60 – 480
Frambuesa	20 – 220
Arándano	20 – 360
Fresa	10 – 80
Zarzamora	183,63

Fuente: Rein (2005).

En el caso de la frambuesa (*Rubus idaeus L.*), como en los demás vegetales, el contenido de antocianinas totales está influenciado por el ambiente de producción y la variedad (López, Pascual, Rivas y Santos, 2002).

Tabla 3. Color y distribución de antocianinas en algunas frutas y vegetales.

Componente	Color	Frutas y vegetales
Delfinidina	Rojo, azulado	Uva, mora, arándano, grosella.
Cianidina	Anaranjado, rojo	Fresa, zarzamora, grosella, cereza, col.
Pelargonidina	Anaranjado	Fresa, maíz morado.
Malvidina	Rojo, azulado	Uva, mora, arándano.
Peonidina	Rojo	Cereza, arándano, camote morado.

Fuente: Mendoza (2012).

En la tabla 4 se muestra el contenido de antocianinas totales en algunas frutas.

Tabla 4. Contenido de antocianinas totales en algunas frutas.

Fruto	Contenido AT (mg cianidina 3 – glucósido / 100 g muestra)
Sauco	120,2
Pushgay	140,3
Fresa	11,1
Sandia	0,4

Fuente: Márquez, Torres y Pretel (2007).

3.8. Beneficios en la salud

El interés en los pigmentos antocianicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades, farmacológicas y terapéuticas. Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatoria y antidiabética; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo, los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Garzón, 2008, p. 7). 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 (Garzón, 2008).

Otro ejemplo de frutas con estas propiedades, es la uva y sus principales componentes como las antocianinas, flavonoides y el resveratrol tienen una variedad de bioactividades, tales como antioxidante, cardioprotectivo, anticancerígeno, antiinflamatorio, antienvjecimiento y antimicrobiano, las cuales están estrechamente ligadas a favor de la prevención de enfermedades y promoción de la salud, haciendo más grande el potencial de la uva en el campo de los alimentos y aplicación farmacéutica. Hoy en día se ha acumulado gran cantidad de información concerniente a la actividad biológica de las antocianinas, sin embargo, debemos profundizar sobre esta funcionalidad (De Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008), concluyen que los productos ricos en antocianinas, tales como bayas o vino tinto, pueden tener un efecto protector sobre la salud humana, especialmente para la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer las implicaciones reales de antocianinas en estas propiedades promotoras de la salud, donde muchos estudios han sido hechos usando extractos de frutas o vino y así, otras sustancias pueden ser totalmente o parcialmente responsables de las actividades biológicas mencionadas. Las bebidas alcohólicas tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica. Todo líquido azucarado sufre esta fermentación de manera espontánea debido a la acción de las levaduras que, en ausencia de aire, destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol (Amerine, 2010).

3.9. Degradación de antocianinas

El mecanismo de la degradación térmica de las antocianinas, aún no ha sido completamente elucidado. En los valores de pH entre 2,0 y 4,0 el calentamiento de las antocianinas provoca primeramente el hidrolisis del enlace glucosídico con posterior formación de la chalcona (Adams, 1973). Según el mismo autor, existen evidencias de que la hidrolisis glucosídica de las antocianinas sea la principal causa de la pérdida de color, una vez que la velocidad de la liberación del azúcar es proporcional a la velocidad de la pérdida del color rojo.

También existe una investigación que los pigmentos antocianicos realmente se degradan durante el procesamiento y almacenamiento de productos alimenticios, los cuales tienen un impacto dramático en la calidad del color y puede también afectar las propiedades nutricionales (Wrolstad, Durst y Lee, 2005).

3.10. Extracción de las antocianinas

La extracción es una técnica de separación y purificación para aislar una sustancia de una mezcla sólida o líquida en la que se encuentra, mediante el uso de un disolvente (Betelleluz, 2006).

3.10.1. Extracción Sólido – líquido

Es una operación unitaria básica que consiste en la separación de uno o varios componentes presentes en una fase sólida, para esto se utiliza una fase líquida o un solvente (Ibarz, 2005).

Este tipo de extracción separa sustancia que está contenido en un material sólido, junto con otros componentes, los cuales deberán ser prácticamente insolubles en el disolvente utilizado. Es muy usada para aislar sustancias naturales de origen vegetal, o bien, de mezclas resinosas obtenidas por síntesis (Betelleluz, 2006).

El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona o agua. Ya que su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz el método de extracción debe ser el más adecuado para cada aplicación concreta (AOAC, 2005). Sin embargo, es de destacar la existencia de otros métodos. Los científicos japoneses desarrollaron una metodología que consiste en extraer las

antocianinas mediante la fermentación de las matrices que las contienen (Fan, Han, Gu y Gu, 2008).

Las antocianinas son moléculas polares y consecuentemente son más solubles en solventes polares que en no polares. A valores de pH donde las moléculas de antocianinas están no ionizadas, pueden ser solubles en éter y no son estables en soluciones neutras y alcalinas; por lo tanto, los métodos convencionales empleados para la extracción de antocianinas implican el uso de solventes ácidos. Estos compuestos son solubles en solventes polares y comúnmente se extraen de sus fuentes naturales usando metanol o etanol con pocas cantidades de algunos ácidos como ácido clorhídrico, acético y fórmico, ya que el ácido mantiene el pH ácido lo que previene el desplazamiento de los equilibrios químicos de hidratación y formación de chalconas. Por lo anterior se recomienda para la extracción de estos pigmentos el uso de ácidos débiles como el trifluoroacético, tartárico o cítrico (Santacruz, 2011).

3.11. Rendimiento

El rendimiento está influenciado principalmente por el proceso de extracción con una solución acuosa y / o disolvente orgánico (Cacace y Mazza, 2003).

3.11.1. Factores que afectan el rendimiento de extracción

Los factores, tales como la preparación de muestras (tamaño de partículas y contenido de humedad) y los parámetros de extracción: temperatura, presión, disolvente, velocidad de flujo, tiempo de extracción y el uso de un solvente. Según Betelleluz (2006) estos parámetros también tienen diferentes impactos sobre los atributos de calidad, como el color, sabor y estabilidad oxidativa de la materia prima extraída, tal como se explica a continuación:

- ✓ **Preparación de la muestra:** El secado de las muestras antes de la extracción es necesario, la molienda es también necesaria para lograr el tamaño de las partículas pequeñas. A fin de recuperar la valiosa extracción de compuestos bioactivos.
- ✓ **Tamaño de partícula:** Varía respecto al tipo de alimento, lo recomendable para la zanahoria es de 1 – 2 mm de 0.5 – 1 mm y se disminuyó de 0.25 – 0.5 mm, para tener mejores rendimientos.
- ✓ **Humedad:** Esto se puede explicar por el hecho de que el agua puede actuar como un disolvente auxiliar para la extracción relativamente de compuestos

polares, como la luteína, mientras que la presencia de agua no es favorable para el licopeno y los carotenos que son relativamente no polares.

- ✓ **Parámetros: Temperatura y presión:** La temperatura afecta en gran medida la tasa de extracción a presiones superiores a la adhesión.
- ✓ **El uso de solventes:** Acetona, etanol, metanol, hexano, diclorometano y el agua han sido comparados como solventes en extracción con CO_2 supercrítico (Betelleluz, 2006).

3.11.2. Solventes para la extracción

a) Agua destilada

El agua tiene gran capacidad para disolver sustancias iónicas y sustancias polares, la interacción de la molécula del agua con moléculas polares o con iones se facilita enormemente por la polaridad misma de esta molécula. Las moléculas polares se intercalan con facilidad entre las moléculas de agua, al interactuar sus dipolos con ella de manera semejante a la forma en que interactúan entre si las mismas moléculas de agua. En algunos casos, los solutos polares funcionan como donadores y en otros como receptores. Las sustancias iónicas se disuelven en el agua porque sus moléculas atraen electrostáticamente a los iones que las forman. La interacción con los iones positivos se establece con el polo negativo de la molécula del agua, mientras que la interacción con los iones negativos se produce con el polo positivo de la molécula de agua. Esta hidratación de los iones de cargas opuestas permite su separación (Peña, Arroyo, Gómez, Tapia y Gómez, 2005).

b) Etanol

El etanol, cuya fórmula es $CH_3 - CH_2 - OH$, no solo es el producto químico orgánico sintético más antiguo empleado por el hombre, sino uno de los más importantes, sus usos más comunes son industriales, domésticos y medicinales, la industria emplea mucho etanol como disolvente (Nicaragua, 2004).

La técnica más usada por su rendimiento y eficiencia económica es la técnica de maceración donde existe una relación sólida – líquido (Gonzales, 2013).

3.11.3. Factores que influyen en la extracción

a) Solvente

El solvente elegido debe ser altamente selectivo, de baja viscosidad que circule libremente (Ibarz, 2005), pero conforme la extracción transcurre, la cantidad de soluto aumentará y la gradiente de concentración disminuye, incrementando así la viscosidad (Ullauri, 2010).

Generalmente se utiliza etanol para la extracción de los principios activos de las plantas, sin embargo el agua es considerada el solvente universal por su capacidad de extracción en fase sólido- líquido (Ullauri, 2010).

b) Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas influye en la extracción de diferentes maneras, ya que los sólidos de tamaño pequeño tienen una mayor superficie de contacto con el líquido y la distancia de difusión entre el soluto y el solvente es menor por lo tanto la cantidad de soluto transferido es más alto (Ullauri, 2010).

c) Tiempo de extracción

Considerado como un factor de menor incidencia en la extracción del colorante, pero a nivel industrial donde se trabaja con grandes volúmenes será un factor muy importante en los costos de operación ya que a un largo tiempo de producción baja la rentabilidad (Centeno, 2003).

3.12. Importancia de antocianinas

Las antocianinas son pigmentos vegetales de color rojo, azul, morado con gran potencial para el reemplazo competitivo de colorantes sintéticos; por tanto, es de gran importancia conocer los aspectos bioquímicos que enmarcan estos pigmentos, las propiedades bioactivas de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano (Garzón, 2008, p. 8).

3.13. Espectrofotometría

Es una técnica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben las radiaciones electromagnéticas y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la

concentración. Para hacer este tipo de medidas se emplea un espectrofotómetro, en el que se puede seleccionar la longitud de onda de la luz que pasa por una solución y medir la cantidad de luz absorbida por la misma (Abril, Barcena, Fernández y Galván, 2018).

El espectrofotómetro nos permitirá medir la absorbancia a la longitud de onda máxima de absorción para antocianinas. Además, nos permitirá saber la cantidad de antocianinas presentes en las muestras a analizar (Arenas y López, 2004).

3.13.1. Parámetros de medición

a) Absorbancia (A)

Es la cantidad de energía radiante absorbida por una sustancia pura o en solución. Matemáticamente, corresponde al logaritmo negativo de la transmitancia (T), expresada como fracción decimal % T, transmitancia expresada como porcentaje. Es un parámetro que aumenta linealmente con la concentración.

La absorbancia de un soluto depende linealmente de la concentración. La longitud de absorción y la fuerza de absorción de una molécula no solo depende de la naturaleza química, sino del ambiente molecular en donde se encuentre el cromóforo (Arenas y Lopez, 2004).

b) Longitud de onda

Es la distancia entre dos compresiones o enrarecimientos consecutivos. La distancia entre dos puntos consecutivos de una onda que tienen el mismo estado de vibración. La longitud de onda representa un concepto fundamental en la resolución de cualquier tipo de movimiento ondulatorio y puede variar de valores muy grandes, por ejemplo, cientos de metros para radio ondas largas a valores muy pequeños. Es la distancia recorrida por un ciclo completo, de cresta a cresta de la onda (Manfred, 1999).

La absorción máxima a 520 – 540 nm en la región visible es la longitud de onda más común usada en la medición espectrofotométrica de antocianinas (Horbowicz, Kosson, Grzesiuk y Debski, 2008).

c) Ley de Lambert – Beer

La ley de Beer establece que la absorbancia es proporcional a la concentración de las especies absorbentes. Dicha ley se verifica muy bien en un rango definido de concentraciones (≤ 0.01 M). Las desviaciones aparentes de la ley de Beer en soluciones más concentradas pueden atribuirse a cambios en las propiedades de las especies absorbentes de la solución. Conforme una solución se vuelve más concentrada, las moléculas de soluto interactúan entre sí debido a su proximidad, modificando sus propiedades de absorber la luz (Prácticas de Química Aplicada, 2013). Establece que hay una relación lineal entre la absorción de luz de una sustancia y la concentración de la sustancia.

3.14. Determinación de antocianinas en forma total

La forma más utilizada para determinar antocianinas en forma total es la basada en diferencial de pH. El contenido total de antocianinas en extractos crudos que contiene otros materiales fenólicos, son determinadas por mediciones de absorción de la solución a una determinada longitud de onda. Esto es posible porque las antocianinas tienen una típica banda de absorción entre 490 y 550 nm en la región del espectro visible. Esta banda está lejos de la banda de absorción de otros fenoles y tiene un máximo espectro en el rango UV. En muchas instancias, sin embargo, este simple método es inapropiado por la interferencia de productos de degradación de antocianinas de reacciones de pardeamiento. En ambos casos, el acercamiento debe ser usado para diferenciar y/o métodos sustractivos para cuantificar antocianinas y su producto de degradación (Burriel, 2008).

3.15. Determinación del contenido de antocianinas

Las antocianinas a ciertos *pH*s presentan diferente actividad debido a que esto repercute en su estabilidad molecular. Los espectros UV – Vis a diferentes pH también cambian y nos ayudan a determinar si está o no polimerizada (Wrolstad, Lauro y Francis, 2000).

El color llamativo de las antocianinas se debe principalmente a la carga positiva del catión flavilio. A pH 1 dará un color intenso tal como se encuentra de forma típica en verduras y frutas. Las cargas van cambiando a lo largo de la variación de pH dando las estructuras y colores. El catión flavilio a pH 1 es la forma más estable mientras

que las chalconas a $pH > 4,5$ son las más susceptibles a degradación (Wrolstad *et al.*, 2000).

3.15.1. Método de pH diferencial para antocianinas totales

Este método es descrito originalmente en el año de 1957 por Francis y posteriormente (Servadio, 1963) por luego de otras investigaciones realizadas en el año de 1968 los investigadores (Fuleky y Francis, 1968), modificaron el método de pH diferencial por métodos descrito a continuación:

Se diluyen las muestras con el buffer de pH 1.0 y 4.5 una vez diluidas se mide las absorbancias a las longitudes de ondas de 510 nm y 700 nm, se realiza una diferencia entre las absorbancias de los pH 1.0 y 4.5, las soluciones de los pH 1.0 y 4.5 dará una variación de color esto debido a la existencia de antocianinas monoméricas, las antocianinas al ser sometidas a pH 1.0 son convertidas en cationes o sales de flavilio de color (rojo), y al ser sometidas a pH 4.5 forma la base quinoidal (anhidra) de color azulada. Las antocianinas polimerizadas pigmentan mientras que las antocianinas monomerizadas broncean los pigmentos no exhiben la conducta reversible con el pH, se excluye así del cálculo de la absorbancia.

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio de pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. Conociendo que, la forma de oxonio coloreada predomina a pH 1,0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5. Se establece el método de pH diferencial, que se basa en esta reacción para medir el total de antocianinas.

Se utiliza un espectrofotómetro UV – Visible Genesys 6, las mediciones se realizan a las longitudes de onda de 520 nm y 700 nm. el contenido de antocianinas es calculado como cianidina – 3 – glucósido, usando como coeficiente de extinción molar 26900 L / (mol * cm) y como peso molecular 449,2 g / mol.

3.15.2. Cuantificación de antocianinas por pH diferencial

Se prepara diluciones del extracto etanólico con solución buffer pH 1,0 de cloruro de potasio y con solución buffer pH 4,5 de acetato de sodio; luego se mide la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda de 520 nm y 700 nm. De la ecuación de Lambert – Beer se obtiene la concentración molar del analito en la muestra diluida sometido a la lectura en el espectrofotómetro, $C = A / \epsilon L$, C es la

concentración molar, A es la absorbancia, ϵ corresponde a la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar, L es la longitud de recorrido en cm.

La concentración en mg / L contenida en el extracto original (muestra no diluida) puede ser determinada multiplicando el resultado de la concentración molar en la muestra diluida por el peso molecular (PM) del pigmento seguida por el factor de dilución (FD). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza en mayor proporción, en este caso es la cianidina.

3.15.3. Evaluación de la absorbancia

Según lo recomendado por la AOAC (Método Oficial 2005.02), la medición final de la absorbancia como resultado de la lectura en la muestra apropiadamente diluida de la alícuota tomada del volumen inicial normalizado de extracto obtenido a partir de la muestra analizada, utilizando cada uno de las soluciones Buffers, debe estar necesariamente dentro del rango de absorbancia de 0,2 a 1,4 medidos a la longitud de onda de 510 nm, para garantizar un buen resultado en el cálculo del contenido de antocianinas.

3.16. Cinética de las reacciones químicas

Toda reacción química ocurre a una velocidad finita y, por tanto, resulta útil en potencia como base para un método de análisis cinético químico. Sin embargo, para ello la reacción química debe ser lo suficientemente rápida como para que el análisis pueda concluirse en un intervalo de tiempo razonable, pero también lo suficientemente lenta para que alcance su posición de equilibrio mientras los reactivos se están mezclando aún. Una segunda condición es que la ley de la velocidad de la reacción química para el periodo en el que se hacen las medidas debe ser conocida. Además, la ley de la velocidad debe permitir un cálculo fácil de todos los parámetros cinéticos de interés, tales como las constantes de velocidad y las concentraciones (Harvey, 2002).

La cinética química trata de medir las velocidades de las reacciones y encontrar ecuaciones que relacionen la velocidad de una reacción con las variables experimentales. Por largos años el enfoque ha sido elaborar modelos simples, en función al grado de sofisticación utilizando para detectar los diversos reactantes y productos finales (Labuza, 1984).

3.16.1. Constante de velocidad de degradación (k)

Se calcula a partir de la pendiente de la curva que describe la variación de la concentración del atributo (A) en función del tiempo de almacenamiento (t), se halla de acuerdo al orden de reacción (Zapata, 2014).

3.17. Orden de reacción

Estrictamente hablando, se le conoce como orden de reacción al número de moléculas que participan bajo la forma de reactivos, pero en términos simples podemos decir que el orden de reacción es el factor exponencial (n) que acompaña a la concentración. Aunque muy rara vez se han realizado investigaciones para comprender claramente los mecanismos implicados en la reacción de sistemas complejos, como en los casos de alimentos y materiales biológicos. La mayoría de la información disponible ha sido simplificada para adaptar cinéticas de reacción de orden cero ($n = 0$) o de primer orden ($n = 1$).

3.17.1. Reacción de orden cero

En este tipo de reacciones, la velocidad es independiente de la concentración. Esto puede ocurrir en dos situaciones diferentes: (a) cuando la velocidad de reacción es independiente de la concentración del reactante y (b) cuando la concentración del reactante es tan grande que la velocidad de reacción global parece ser independiente de su concentración (Labuza, 1984).

3.17.2. Reacción de primer orden

La mayoría de las reacciones implicadas en el procesamiento y almacenamiento de los alimentos siguen una cinética de reacción de primer orden ($n = 1$), como, por ejemplo, la degradación de vitaminas, produciendo una disminución en el valor nutricional del alimento, o la degradación de antocianinas durante el almacenamiento de alimentos coloreados produciendo una pérdida en la apariencia del mismo (Labuza, 1984).

3.18. Modelo de Arrhenius

La influencia de la temperatura sobre la constante de velocidad de reacción se puede describir utilizando la ecuación desarrollada por Svante Arrhenius. El modelo de

Arrhenius que relaciona la velocidad de una reacción química a los cambios de temperatura es el mejor ejemplo

3.18.1. Gráfico de Arrhenius

El gráfico de Arrhenius muestra el logaritmo de las constantes cinéticas $\ln(K(T))$ en el eje de las ordenadas de coordenadas cartesianas, graficado con respecto al inverso de la temperatura ($1/T$), en el eje de las abscisas). Los gráficos de Arrhenius son ocasionalmente utilizados para analizar el efecto de la temperatura en las tasas de rapidez de las reacciones químicas. Para un único proceso térmicamente activado de velocidad limitada, un gráfico de Arrhenius da una línea recta, desde la cual pueden ser determinados tanto la energía de activación como el factor pre exponencial.

3.19. Energía de activación (E_a)

Para que haya una transformación química, es necesario que las partículas (átomos, moléculas o iones) choquen las unas con las otras. No todos los choques que tienen lugar entre las partículas provocan la reacción entre estas. Para que un choque sea eficaz o de lugar a la transformación, es preciso que las moléculas tengan una velocidad y un contenido energético mínimo, de lo contrario, simplemente rebotan sin sufrir ningún cambio. Desde otro punto de vista, se puede decir que para que las moléculas de los reactivos se transformen, deben superar una cierta barrera de energía, ya que solamente las moléculas que posean energía suficiente para superar la barrera podrían sufrir un choque eficaz. La diferencia entre la energía de los reactivos y la energía mínima que deben alcanzar para reaccionar es lo que se conoce como energía de activación; es decir, la energía de activación es la energía adicional que deben absorber las moléculas de los reactivos para que, al colisionar, lleguen a formar el complejo activado. Es la energía mínima necesaria para que se inicie una reacción química (De Anda Cárdenas, 2006).

La velocidad en casi todas las reacciones bioquímicas aumenta con la temperatura. Para que exista una reacción química es necesario que las moléculas choquen con la orientación adecuada y con la energía suficiente. A la energía necesaria para que los reactivos formen el complejo activo se le llama energía de activación. La E_a representa la barrera de energía que han de salvar las moléculas para que tenga lugar la reacción (Labuza, 1984).

3.20. Análisis de regresión

El análisis de regresión tiene como objetivo modelar el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes (factores) (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

La ecuación del modelo de regresión lineal simple es:

$$Y = b + ax \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

Y: Variable dependiente concentración de antocianinas (k) para el estudio de modelo de orden cero y logaritmo neperiano de la concentración de antocianinas (ln k) para el estudio de modelo de orden uno.

X: Variable independiente (tiempo de tratamiento).

b: Punto en el cual la línea recta intercepta el eje (ordenada en el origen).

a: Pendiente de la línea.

El análisis estadístico se utilizó para determinar el orden de la cinética de degradación de las antocianinas (orden cero y segundo orden) versus el tiempo de tratamiento que mejor se ajustó los datos experimentales. Según Fennema (2000), cuando se aplica la técnica de regresión, se utiliza el análisis estadístico para determinar el 95 % de los límites de confianza de los parámetros de Arrhenius. Si solo se dispone de tres valores k, el rango de confianza normalmente es grande. Para obtener límites de confianza estrecha y significativa en energía de activación (E_a).

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Lugar de ejecución

La investigación se desarrolló en las instalaciones en la Universidad Nacional “José María Arguedas”, en el Laboratorio de Química de la Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial (EPIA), la cual está ubicado en la Unidad Vecinal de Santa Rosa, Distrito de Talavera, Provincia de Andahuaylas, Región Apurímac.

4.2. Material de estudio

Para la investigación se utilizó el fruto de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), el cual fue recolectado en el Distrito de Ranracancha, Provincia de Chincheros, Región Apurímac un total de 3 kg para las corridas experimentales, con la cual se llegó a cumplir los objetivos planteados.

4.2.1. Población y muestra

4.2.1.1. Universo y/o población

Es la totalidad del material vegetal frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), que crecen en el bosque de la Comunidad de Huaccsone, ubicado en el Distrito de Ranracancha, estos frutos maduran en los meses de agosto a octubre, meses en que se encuentran en su estado de madurez completa (color negro).

4.2.1.2. Muestra

Para obtener la muestra de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), se realizó un muestreo aleatorio simple, el cual consiste en tomar una muestra en la cual todos los elementos del universo tienen la probabilidad de ser seleccionados, para ello se recolectó una cantidad de 3 kg de frutos de Zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), esta cantidad fue necesaria para llevar a cabo el presente trabajo de investigación, estos frutos presentaron las siguientes características como: una coloración morada intensa y libre de daños físicos.

4.2.2. Unidad de análisis

La unidad de análisis fue representada por 608,16 mL de extracto de frutos de zarzamora para evaluar la influencia de la temperatura y pH en la estabilidad, 608,16 mL para determinar la concentración de antocianinas totales.

4.3. Equipos, instrumentos, materiales, reactivos e insumos

En la tabla 5 se muestra los equipos utilizados durante la investigación.

Tabla 5. Equipos

Cantidad	Descripción	Marca
1 Unid.	Espectrofotómetro UV - Visible	Génesis
1 Unid.	Incubadora	Memmert
1 Unid.	Refrigeradora	Mabe
1 Unid.	Balanza analítica. Capacidad 200 g	Adventurer OAHUS 220 V / 50.
1 Unid.	Balanza digital de precisión. Capacidad 100 g de sensibilidad 0,01 g.	ABS 200 – 4
1 Unid.	Termómetro digital de 50 °C hasta + 300 °C.	Boeco germany
1 Unid.	Centrifuga de 4000 rpm	LW – Scientifique.
1 Unid.	pH – metro digital de escala 1 a 14.	Lovinbond
1 Unid.	Baño María con termorregulador. Marca HAAKE , tipo FK N°751117, Alemania.	Memmert
1 Unid.	Licuada, capacidad 1,25 L giratoria de 3 velocidades.	Oster
1 Unid.	Colador, material de asbesto.	

En la tabla 6 se muestra los materiales usados durante la investigación.

Tabla 6. Materiales

Cantidad	Descripción	Marca
3 Unid.	Vasos precipitados. Capacidad de 250 mL, material de vidrio.	Fortuna.
1 Unid.	Vaso precipitado. Capacidad de 80 mL, material de vidrio.	Fortuna.
2 Unid.	Vasos precipitados. Capacidad de 40 mL, material de vidrio.	Fortuna.
2 Unid.	Probetas. Capacidad de 10 mL, material de vidrio.	Kyntel
1 Unid.	Probeta. Capacidad de 100 mL, material de vidrio.	Kyntel.
5 Unid.	Matraz Erlenmeyer. Capacidad de 250 mL, material de vidrio.	Fortuna.
5 Unid.	Matraz Erlenmeyer. Capacidad de 500 mL, material de vidrio.	Fortuna.
3 Unid.	Vaguetas. Material de vidrio de 1 cm.	S/M.
2 Unid.	Pipetas volumétricas. Capacidad de 2 mL, material de vidrio.	S/M.
2 Unid.	Pro pipetas. Material jebe.	D&N.
3 Unid.	Fiolas. Capacidad de 250 mL, material de vidrio.	Fortuna.

63 Unid.	Tubos de ensayo con roscas. Capacidad de 10 mL, material de vidrio.	Scott.
10 Unid.	Papel filtro (Whatman N°1).	S/M.
2 Unid.	Pizetas. Material de plástico de 5 mL.	S/N.
3 Unid.	Embudos de vidrio Buhner, material de vidrio.	Fortuna.
2 Unid.	Espátulas de acero inoxidable mango de madera.	S/M.
1 Unid.	Guardapolvo.	Kyntel.
12 Unid.	Botellas de vidrio. Capacidad de 50 mL, material de vidrio color ámbar.	
1 Unid.	Gradilla, para tubos de ensayo.	S/M.
1 Unid.	Rotulador	Faber Castell
3 Unid.	Cubetas de cuarzo	Isolab
2 Unid.	Rollos de papel aluminio	Diamont

A continuación, se muestra los reactivos utilizados durante la investigación en la tabla 7.

Tabla 7. Reactivos

Cantidad	Descripción
10 mL	Ácido clorhídrico concentrado.
30 mL	Hidróxido de sodio (NaOH)
200 g	Cloruro de potasio.
100 g	Acetato de sodio.
200 g	Ácido cítrico.

En la tabla 8 se muestra los insumos utilizados durante la investigación.

Tabla 8. Insumos

Cantidad	Descripción
3L	Etanol 95 %
6 L	Agua destilada

En la tabla 9 se muestra el material vegetal utilizados durante la investigación.

Tabla 9. Material vegetal

Cantidad	Descripción	Origen
3 kg.	Zarzamora (<i>Rubus urticifolius</i> Poir)	Recolectado en el Distrito de Ranracancha, Provincia de Chincheros, región de Apurímac.

4.4. Metodología experimental

Se tomó como referencia la metodología propuesta por Fuentes (2005), quien utilizó la solución de etanol de 95 %, ya que es un solvente no tóxico y económico.

4.4.1. Extracción de antocianinas

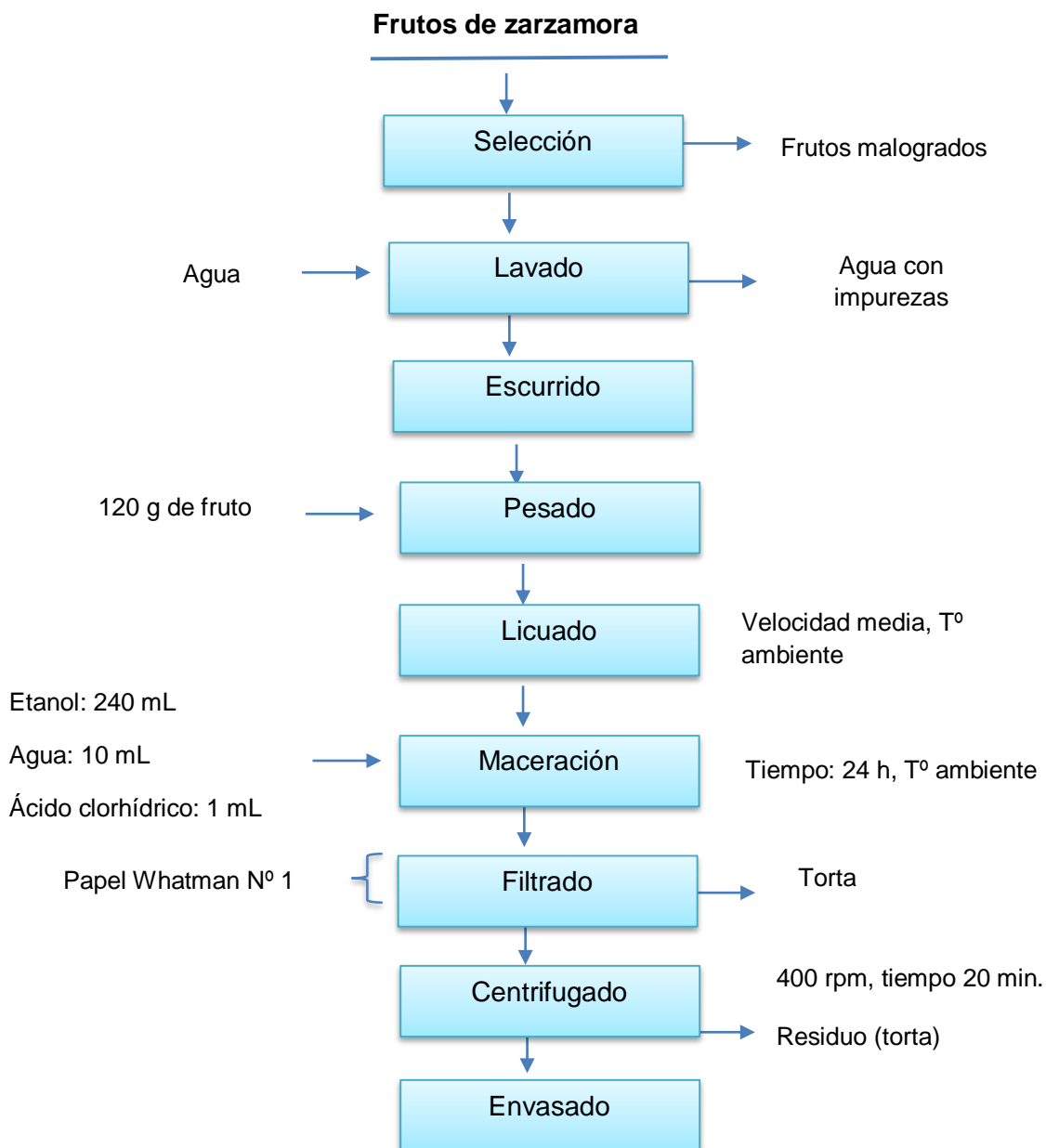


Figura 7. Diagrama de flujo para la obtención del extracto.

Fuente: Fuentes (2005).

Procedimiento

- ✓ **Frutos de zarzamora:** Se recolecto frutos de zarzamora (anexo 1).
- ✓ **Selección:** Se realizó una selección manual de los frutos, separando los frutos con señales de daño o una coloración diferente. Y así se obtuvo los frutos seleccionados con coloración negro brillante (anexo 2).
- ✓ **Lavado:** Los frutos fueron lavados con agua, esto con la finalidad de eliminar impurezas presentes en los frutos.
- ✓ **Escurreo:** Los frutos de zarzamoros fueron colocados en un recipiente metálico (colador) el cual ayudo a desalojar el agua residual de lavado por la parte inferior.
- ✓ **Pesado:** Seguido de ello se realizó el pesado (120 g) de frutos, por tratamiento, en total 960 g, con ello se determinó el rendimiento de extracción del zumo (anexo 3).
- ✓ **Licuadao:** Los frutos de zarzamora fueron desintegrados en una licuadora a temperatura ambiente y velocidad media (anexo 3).
- ✓ **Maceración:** Los frutos licuados fueron transferidas a un Erlenmeyer de 500 mL (seguidamente se agregó a cada uno de las muestras etanol 95 % (240 mL), agua (10 mL) y ácido clorhídrico (1 mL), enseguida lo dejamos macerar durante 24 horas a temperatura ambiente, previamente forrado con papel aluminio para proteger de la luz, para evitar la degradación de las antocianinas (anexo 4).
- ✓ **Filtrado:** Lo realizamos con ayuda de Papel filtro (whatman N°1), esto con la finalidad de evitar el paso de residuos de los frutos licuados, ya que al pasar perjudicaría notablemente el resultado final, del cual obtuvimos el extracto diluido y torta (anexo 5).
- ✓ **Centrifugado:** Lo llevamos a cabo en una centrifuga a 4000 rpm durante 20 minutos, en el cual se obtuvo dos fases, el sobrenadante y el residuo. El residuo se desechó y el sobrenadante obtenido se denominó extracto diluido de antocianinas (anexo 5).
- ✓ **Envasado:** Se realizó en tubos de ensayo con tapa rosca (21 mL), los cuales fueron envueltos con papel aluminio por completo y luego se procedió a la codificación para cada uno de los tratamientos.

4.4.1.1. Acondicionamiento de muestras

- ✓ **Acondicionamiento:** De las muestras se midieron su pH (4.3) y luego se acondicionó a pH 3 se utilizó ácido cítrico una cantidad (3 g), pH 4 ácido cítrico (1 g) y pH 5 (hidróxido de sodio 0.1N) una cantidad de 2g, el pH se midió con un pH – metro digital de 1 a 14 (seguidamente fueron transferidas a tubos de ensayo con tapa rosca y envueltas con papel de aluminio, seguidamente fueron rotulados y finalmente el acondicionamiento de temperatura se realizó de la siguiente manera: (0 y 10 °C) fueron colocados en la refrigeradora, para ello se realizó el ajuste de la temperatura de la refrigeradora), 20°C (incubadora), se realizó con un termómetro digital (anexo 6).
- ✓ **Evaluación de antocianinas:** La estabilidad de las antocianinas se evaluó mediante la lectura de la absorbancia (espectrofotómetro) a una longitud de 520 nm, dicha lectura se realizó a 0, 5, 10, 15, 20,25 y 30 días (anexo 7).

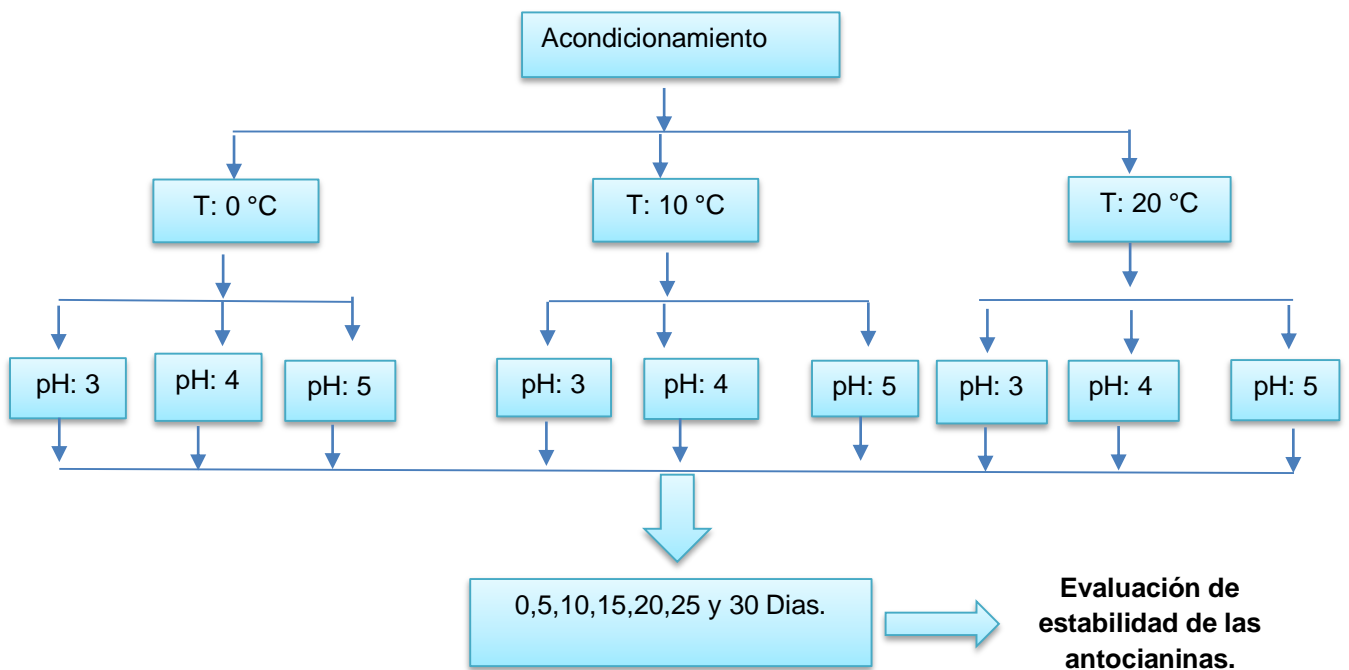


Figura 8. Diagrama de flujo para el acondicionamiento de las muestras.

Fuente: Aroni (2013)

4.4.2. Determinación del rendimiento de extracción

Procedimiento:

- ✓ **Lavado:** Los frutos fueron lavados con agua, esto con la finalidad de eliminar impurezas presentes en los frutos.
- ✓ **Escurredo:** Los frutos de zarzamoras fueron colocados en un recipiente metálico (colador) el cual ayudo a desalojar el agua residual de lavado por la parte inferior.
- ✓ **Pesado:** Seguido de ello se realizó el pesado (120 g) de frutos, por tratamiento, en total (960 g) con ello se determinó el rendimiento de extracción del zumo.
- ✓ **Licuadao:** Los frutos de zarzamora fueron desintegrados en una licuadora a temperatura ambiente y velocidad media.
- ✓ **Maceración:** Los frutos licuados fueron transferidas a un Erlenmeyer de 500 mL (seguidamente se agregó a cada uno de las muestras etanol 95 % (240 mL), agua (10 mL) y ácido clorhídrico (1 mL), enseguida lo dejamos macerar durante 24 horas a temperatura ambiente, forrado con papel aluminio para proteger de la luz, para evitar la degradación de las antocianinas.
- ✓ **Filtrado:** Lo realizamos con ayuda de Papel filtro (whatman N°1), esto con la finalidad de evitar el paso de residuos de los frutos licuados, ya que al pasar perjudicaría notablemente el resultado final, del cual obtuvimos el extracto diluido y torta.

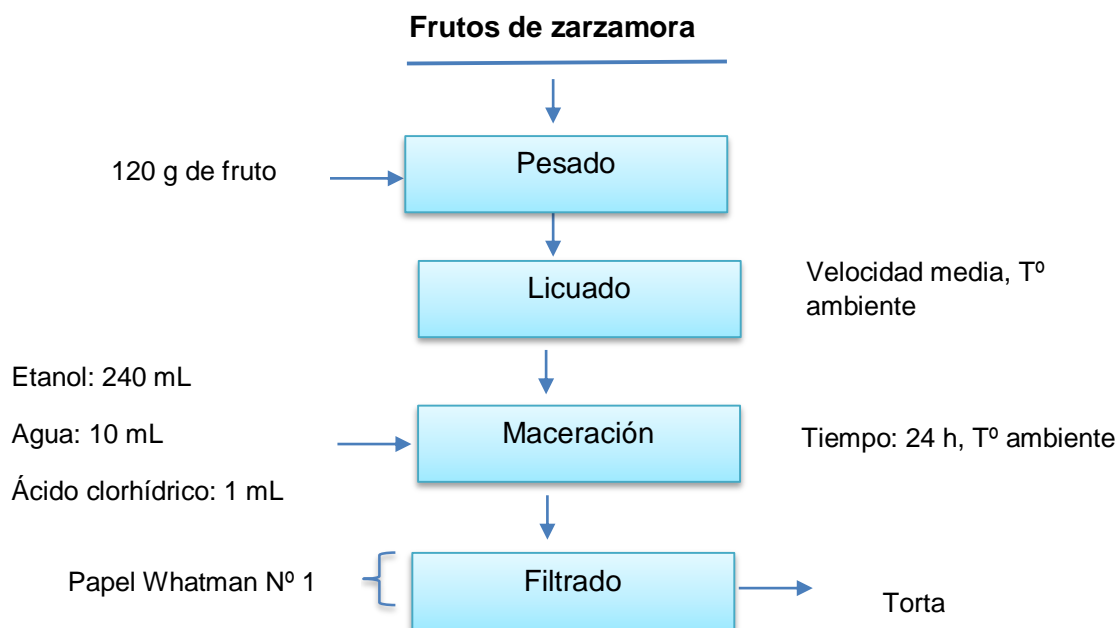


Figura 9. Diagrama de flujo para el rendimiento de extracción.

Fuente: (Fuentes, 2005)

Una vez obtenido el extracto filtrado de zumo (estabilidad y concentración de antocianinas totales) , se realizo la medición en una probeta (608,16 mL), este dato nos ayudo para poder determinar el rendimiento del zumo en 0,960 kg de frutos fresco de zarzamora.

El rendimiento de extracción se determinó para el zumo del fruto y para ello se utilizó la ecuación de Farfan (2011):

$$\% Rn = \frac{kg \text{ zumo de zarzamora}}{kg \text{ zarzamora fresca}} * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

4.4.3. Determinación del contenido de antocianinas totales (CAT) mediante el método pH diferencial

La concentración de antocianinas monomericas se determinó por el método de pH diferencial propuesta por Giusti y Wrolstad (2001).

Fundamento

Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio de pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma de oxonio coloreado predomina a pH 1 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5. El método de pH diferencial se basa en esta reacción y permite segura y rápidamente medir el total de antocianinas monoméricas, incluso en presencia de pigmentos degradados, polimerizados y otros componentes interferentes. Se utilizó un espectrofotómetro UV – visible, las mediciones fueron realizadas a 510 nm y 700 nm.

Preparación de buffers

✓ Buffer pH 1.0 (Cloruro de potasio 0,025 M)

Se pesó 1,86 g de cloruro de potasio (KCl) en un beaker, seguido se agregó agua destilada hasta los 980 mL. Enseguida se midió el pH y se ajustó a 1,0; con HCl concentrado (alrededor de 6,1 mL) y finalmente se transfirió a una fiola de 1 L y se enraso con agua destilada.

✓ Buffer pH 4,5 (Acetato de sodio 0,4 M)

Se diluyo 54,43 g de acetato de sodio ($CH_3CO_2Na \cdot 3H_2O$) en un beaker, seguido de ello, agregar 960 mL de agua destilada. Luego de ello se midió el pH y se ajustó a 4.5, con ácido clorhídrico (HCl) concentrado (20 mL). Finalmente se transfirió a una fiola de 1 L y se enraso con agua destilada.

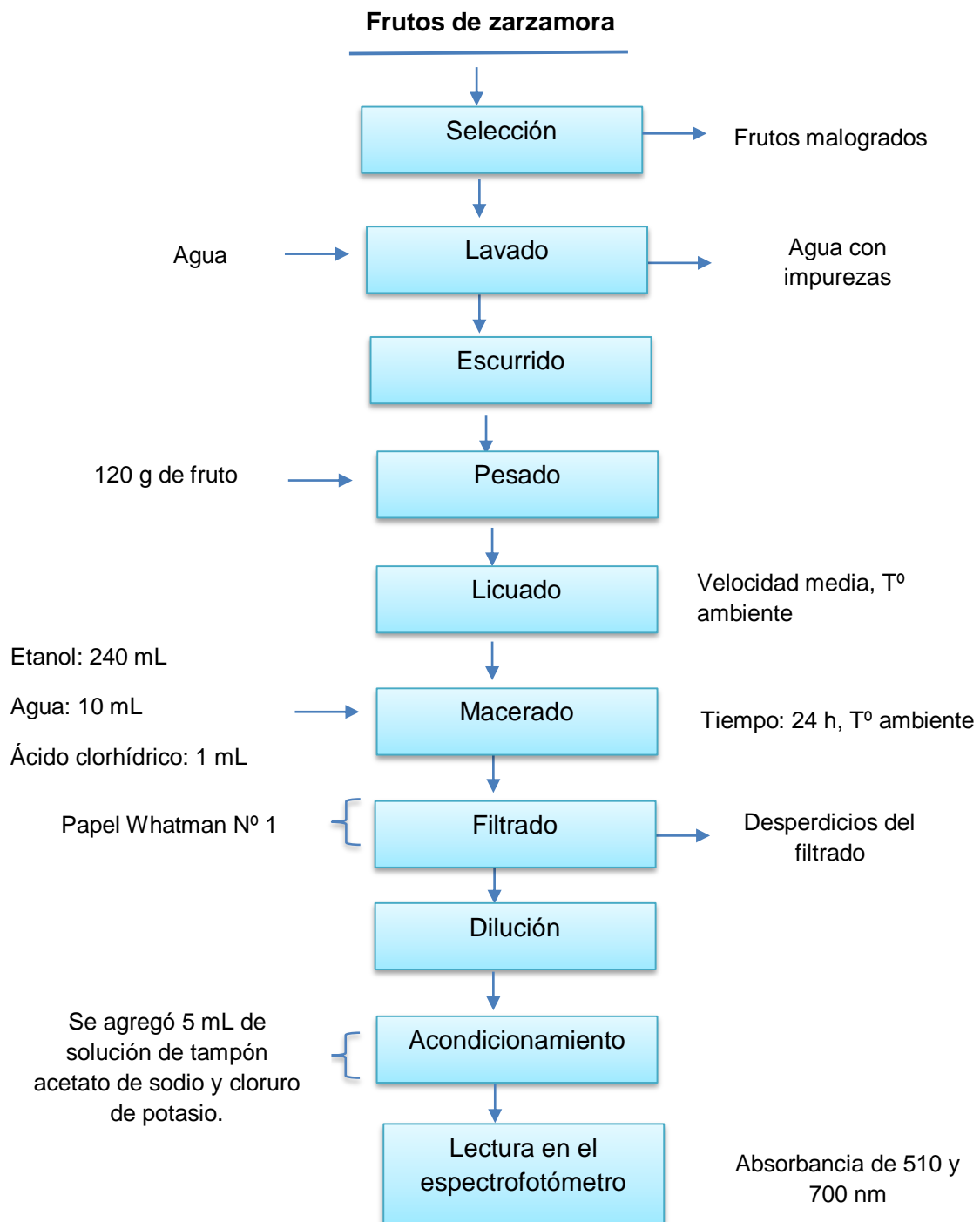


Figura 10. Diagrama de flujo para la determinación de concentración.

Procedimiento:

- ✓ **Pesado:** Pesamos 120 g de frutos, por tratamiento en total 960g.
- ✓ **Licuadao:** Los frutos de zarzamora fueron desintegrados en una licuadora a temperatura ambiente y velocidad media.
- ✓ **Macerado:** Los frutos licuados fueron transferidas a un Erlenmeyer de 500 mL, seguidamente se agregó a cada uno de las muestras etanol 95 % (240 mL), agua (10 mL) y ácido clorhídrico (1 mL), enseguida lo dejamos macerar durante 24 horas a temperatura ambiente, se utilizó papel aluminio para proteger de la luz, para evitar la degradación de las antocianinas.
- ✓ **Filtrado:** Lo realizamos con ayuda de Papel filtro (whatman N°1), esto con la finalidad de evitar el paso de residuos de los frutos licuados, ya que al pasar perjudicaría notablemente el resultado final, del cual obtuvimos el extracto diluido y torta. Las muestras filtradas fueron transferidas 5 mL a un beaker de 500 mL, posteriormente se midió las absorbancias de las muestras y dicha absorbancia se debe encontrarse por debajo de 0.8 y así cumplir con la ley de Beer, para ello las muestras que se encontraban por encima de 0.8 fueron diluidas.
- ✓ **Dilución:** Se determinó el factor de dilución apropiado para cada una de las muestras mediante la dilución con el buffer de cloruro de potasio pH 1 hasta que la absorbancia de cada una de las muestras a la máxima longitud de onda se encuentre dentro del rango lineal del espectrofotómetro. Se divide el volumen final de la muestra entre el volumen inicial para obtener el factor de dilución.
- ✓ **Acondicionamiento:** Se prepararon 2 diluciones de cada una de las muestras, una usando el buffer cloruro de potasio pH 1, y la otra usando buffer acetato de sodio pH 4.5, diluyendo cada uno con el factor de dilución previamente determinado. Dejando equilibrar estas diluciones durante 10 minutos. Seguido de ello se midió la absorbancia de cada dilución y la máxima longitud de onda determinada, en nuestro caso a 510 nm y 700 nm, usando como blanco agua destilada, todas las lecturas se realizaron entre los 10 a 12 minutos luego de realizada la preparación.
- ✓ Se calculó la absorbancia de la muestra diluida con la siguiente formula:

La concentración de las antocianinas se expresó como mg cianidina – 3 – glucósido / 100 mL.

Se calculó el cambio de absorbancia (A) de la muestra diluida utilizando la siguiente formula:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{pH=1} - (A_{510} - A_{700})_{pH=4.5} \quad \text{Ecuación 3}$$

Seguido de ello se calculó la concentración de pigmentos de antocianinas monomericas en la muestra original con la siguiente formula:

$$CAT \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{\epsilon * l} \left(\frac{v}{w} \right) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

CAT: Contenido de antocianinas totales (mg / L)

A: Cambio en la absorbancia.

PM: Peso molar de la cianidina – 3 – glucósido: 449,6 g / mol

FD: Factor de dilución

ϵ .: Coeficiente de extinción molar cianidina – 3 – glucósido: 26900 L / mol * cm

l: Longitud de paso de celda, 1 cm.

V: Volumen de aforo de extracto (mL)

W: Peso muestra (g)

10³: Factor de conversión de gramos a miligramos.

4.4.4. Determinación de Energía de activación (E_a)

Se trata de un modelo lineal que expresa el efecto de la temperatura sobre la constante de velocidad (k) de diferentes reacciones en muchos sistemas alimentarios.

La energía de activación se calculó a partir de la expresión de Arrhenius, como se puede ver en la ecuación 05 y para ello en primer lugar calculamos el valor de k con el grafico de Arrhenius.

$$k = k_0 \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\ln(k) = \ln(k_0) - \frac{E_a}{RT} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

k_0 : Factor pre exponencial.

E_a : Energía de activación.

R: Constante de los gases (1,987 cal / k mol).

T: Temperatura absoluta en kelvin (K).

Arrhenius descubrió que el gráfico del logaritmo de la constante de velocidad (ln k) en función de la inversa de la temperatura absoluta (1/ T), es una línea recta.

$$\ln k = \text{intersección} + \text{pendiente} * \frac{1}{T}$$

Cuando se grafica de la forma descrita anteriormente, el valor de la intersección en el eje Y corresponderá a ln (A) y la pendiente de la línea será igual a $-\frac{E_a}{R}$.

4.5. Diseño experimental**4.5.1. Matriz para el diseño factorial mixto 7 x 3 x 3**

Este diseño factorial mixto 7 x 3 x 3, consiste en trabajar en 7 y 3 niveles, respectivamente. Es decir; que el primer factor tiene 7 niveles, el segundo factor y tercer factor constan de tres niveles, en total 63 tratamientos (tabla 10) que corresponde a todas las posibles maneras en que se pueden combinar tres factores tiempo, temperatura y pH. Un diseño factorial mixto es cuando los factores a estudiar no tienen el mismo número de niveles (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

La necesidad de utilizar un diseño factorial mixto surge por las mismas razones de un factorial 3^k . La diferencia es que el diseño factorial mixto es más frecuente que se utilice cuando, por su naturaleza discreta o categórica, los factores tienen un número finito y distinto de niveles, el interés es estudiar todos los niveles. La otra razón, aunque menos frecuente en los diseños mixtos que en los factoriales 3^k , es la posibilidad de estudiar efectos de curvatura de los factores con más de dos niveles (Gutiérrez y De la Vara, 2012).

Tabla 10. Matriz de diseño experimental.

Nº trat.	Tiempo (Días)	Temperatura (°C)	pH	Absorbancia (A)	Antocianinas totales
1	0	0	3		
2	5	0	3		
3	10	0	3		
4	15	0	3		
5	20	0	3		
6	25	0	3		
7	30	0	3		
8	0	10	3		
9	5	10	3		
10	10	10	3		
11	15	10	3		
12	20	10	3		
13	25	10	3		
14	30	10	3		
15	0	20	3		
16	5	20	3		
17	10	20	3		
18	15	20	3		
19	20	20	3		
20	25	20	3		
21	30	20	3		
22	0	0	4		
23	5	0	4		
24	10	0	4		
25	15	0	4		
26	20	0	4		
27	25	0	4		
28	30	0	4		
29	0	10	4		
30	5	10	4		
31	10	10	4		
32	15	10	4		
33	20	10	4		
34	25	10	4		
35	30	10	4		
36	0	20	4		
37	5	20	4		
38	10	20	4		
39	15	20	4		
40	20	20	4		
41	25	20	4		

42	30	20	4
43	0	0	5
44	5	0	5
45	10	0	5
46	15	0	5
47	20	0	5
48	25	0	5
49	30	0	5
50	0	10	5
51	5	10	5
52	10	10	5
53	15	10	5
54	20	10	5
55	25	10	5
56	30	10	5
57	0	20	5
58	5	20	5
59	10	20	5
60	15	20	5
61	20	20	5
62	25	20	5
63	30	20	5

4.5.2. Análisis estadístico

El análisis estadístico es como sigue:

$$\gamma_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl};$$

$$i = 1, 2, \dots, a; j = 1, 2, \dots, b; k = 1, 2, \dots, c; l = 1, 2, \dots, n$$

Donde:

μ : Media general.

α_i : Es el efecto del nivel i - énesimo del factor A.

β_j : Es el efecto del nivel j del factor B.

γ_k : Es el efecto del nivel k en el factor C.

$(\alpha\beta)_{ij}; (\alpha\gamma)_{ik}; (\beta\gamma)_{jk}$: Representan efectos de interacción dobles (de dos factores) en los niveles ij, ik, jk.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$: Es el efecto de interacción triple en la combinación o punto ijk.

4.5.2.1. Hipótesis

Las hipótesis planteadas para la investigación fueron:

$$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_a = 0$$

$$H_A: \alpha_1 \neq 0 \text{ para alguna } i$$

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_b = 0$$

$$H_A: \beta_1 \neq 0 \text{ para alguna } j$$

$$H_0: \gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_c = 0$$

$$H_A: \gamma_1 \neq 0 \text{ para alguna } k$$

$$H_0: (\alpha \beta)_{ij} = 0 \text{ para todo } ij$$

$$H_A: (\alpha \beta)_{ij} \neq 0 \text{ para alguna } ij$$

$$H_0: (\alpha \gamma)_{ik} = 0 \text{ para todo } ik$$

$$H_A: (\alpha \gamma)_{ik} \neq 0 \text{ para todo } ik$$

$$H_0: (\beta \gamma)_{jk} = 0 \text{ para todo } jk$$

$$H_A: (\beta \gamma)_{jk} \neq 0 \text{ para todo } jk$$

4.5.3. Prueba de hipótesis

Estabilidad de antocianinas

Respecto al tiempo de almacenamiento (T)

El tiempo de almacenamiento tiene influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora.

- ✓ H_0 : Efecto del tiempo de almacenamiento = 0
- ✓ H_A : Efecto del tiempo de almacenamiento \neq 0

Respecto a la temperatura (T)

La temperatura tiene influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora.

- ✓ H_0 : Efecto de la temperatura = 0
- ✓ H_A : Efecto de la temperatura \neq 0

Respecto al pH

El pH tiene influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora.

- ✓ H_0 : Efecto de pH = 0
- ✓ H_A : Efecto de pH \neq 0

Respecto a la interacción de tiempo de almacenamiento y la temperatura

El tiempo de almacenamiento y la temperatura tienen influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora.

- ✓ H_0 : Efecto de tiempo de almacenamiento y la temperatura = 0
- ✓ H_A : Efecto de tiempo de almacenamiento y la temperatura \neq 0

Respecto a la interacción de la temperatura y pH

La temperatura y pH tiene influencia en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora.

- ✓ H_0 : Efecto de la temperatura y pH = 0
- ✓ H_A : Efecto de la temperatura y pH \neq 0

4.6. Diseño experimental (variables)

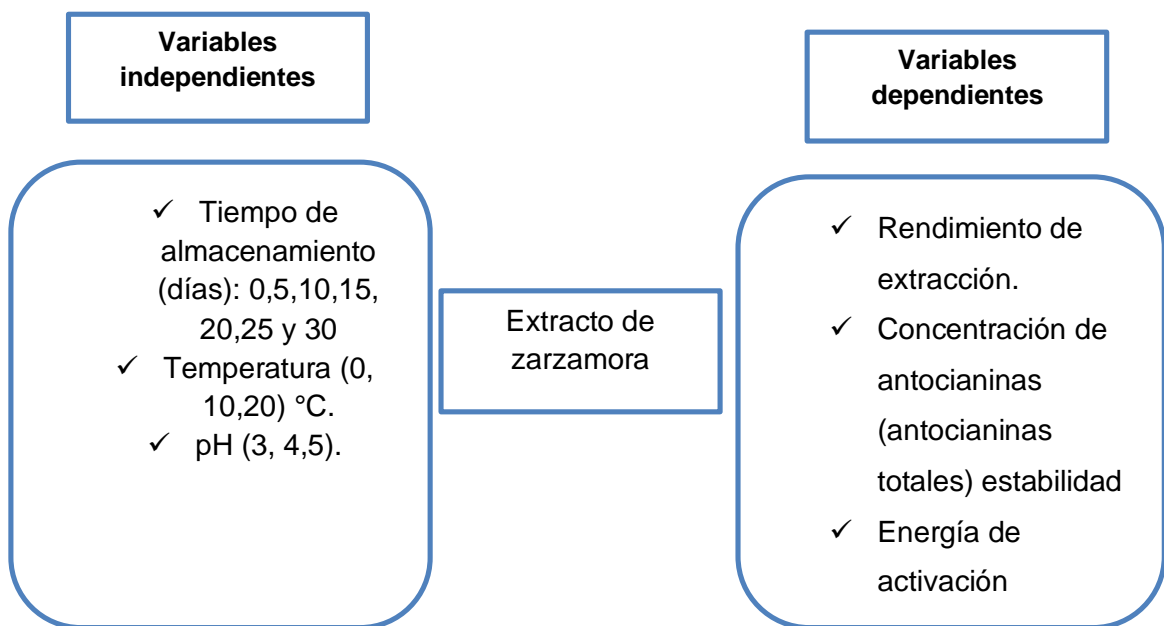


Figura 11. Diagrama de contrastación y variables

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

5.1. Determinando el rendimiento de extracción

La tabla 11 nos muestra el rendimiento de extracción, para ello se utilizó 960 g de zarzamora fresca y del cual se obtuvo 608,16 de zumo en la extracción, el cual arroja un rendimiento de 62,890 %.

Tabla 11. Rendimiento de extracción.

Nº	Zarzamora fresca (g)	Zumo (g)	% Rendimiento
1	960	608,16	63,350
2	960	605,01	63,022
3	960	598,05	62,297
Promedio			62,890

5.2. Determinación de la estabilidad de antocianinas

La tabla 12 nos muestra los datos obtenidos de la lectura en el espectrofotómetro (520 nm), durante el periodo de tiempo de almacenamiento (30 días) cada 5 días, en donde se observa para las temperaturas (0,10 y 20 °C) y pH (3,4 y 5) existe una disminución de acuerdo al tiempo de almacenamiento en el cual se realizó las lecturas.

Tabla 12. Resultado de lectura de las absorbancias

Nº Trat.	Tiempo (días)	Temperatura (° C)	pH	Absorbancia
1	0	0	3	0.294
2	5	0	3	0.275
3	10	0	3	0.266
4	15	0	3	0.262
5	20	0	3	0.251
6	25	0	3	0,248
7	30	0	3	0.234
8	0	10	3	0.227
9	5	10	3	0.221
10	10	10	3	0.218
11	15	10	3	0.214
12	20	10	3	0.208
13	25	10	3	0.212
14	30	10	3	0.205
15	0	20	3	0.215
16	5	20	3	0.210

17	10	20	3	0.198
18	15	20	3	0.188
19	20	20	3	0.164
20	25	20	3	0.124
21	30	20	3	0.121
22	0	0	4	0.305
23	5	0	4	0.245
24	10	0	4	0.241
25	15	0	4	0.234
26	20	0	4	0.212
27	25	0	4	0.239
28	30	0	4	0.218
29	0	10	4	0.194
30	5	10	4	0.213
31	10	10	4	0.302
32	15	10	4	0.225
33	20	10	4	0.212
34	25	10	4	0.313
35	30	10	4	0.222
36	0	20	4	0.214
37	5	20	4	0.229
38	10	20	4	0.146
39	15	20	4	0.122
40	20	20	4	0.125
41	25	20	4	0.109
42	30	20	4	0.114
43	0	0	5	0.128
44	5	0	5	0.119
45	10	0	5	0.266
46	15	0	5	0.245
47	20	0	5	0.223
48	25	0	5	0.239
49	30	0	5	0.221
50	0	10	5	0.255
51	5	10	5	0.242
52	10	10	5	0.237
53	15	10	5	0.210
54	20	10	5	0.212
55	25	10	5	0.214
56	30	10	5	0.207
57	0	20	5	0.205
58	5	20	5	0.203
59	10	20	5	0.189
60	15	20	5	0.167

61	20	20	5	0.137
62	25	20	5	0.126
63	30	20	5	0.108

5.2.1. Análisis de varianza (ANOVA)

En la tabla 13 se muestra efectos activos y no activos. Los efectos principales son tiempo de almacenamiento y temperatura y los de interacción son AB lineal y BB cuadrático. En ello se observa que el tiempo de almacenamiento y la temperatura tienen efecto en la estabilidad, con respecto al pH no presenta efecto alguno.

Tabla 13. Análisis de varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo	0,0120973	1	0,0120973	10,94	0,0017
B:Temperatura	0,0572762	1	0,0572762	51,80	0,0000
C:pH	0,00384771	1	0,00384771	3,48	0,0676
AA	0,00027264	1	0,00027264	0,25	0,6215
AB	0,01288	1	0,01288	11,65	0,0012
BB	0,0104413	1	0,0104413	9,44	0,0033
BC	0,00330057	1	0,00330057	2,98	0,0898
CC	0,000203175	1	0,000203175	0,18	0,6699
Error total	0,0597121	54	0,00110578		
Total (corr.)	0,160031	62			

El p – valor para el tiempo de almacenamiento (días) y la temperatura (°C) es menor a 0.05, entonces existe una diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, se deduce el tiempo de almacenamiento y la temperatura influyen en la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), con un nivel de confianza de 95 %. Sin embargo, el p – valor para el pH es mayor a 0.05, de lo cual podemos decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

R-cuadrada = 62,6872 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 57,1593 por ciento

El estadístico R- Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 62,6872 % de la variabilidad en la influencia del tiempo de almacenamiento y la temperatura. El

estadístico R – Cuadrada ajustada que es adecuado para comparar modelos con diferentes números de variables independientes, es 57,1593 %.

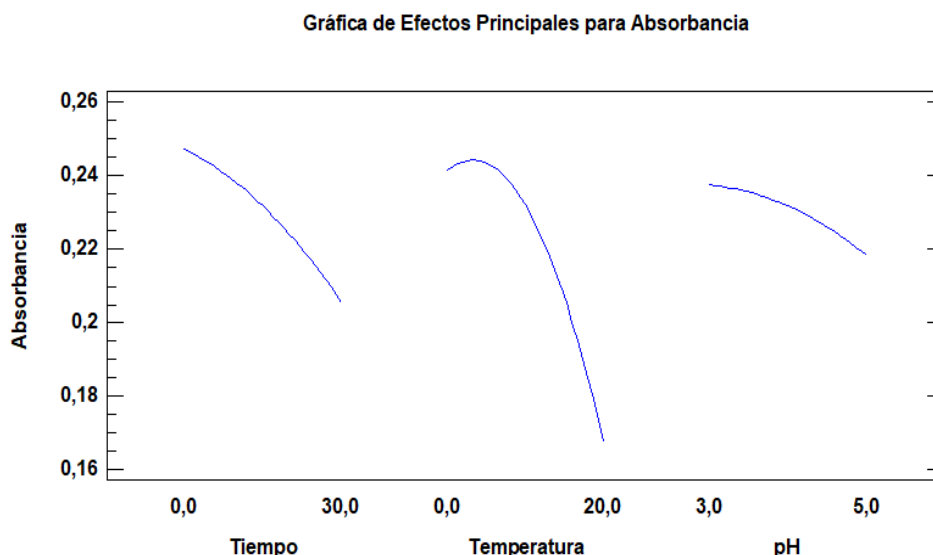


Figura 12. Grafica de efectos principales para estabilidad de antocianinas.

En la figura 13 de efectos principales para estabilidad, se observa que a menor tiempo de almacenamiento mayor es la estabilidad, del mismo modo a menor temperatura existe mayor estabilidad, es decir que el tiempo de almacenamiento y la temperatura influye en la estabilidad, y debido a ello se degrada fácilmente las antocianinas.

5.3. Hallando contenido de antocianinas totales (CAT)

Tabla 14. Antocianinas totales

Nº Trat.	Tiempo (días)	Temperatura (°C)	pH	pH 1.0		pH 4.5		CAT (mg / L)
				510	700	510	700	
1	0	0	3	0,494	0,031	0,285	0,300	111,246
2	5	0	3	0,475	0,030	0,271	0,298	109,850
3	10	0	3	0,466	0,069	0,587	0,655	108,221
4	15	0	3	0,462	0,065	0,590	0,650	106,359
5	20	0	3	0,421	0,044	0,336	0,390	100,308
6	25	0	3	0,410	0,045	0,406	0,471	100,075
7	30	0	3	0,394	0,050	0,410	0,472	94,489
8	0	10	3	0,397	0,050	0,307	0,350	90,766

9	5	10	3	0,388	0,049	0,303	0,335	86,344
10	10	10	3	0,368	0,039	0,288	0,320	84,016
11	15	10	3	0,364	0,051	0,310	0,321	75,405
12	20	10	3	0,352	0,048	0,312	0,318	72,147
13	25	10	3	0,342	0,045	0,308	0,319	71,682
14	30	10	3	0,335	0,054	0,306	0,310	66,329
15	0	20	3	0,325	0,060	0,320	0,320	61,674
16	5	20	3	0,321	0,045	0,318	0,310	62,372
17	10	20	3	0,298	0,040	0,312	0,308	59,114
18	15	20	3	0,290	0,038	0,310	0,298	55,856
19	20	20	3	0,268	0,036	0,298	0,276	48,874
20	25	20	3	0,254	0,039	0,286	0,254	42,590
21	30	20	3	0,251	0,030	0,307	0,238	35,375
22	0	0	4	0,484	0,031	0,285	0,300	108,919
23	5	0	4	0,475	0,030	0,271	0,298	109,850
24	10	0	4	0,466	0,069	0,587	0,655	108,221
25	15	0	4	0,462	0,065	0,590	0,650	106,359
26	20	0	4	0,451	0,044	0,336	0,390	107,290
27	25	0	4	0,438	0,045	0,406	0,471	106,591
28	30	0	4	0,429	0,050	0,410	0,472	102,635
29	0	10	4	0,415	0,050	0,307	0,350	94,955
30	5	10	4	0,409	0,049	0,303	0,335	91,231
31	10	10	4	0,398	0,039	0,288	0,320	90,998
32	15	10	4	0,391	0,051	0,310	0,321	81,689
33	20	10	4	0,385	0,048	0,312	0,318	79,827
34	25	10	4	0,367	0,045	0,308	0,319	77,500
35	30	10	4	0,355	0,054	0,306	0,310	70,983
36	0	20	4	0,351	0,040	0,320	0,320	72,380
37	5	20	4	0,349	0,030	0,318	0,310	72,380
38	10	20	4	0,339	0,040	0,312	0,308	68,656
39	15	20	4	0,327	0,038	0,310	0,298	64,467
40	20	20	4	0,319	0,036	0,298	0,276	60,743
41	25	20	4	0,305	0,039	0,286	0,254	54,459
42	30	20	4	0,297	0,030	0,307	0,238	46,081
43	0	0	5	0,218	0,028	0,310	0,360	55,856
44	5	0	5	0,210	0,020	0,312	0,358	54,925
45	10	0	5	0,196	0,023	0,306	0,352	50,968
46	15	0	5	0,185	0,030	0,312	0,348	44,452
47	20	0	5	0,183	0,033	0,320	0,346	40,961
48	25	0	5	0,179	0,035	0,316	0,336	38,168
49	30	0	5	0,175	0,028	0,298	0,322	39,797
50	0	10	5	0,355	0,040	0,297	0,328	80,525
51	5	10	5	0,342	0,038	0,312	0,324	73,543
52	10	10	5	0,337	0,036	0,315	0,321	71,449

53	15	10	5	0,298	0,032	0,307	0,316	64,001
54	20	10	5	0,272	0,028	0,304	0,315	59,347
55	25	10	5	0,254	0,028	0,298	0,310	55,390
56	30	10	5	0,232	0,026	0,268	0,310	57,718
57	0	20	5	0,235	0,032	0,299	0,370	63,769
58	5	20	5	0,203	0,030	0,290	0,380	61,209
59	10	20	5	0,189	0,030	0,294	0,378	56,554
60	15	20	5	0,167	0,028	0,294	0,372	50,503
61	20	20	5	0,137	0,028	0,292	0,368	43,055
62	25	20	5	0,126	0,026	0,289	0,360	39,797
63	30	20	5	0,108	0,024	0,286	0,358	36,306

5.3.1. Concentración de antocianinas totales (CAT) a 0 °C y pH 3

En la tabla 15, se observa que las antocianinas totales se fueron degradando a medida que fue transcurriendo el tiempo de tratamientos. Las antocianinas presentaron una importante disminución de concentración de antocianinas totales a temperatura de 0 °C.

Tabla 15. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
1	0	3	24	111,246
2	0	3	120	109,850
3	0	3	240	108,221
4	0	3	360	106,359
5	0	3	480	100,308
6	0	3	600	100,075
7	0	3	720	94,489

5.3.1.1. Constante de velocidad de degradación a 0 °C y pH 3

El orden de reacción de las antocianinas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple. Para el modelo de orden cero se realizó un gráfico de las concentraciones de antocianinas (mg /L de cianidina – 3 – glucósido) en el eje de ordenadas (coordenadas cartesianas) graficado con respecto al tiempo (h) en el eje de las abscisas, de lo cual se obtiene el valor de constante de velocidad de degradación.

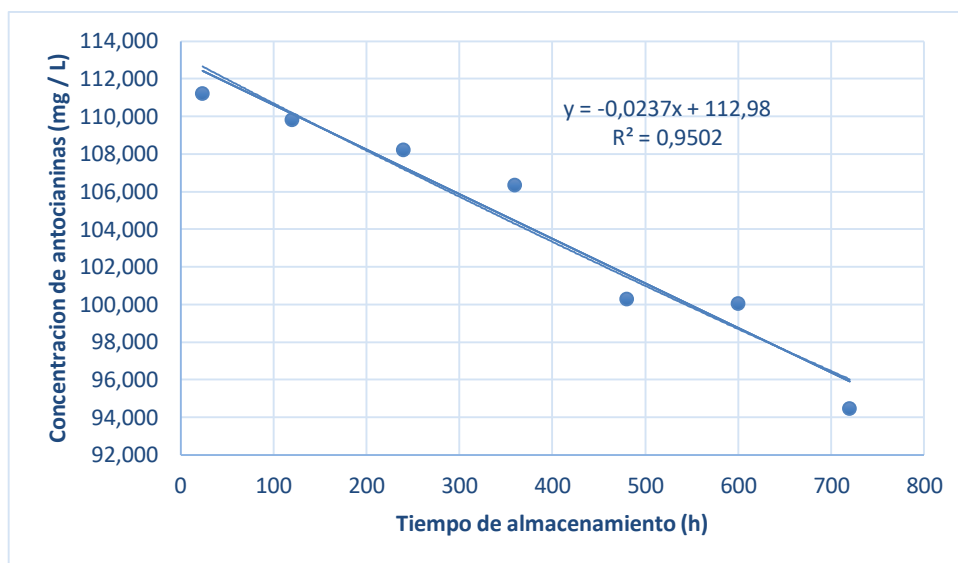


Figura 13. Gráfica de la concentración (mg / L) versus tiempo (h)

En la figura 14 se muestra la concentración de antocianinas totales a diferentes tratamientos de tiempo (h) y en ello se observa que existe una degradación y que a mayor tiempo de almacenamiento hay una mayor degradación.

5.3.2. Concentración de antocianinas totales (CAT) a 10 °C y pH 3

En la tabla 16 se observa que las antocianinas totales se fueron degradando a medida que fue transcurriendo el tiempo de tratamientos. Las antocianinas presentaron una importante disminución de concentración de antocianinas.

Tabla 16. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
1	10	3	24	90,766
2	10	3	120	86,344
3	10	3	240	84,016
4	10	3	360	75,405
5	10	3	480	72,147
7	10	3	600	71,682
8	10	3	720	66,329

5.3.2.1. Constante de velocidad de degradación a 10 °C y pH 3

El orden de reacción de las antocianinas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple. Para el modelo de orden cero se realizó un gráfico de las concentraciones de antocianinas (mg /L de cianidina – 3 – glucósido) en el eje de

ordenadas (coordenadas cartesianas) graficado con respecto al tiempo de almacenamiento (h) en el eje de las abscisas, de lo cual se obtiene el valor de constante de velocidad de degradación (k).

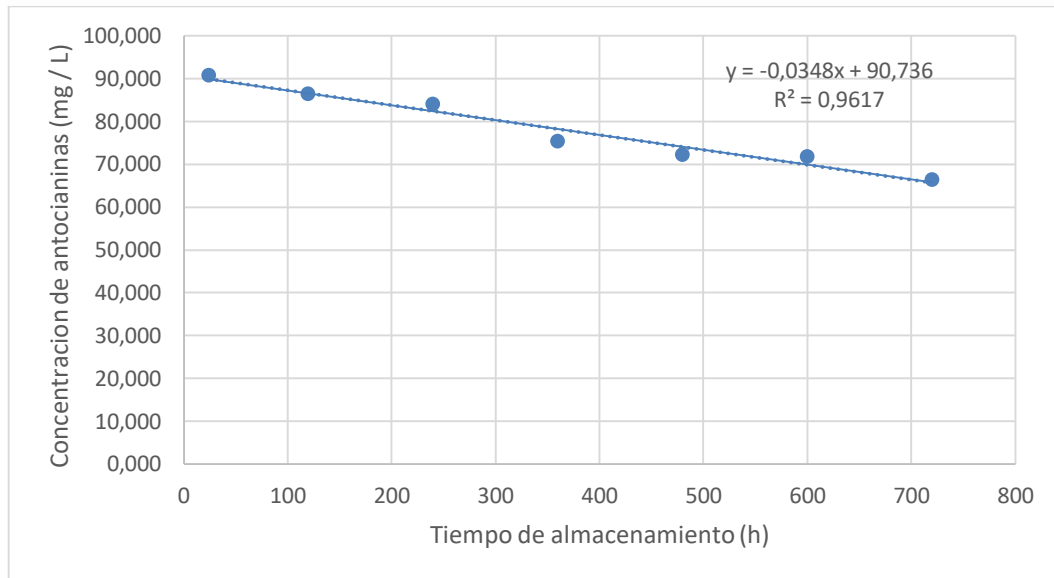


Figura 14. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento.

En la figura 15 se muestra la concentración de antocianinas totales a diferentes tratamientos de tiempo (h) y en ello observamos que existe una degradación que a mayor tiempo de almacenamiento hay una mayor degradación.

5.3.3. Concentración antocianinas totales (CAT) a 20 °C y pH 3

En la tabla 17 observamos que las antocianinas totales se fueron degradando a medida que fue transcurriendo el tiempo de tratamientos. Las antocianinas presentaron una importante disminución de concentración.

Tabla 17. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
01	20	3	24	61,674
02	20	3	120	62,372
03	20	3	240	59,114
04	20	3	360	55,856
05	20	3	480	48,874
06	20	3	600	42,590
07	20	3	720	35,375

5.3.3.1. Constante de velocidad de degradación a 20 °C y pH 3

El orden de reacción de las antocianinas se determinó mediante un análisis de regresión lineal simple. Para el modelo de orden cero se realizó un gráfico de las concentraciones de antocianinas (mg /L de cianidina – 3 – glucósido) en el eje de ordenadas (coordenadas cartesianas) graficado con respecto al tiempo (h) en el eje de las abscisas, de lo cual se obtiene el valor de constante de velocidad de degradación (k).

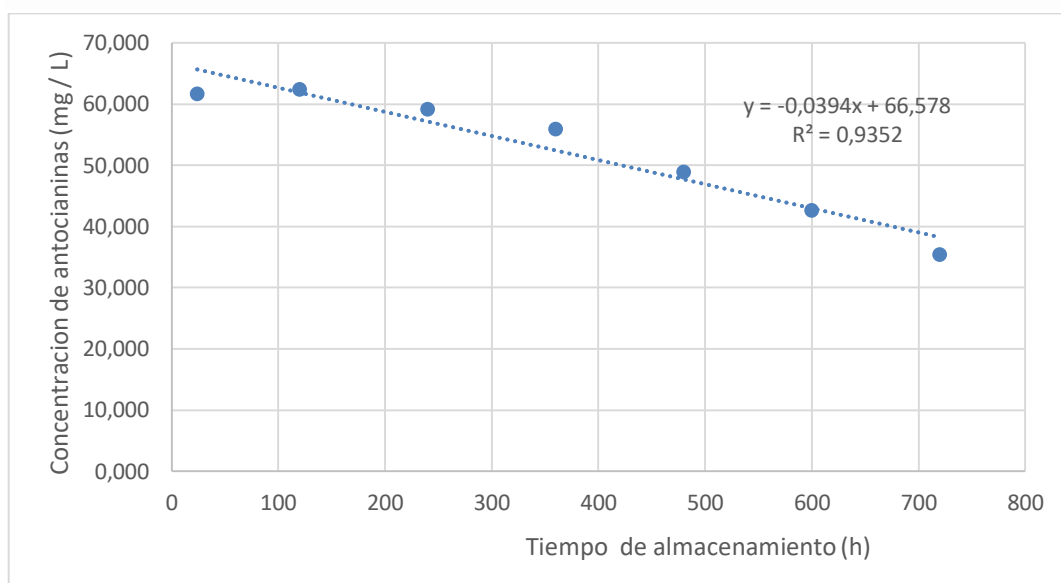


Figura 15. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento.

En la figura 16 se muestra la concentración (antocianinas totales) a diferentes tratamientos de tiempo (horas) y en ello se observa que existe una degradación que a mayor tiempo de almacenamiento hay una mayor degradación.

El mismo procedimiento se realizó para el pH 4 y 5.

5.4. Determinación de la Energía de activación (E_a)

5.4.1. Energía de activación para el extracto a pH 3

En la tabla 18, se observa los valores de k, obtenidos en la gráfica anterior de concentración versus tiempo (h), en ello se aplicó el logaritmo natural ($\ln k$), y se hizo el gráfico de Arrhenius de donde se obtiene el valor de la pendiente.

Tabla 18. Energía de activación para el extracto a pH 3

pH	T (°C)	T (K)	1/T (K)	k	LN (k)
3	0	273	0,0037	0,0237	-3,7423
3	10	283	0,0035	0,0348	-3,3581
3	20	293	0,0034	0,0394	-3,2340

5.4.1.1. Grafica de Arrhenius (LN k versus 1/ T)

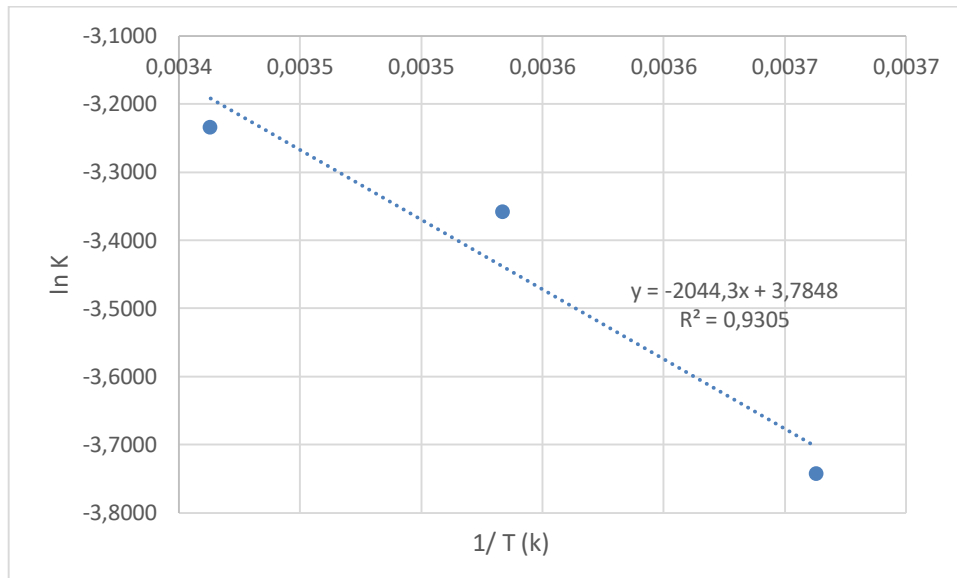


Figura 16. Grafica de Arrhenius para la determinar energía de activación.

En la figura 17 observamos la gráfica de ln (k) versus 1/ T, con ello determino la energía de activación, reemplazando los valores en ecuación 4:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{R} * \frac{1}{T}$$

$$- \frac{E_a}{R} = \text{pendiente} = - 2044,3$$

$$E_a = 4062,02 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$$

Llevamos $\frac{\text{Kcal}}{\text{mol}}$ a kJ/mol y es como sigue:

$$1 \text{ kJ} = 0,239006 \text{ Kcal}$$

$$E_a = 4062,02 \frac{\text{Kcal}}{\text{mol}} * \frac{1 \text{ kJ}}{0,239006 \text{ Kcal}}$$

Se obtiene:

$$E_a = 16,99 \text{ kJ/mol}$$

En la tabla 19 se observa que a pH 3 se obtuvo un valor de energía de activación de $E_a = 16,99 \text{ kJ/mol}$, es decir, que esta es la cantidad de energía que se necesita para que se dé inicio de la degradación, a pH 4 $E_a = 51,48 \text{ kJ/mol}$ y pH 5 $E_a = 13,77 \text{ kJ/mol}$.

En resumen tenemos los valores de energía de activación a diferentes pH:

Tabla 19. Energía de activación a diferentes pH

pH	Energía de activación E_a (kJ/ mol)
3	16,99 kJ/mol
4	51,48 kJ/mol
5	13,77 kJ/mol

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

6.1. Rendimiento de extracción

El rendimiento de extracción que obtuvimos en el zumo del fruto de zarzamora es 62,890 %. Como observamos el rendimiento en zumo del fruto de zarzamora es considerable ya que Farfán (2011), obtuvo un rendimiento de 40 % en 1 kg de los frutos de siraca. La diferencia se debería a que Farfán utilizó el sistema de extracción por lixiviación, y nosotros en la investigación utilizamos el sistema de extracción sólido – líquido.

6.2. Estabilidad de antocianinas

En el trabajo de investigación se obtuvo que existen diferencias significativas con p – valor es $< 0,05$ para los factores de tiempo y temperatura con un nivel de confianza del 95 % y su interacción cuadrática BB, así como también la interacción lineal AB (anexo 9) tienen influencia sobre la estabilidad de las antocianinas, por lo tanto, para los factores de tiempo, temperatura y la interacción AB se acepta la hipótesis alterna y se rechaza la hipótesis nula.

Sin embargo, el factor pH no tiene influencia en la estabilidad de las antocianinas debido a que p – valor es > 0.05 con un nivel de confianza del 95 %, además, la interacción cuadrática CC y la interacción lineal BC no tienen efecto sobre la estabilidad de antocianinas, por lo tanto, para el factor pH y la interacción lineal BC se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna.

Torres y Pulgar (2017), llegaron a determinar que las variables temperatura y pH (cuatro semanas), en la extracción del pigmento de mortiño y la evaluación de su estabilidad, influenciaron significativamente en el pigmento, manteniéndose estable a bajas temperaturas y con respecto al pH el efecto fue contrario, a menor pH es más estable y a pH superior se decolora, la exposición a la luz también afecta la estabilidad siendo más estable a condiciones de oscuridad.

Chávez (2014), concluyó que al aumentar la temperatura y el pH de las antocianinas son menos estables, es decir, de los tres extractos, el de rábano es el más estable ya que sus valores de constante de rapidez fueron los menores y los de tiempo de vida media los mayores, mientras que el extracto de camote es el menos estable.

Aroni (2013), concluyo al evaluar la estabilidad de las antocianinas presentes en frutos de Capachu, Cheqche Huancachu y Alaybili, se mantienen estables a temperaturas bajas y pH bajos.

Además Almeida (2012), dedujo que las antocianinas al igual que otros pigmentos de origen natural, son sensibles a la temperatura y el pH, y determino que el extracto colorante de las antocianinas del maíz negro permanece estable a rangos de pH (2 – 6) y a temperatura (10 y 50 °C) y el tiempo de vida útil del extracto solido de las corontas de maíz negro es de 60 días, si se almacena sellado al vacío en envases de color ámbar y en un lugar fresco y seco, a diferencia del extracto liquido, que debido a su elevada actividad de agua se degrada en 30 días.

Sin embargo, Mandujano (2006), dedujo que el principal factor que afecto significativamente la estabilidad del pigmento fue la temperatura y que degrado casi en su totalidad. A mayor temperatura mayor degradación del pigmento y el pH fue otro factor que tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad del pigmento, siendo mas estable a pH bajos.

Fuentes (2005), concluyo que la temperatura y el pH influyen en la estabilidad de antocianinas, siendo mas estables estos pigmentos en frutos de cereza pH 4 y , mora pH 5 y sauco pH 5.

6.3. Concentración antocianinas totales (CAT)

En el presente trabajo de investigación obtuvimos que a menor temperatura (0 °C) existe una concentración de antocianinas totales (CAT) mayor y a mayor temperatura (20 °C) hay una menor concentración de antocianinas totales, por ello se deduce que existe una degradación en la concentración de antocianinas de los frutos de zarzamora, esto debido a las temperaturas tomadas en cuenta y al tiempo de almacenamiento (30 días), sin embargo Zapata (2014), indica que la degradación es causada por la oxidación de antocianinas y esto se vería potenciada por el alto contenido de agua que posee el fruto, ya que en este tipo de matrices puede disolverse mayor cantidad de oxígeno y la degradación de antocianinas aumento con el incremento de temperatura, manteniéndose estable a bajas temperaturas. Y según Mandujano (2006), dedujo que mayor temperatura mayor degradación del pigmento (antocianinas).

6.4. Energía de activación (E_a)

En el presente trabajo de investigación obtuvimos un valor de energía de activación de $E_a = 16,99$ kJ / mol a pH 3, $E_a = 51,48$ kJ / mol a pH 4 y $E_a = 13,77$ kJ / mol a pH 5 en el extracto de zarzamora, según Huarancca (2019), obtuvo valores de energía de activación de $E_a = 13,783$ kcal / mol (57,67 kJ / mol) en el extracto de alaybili, $E_a = 15,223$ kcal / mol (63,69 kJ / mol) en el extracto de macha macha, mientras que Zapata (2014) obtuvo un valor de energía de activación de $E_a = 51,60$ kJ / mol en el sistema de extracción sólido – líquido (ESL) y $E_a = 61,94$ kJ / mol en el sistema de extracción por fermentación(EF) en el extracto de arándanos, pero también Torres y Vidaurre (2015), obtuvieron una energía de activación $E_a = 12.7957$ Kcal / mol (53,53 kJ / mol) en una bebida funcional a base de arándano azul; estos valores obtenidos indican la cantidad de energía que se requiere para que inicie el deterioro de las antocianinas en los extractos de los diferentes frutos evaluados.

En conclusión, la diferencia de los valores de energía de activación que se obtuvieron se debería a las distintas condiciones de tratamientos de temperatura, condiciones, sistemas de extracción y al tipo de fruto evaluado.

CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la influencia de la temperatura y el pH en un determinado periodo de tiempo de almacenamiento en la estabilidad de antocianinas de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*). En el caso de la temperatura y el tiempo de almacenamiento se observó que tienen influencia en la estabilidad. Pero, sin embargo, el pH no presenta efecto alguno en la estabilidad de antocianinas, estos también se verían afectados por el ambiente en el cual fueron evaluados, ya que en ausencia de luz existe una mayor estabilidad de antocianinas.
- ✓ El rendimiento de extracción del zumo de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*), que obtuvimos es un valor promedio de 62,890 % en 0.960 kg de fruto fresco.
- ✓ La concentración de antocianinas totales (CAT) que se determinó es que a temperatura baja (0 °C) y pH 3 se tiene mayor concentración de estas y a temperatura alta (20 °C) y pH 5 se tiene menor concentración, esta diferencia se observa también de acuerdo al transcurso del tiempo de almacenamiento al cual fue evaluado, por lo cual se deduce que la temperatura, pH y tiempo de almacenamiento influyen en la concentración de antocianinas totales (CAT), de acuerdo a los valores obtenidos.
- ✓ La energía de activación que se determinó por efectos de diferentes temperaturas y pH, en un determinado tiempo de almacenamiento es de $E_a = 16,99 \text{ kJ / mol}$ a pH 3, $E_a = 51,48 \text{ kJ / mol}$ a pH 4 y $E_a = 13,77 \text{ kJ / mol}$ a pH 5, la diferencia de la energía de activación, que se observa es que a pH 5 se obtuvo un menor valor de energía de activación.

RECOMENDACIONES

- ✓ Con mayores determinaciones químicas, análisis proximal y el conocimiento de su estabilidad, se podría aplicar las antocianinas en la industria, para reemplazar los colorantes sintéticos.
- ✓ Realizar extracciones de antocianinas en diversos frutos los cuales pertenezcan al género *Rubus* y así poder determinar los beneficios de cada uno de ellos, lo cual permitiría promocionar estos productos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril Díaz, N., Bárcena Ruiz, A., Fernández Reyes, E., y Galván Cejudo, A. (2008). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Córdoba : Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Adams, J. (1973). *Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3 - glycosides of cyanidine. I. In acidified aqueous solution at 100 °C* . Journal of Science and Food Agriculture, 24, 747 - 750.
- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., y Meza, J. (2011). *Propiedades funcionales de las antocianinas*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, 8 (2), 16 - 22.
- Almeida. (2012). *Extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (Zea mays L.) y su determinación de su actividad antioxidante*.
- Andrade Esquivel, E., Morales Guzmán, J., y Ortiz Calderón, A. L. (2006). *Aumento en producción de Zorzal y Frambuesa*. Sagarpa, Departamento de Ingeniería Bioquímica.
- Arenas, S, I., y López, S, J. (2004). *Espectrofotometría de absorción*. Cuernavaca. Mor: Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México
- Aroni, J. (2013). *Evaluación de la estabilidad de antocianinas presentes en los frutos de hesperomeles escalloniifoliaschldl (capachu), berberis cummutataeicher (huancachu), berberis humbertianaj.f.macbr (cheqche) y vacciniumflori bundumkunth (alaybili) frente al pH y temperatura*. Tesis de pregrado.
- Badui. D. (1993). *Química de los alimentos*. México.: Addison Wesley Longman.
- Betelleluz, I. (2006). *Estudio de las antocianinas y evaluación de su estabilidad en extractos de mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz y Pavon)*. Lima - Peru: Tesis para optar el Grado de Maestro de Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina .
- Biosynthesis, Metabolic Engineering of Anthocyanin (Appl Environ Microbiol). (2005). Pubmed Result.
- Burriel. (2008). *Química Analítica Cualitativa*.

- Cacace y Mazza, G. (2003). *Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries*. Journal of Food Engineering, 59, 379 - 389.
- Cajuste, B. J., López, L., Rodríguez, J., y Reyes, M. I. (2000). *Caracterización fisicoquímica de tres cultivares introducidos de Zazzamora Erecta (Rubus sp)*. Fruticultura. Colegio de Postgraduados.U.A.Chapingo. Mexico.
- Calzada, R. J. (2016). *Frutas del bosque arándano, frambuesa, zazzamora. Mexicanas*. Sagarpa, Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación., 3 , 16,22.
- Casp, A., y Abril, J. (2003). *Procesos de conservacion de alimentos*. 2ª edicion. Mundi Prensa.
- Casp, V. A. (1998). *Procesos de conservacion de alimentos*. Mundi - Prensa.
- Castañeda, A., y Guerrero, J, A. (2015). *Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: Antocianinas*. 9: 25 - 33: Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos.
- Castañeda,O, A; Pacheco, H, M; Paez, H, M.; Rodriguez, J, A; Galan, V, C. (2009). *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry, 113 : 859 - 871.
- Centeno, M. (2003). *Extracción, estabilización y evaluaciones analíticas del Carmín*. Centro de investigación en ciencia aplicada y tecnología avanzada. México
- Ceron, B. (2008). *Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zazzamora*. Cholula, Puebla, México.: Tesis para optar el Titulo de Ingeniero Químico y alimentos. Universidad de las Américas y Ciencias.
- Chávez, O. (2011). *"Cultivo y manejo de la zazzamora"*. Tesis para optar el titulo de biólogo, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán. México.
- Clifford, M. (2000). *Anthocyanins - nature , ocurrence and dietary burden*. Journal of the Science of Food and Agriculture., 80, 1063-1072.
- Cooper - Driver, G. (2001). *Contributions of Jeffrey Harborne and co - workers to the study of anthocyanins*. Phytochemistry, 56, 229 - 236.

- Coronado, G. M., García, P. M., Santiago, H. V., Córdova, Y. A., y Vásquez, N. R. (2014). *La zarzamora, un mercado potencial para los productores agropecuarios de la sierra de Sonora*. Revista Mexicana de Agro negocios pp, 784 – 79.
- Coultate, T. (1998). *Manual de química y Bioquímica de los Alimentos*. Zaragoza: 2da Ed. 366 pp.
- De Anda Cardenas, P. (2006). *Química*. Mexico: Umbral.
- Del Valle, G., Gonzales, A., y Báez, R. (2012). *Grape anthocyanins (Vitis vinifera) and their relation to color*. Red de Revistas Científicas de America Latina y el Caribe, España y Portugal. , Vol. 28 (4) pp. 359 - 368.
- Devi, S., Saravanakumar, M., y Mohandas, S. (2012). *The effects of temperature and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (Sorghum bicolor) bran. African*. Journal of Food Science., 6: 567 - 573.
- Durst, R. (2001). *Separation and characterization of anthocyanins to color lowacid dairy products*. EE.UU: Chemistry John Wiley y Sons.
- Estevez, L., y Mosquera, R. (2009). *Conformational and substitution effects on the electron distribution in a series of anthocyanidins*. Journal of Physical Chemistry, 113, 9908-9919.
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., y Gu, F. (2008). *Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture*. LWT - Food Science and Technology , 1412 - 1416.
- Farfán, Dávalos, F. (2011). *Extracción de antocianinas del fruto de la siraca (Robus robustus P) por lixiviación y secadas por atomización*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. Apurímac – Perú.
- Fennema, O. (2000). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Fennema, O. (2010). *Química de los Alimentos*. Zaragoza: Editorial. ACRIBIA , S.A.
- Fennema. (2008). *Química de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Garzon, G. (2008). *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos*. Universidad Nacional de Colombia. 13: 27 - 36.

- Giusti y Wrolstad. (2001). *Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV – Visible Spectroscopy*. Current Protocols: in Food Analytical Chemistry., 1-13.
- Gonzales, P. (2013). *Extracción y caracterización de los antioxidantes secundarios del romero (Rosmarinus officinalis L.) para promover la obtención y aplicación de antioxidantes naturales sobre grasas y aceites*. (Tesis). Universidad técnica de Ambato - Ambato Ecuador, 32.
- Gutiérrez Pulido, H., y De la Vara Salazar, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw Hill.
- Hager, T., Howard, L., y Prior, R. (2008). *Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products*. Journal and Agricultural and Food Chemistry, 56: 689 - 695.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., y Debski, H. (2008). *Anthocyanins of Fruits and Vegetables - their occurrence, analysis and role in human nutrition*. En: Vegetables Crops Research Bulletin. Vol. 68, p. 5 - 22.
- Hosseinian, S., y Beta, T. (2007). *Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanins contents than other Manitoba berries*. Agric. Food Chem. 55.10832 - 10838.
- Hou, F. X., Wang, S., y Hu, Y. Y. (2003). *Effects of noise on antioxidant enzymes of cochlea in guinea pigs*. Zhonghua lao dong wei sheng zhi ye bing za zhi. Zhonghua laodong weisheng zhiyebing zazhi Chinese. Journal of industrial hygiene and occupational diseases. Vol. 21, N° 2, pag. 121 – 123.
- Huaranca, H. E. (2019). *Cinética de la degradación térmica de las antocianinas en extracto de Alaybili (Vaccinium floribundum Kunth) y Macha macha (Gaultheria glomerata (Cav). Sleumer)*. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac.
- Ibarra, L., Romero, V., Meuly, R., y Hurtado, B. (2013). *Estudio de factibilidad para la comercialización de zarzamora en mercados internacionales*. Revista internacional administración y finanzas., 6 (2): 57 - 71.

- Ibarz, A. (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: Mundi - Prensa S.A.
- Kenkel, J. (1992). *Analytical Chemistry refresher manual*. Chelsea, Lewis Publishers, pag.358.
- Kopjar, M., y Pilizota, V. (2009). *Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage*. Croatian Journal of Food Science and Technology., 1: 16 - 20.
- La Mora, S. (1989). *La mora, federación nacional de cafetaleros de Colombia. Litografía cafetalera Ltda. Manizales. Revista. Colombia., 19.*
- Labuza. (1984). *Application of chemical kinetics to deterioration of foods*. Journal Chemical Education.
- Laleh, G., Frydoonfar, R., Heidary, R., Jameei, R., y 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(1), 90-92.
- Limaymanta Solano, M. L., y Ramos Ibañez, I. A. (2016). *Extracción y cuantificación de antocianinas monoméricas totales del cultivo Macha Macha sp*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Centro del Perú. Tarma , Perú.
- Lopez. (2006). *Variedades de especies de frutos pequeños apropiados para climas sub tropicales: la experiencia de Mexico*. Mercosul., 87 - 90.
- Maatta, R, K., Kamal, E, A., Mattila, P, H., Gonzales, P, A., y Torronen, A, R. (2004). *Distribution and contents of phenolic compounds in eighteen Scandinavian berry species*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (14), 4477 - 4486.
- Mandujano, R. (2006). *Estudio preliminar de los pigmentos presentes en cascara de pitaya (Stenocereus stellatus) de la región de Mixteca*. Huajuapán de León, Oaxaca. Universidad Tecnológica de Mixteca.
- Manfred, H. (1999). *Métodos espectroscópicos en química orgánica*. Madrid.: Síntesis . S.A.
- Markakis, P. (1982). *Stability of anthocyanins in foods* . Academic Press.

- Marquez,L, Torres,F., y Pretell, C. (2007). *Antocianinas totales, fenoles totales y actividad antioxidante de frutas*. Trabajo de Investigacion en la Escuela Profesional de Ingenieria en Industrias Amilentarias UPAO.
- Medina, G. (2012). *Extraccion del colorante antocianina a partir del maiz morado y su aplicacion en la industria alimentaria*. Universidad Nacional Jose Faustino Sanchez Carrion . Huacho - Peru.
- Mendoza, C. (2012). *Las antocianinas del maiz : su distribucion en la planta y produccion*. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias.
- Muratalla, L. (1993). *El cultivo de la zarzamora y frambuesa en Mexico*. CITLAMEX S.C.
- Nicaragua. (2004). *Cadena Agroindustrial Etanol, consultado el 18 de julio del 2017*. Disponible en , [http : // repiica. iica.int/docs/B0014e.pdf.](http://repiica.iica.int/docs/B0014e.pdf), 24.
- NPC. (2006). *Anthocyanins as food dyes*. Natural Products Chemistry .
- Owusu, A. (2005). *Chemistry Postharvest. En : Introduction to Food Chemistry*. Unites States of America: CRC Press.
- Peguero, F. (2007). *Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo (Phaseolus vulgaris L.) cultivadas en Honduras*. Zamorano Carrera de Agroindustria Alimentaria.
- Peña, A., Arroyo, A., Gomez, A., Tapia, R., y Gomez, C. (2005). *Bioquimica*. Limusa, Noriega Editores, Mexico.
- Practicas de Quimica Aplicada (2013) . *Grado en Nutricion humana y dietetica*.
- Rein. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins* . Chemistry and Microbiology.
- Sagarpa. (2006). *Secretaria de agricultura, ganaderia, desarrollo rural y pesca. Aumento en produccion de zarzamora y frambuesa en Mexico*. Sagarpa boletines.
- Santacruz, L. (2011). *Analisis quimico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Tesis de postgrado.

- Tardio, J., Pascual, H., y Morales, R. (2002). *Alimentos silvestres de Madrid. Guia de plantas y setas de uso alimentario tradicional en la Comunidad de Madrid*. Madrid: Ediciones La Libreria.
- Tonan, R., Brabet, C., y Hubinger, M. (2010). *Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray - dried acai (Euterpe oleracea Mart) juice produced with different carrier agents*. Food Research International, 43 (3), 907 - 914.
- Torres Mayanquer, F. G., y Pulgar Oleas, N. L. (2017). *Evaluacion de la estabilidad del pigmento natural obtenido a partir de mortiño (Vaccinium mytillus L.) como colorante para la industria de alimentos*. Universidad Politecnica Estatal del Carchi (UPEC) - Ecuador.
- Torres Alcantara, Y. S., y Vidaurre Ruiz, J. M. (2015). *Cinetica de la degradacion de compuestos fenoles y antocianinas en una bebida funcional a base de arandano azul (Vaccinium corymbosum L.)*. Rev. Ingenieria: Ciencia, Tecnologia e Innovacion .
- Ullauri, A. (2010). *Transporte de masa en extraccion fase solido - liquido*. Cali, Colombia: Reciteia.
- Vuarant, C; Lesa, C; Zapata, L; Montti, M; Paz , J; Carbonell, J. (2013). *Estudios de parametros de calidad en pasas de arandanos en un proceso de deshidratado por infrarrojos en : Arandanos, Avances Cientificos - Tecnologicos en la region de Salto Grande*. Facultad de Ciencias de la Alimentacion - Universidad Nacional de Entre Rios.
- Wrolstad. (2004). *Anthocyanin pigments - Bioactivity and coloring properties*. J.Food Sci., 69(5), C419 - C421.
- Wrolstad, R., y Giusti, M. (2003). *Antocianos acilados de fuentes alimenticias y sus aplicaciones en los sistemas alimentarios*. 217 - 225.
- Wrolstad, R., Durst, R., y Lee, J. (2005). *Trancking color and pigment changes in anthocyanin products*. Trends in Food Science y Technology, 16, 423 - 428.

Zapata, L. (2014). Obtencion de extracto de antocianinas a partir de arandanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria. España: Universidad Politecnica de Valencia.

ANEXO

Anexo 1. Panel fotográfico de los frutos de zarzamora.



Anexo 2. Panel fotográfico de la selección de los frutos de zarzamora.



Anexo 3. Panel fotográfico de la extracción de antocianinas



Anexo 4. Panel fotográfico de la extracción y acondicionamiento.



Anexo 5. Panel fotográfico de filtrado y centrifugado.



Anexo 6. Panel fotográfico de medición de pH y acondicionamiento.



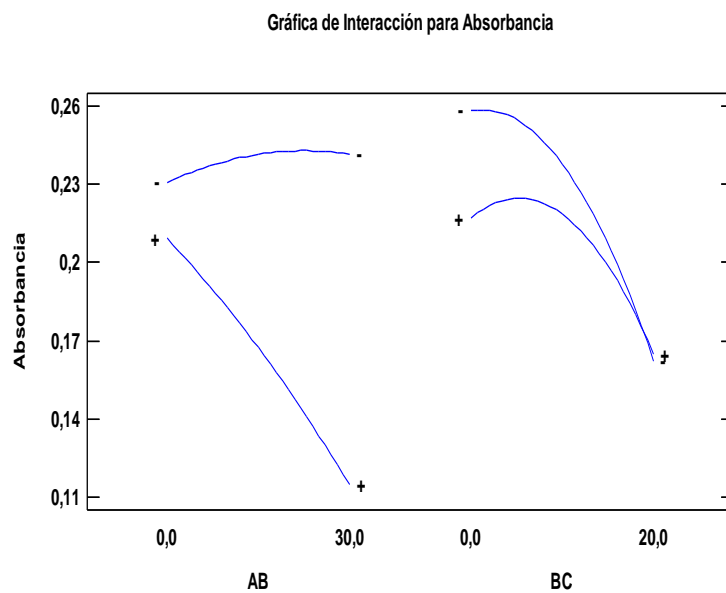
Anexo 7. Panel fotográfico de la lectura (absorbancia) en el espectrofotómetro.



Anexo 8. Panel fotográfico de la medición de pH para antocianinas totales.



Anexo 9. Gráfica de interacción para la absorbancia.



Anexo 10. Contenido antocianinas totales (CAT) a pH 4

Tabla 20. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº TRAT.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
1	10	4	24	108,919
2	10	4	120	109,850
3	10	4	240	108,221
4	10	4	360	106,359
5	10	4	480	107,290
6	10	4	600	106,591
7	10	4	720	102,635

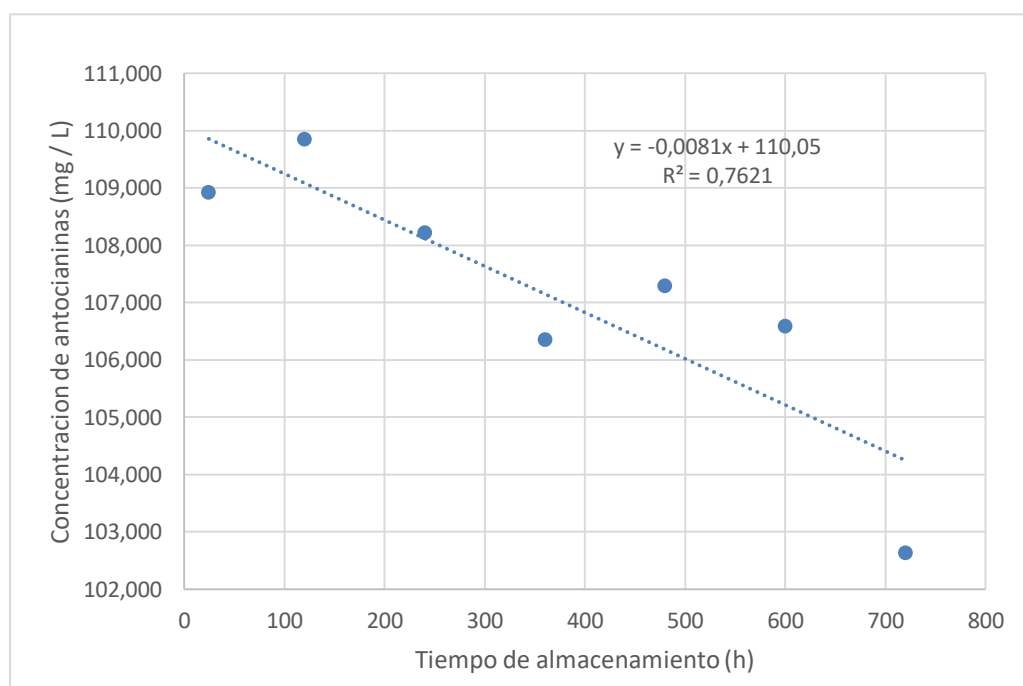


Figura 17. Grafica de la concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Tabla 21. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	AT (mg / L)
1	10	4	24	94,955
2	10	4	120	91,231
3	10	4	240	90,998
4	10	4	360	81,689
5	10	4	480	79,827
6	10	4	600	77,500
7	10	4	720	70,983

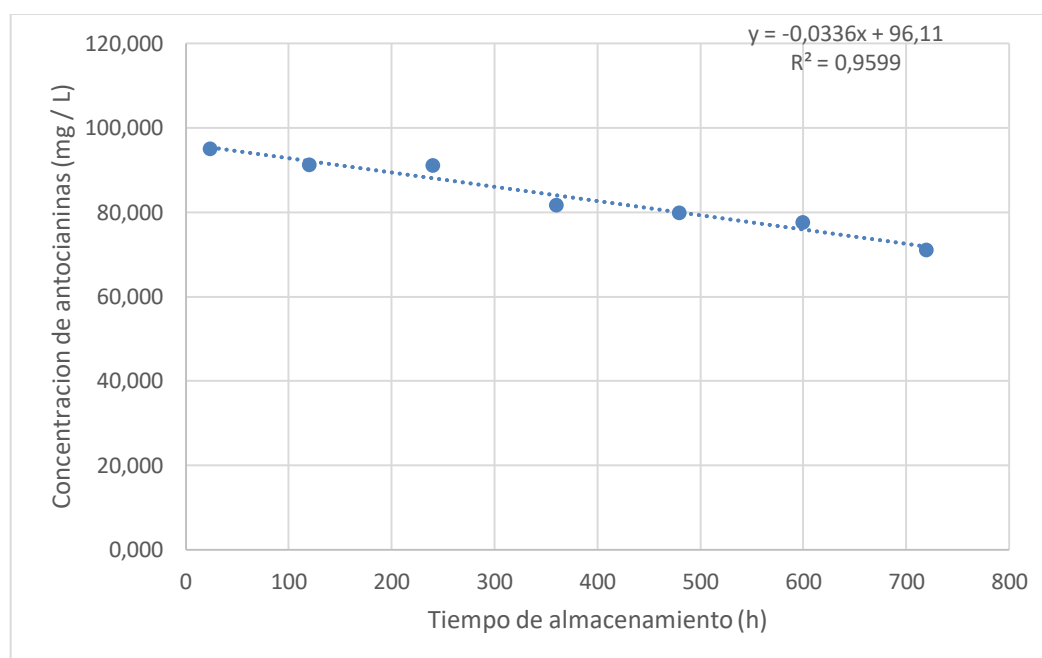


Figura 18. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Tabla 22. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
15	10	4	24	72,380
16	10	4	120	72,380
17	10	4	240	68,656
18	10	4	360	64,467
19	10	4	480	60,743
20	10	4	600	54,459
21	10	4	720	46,081

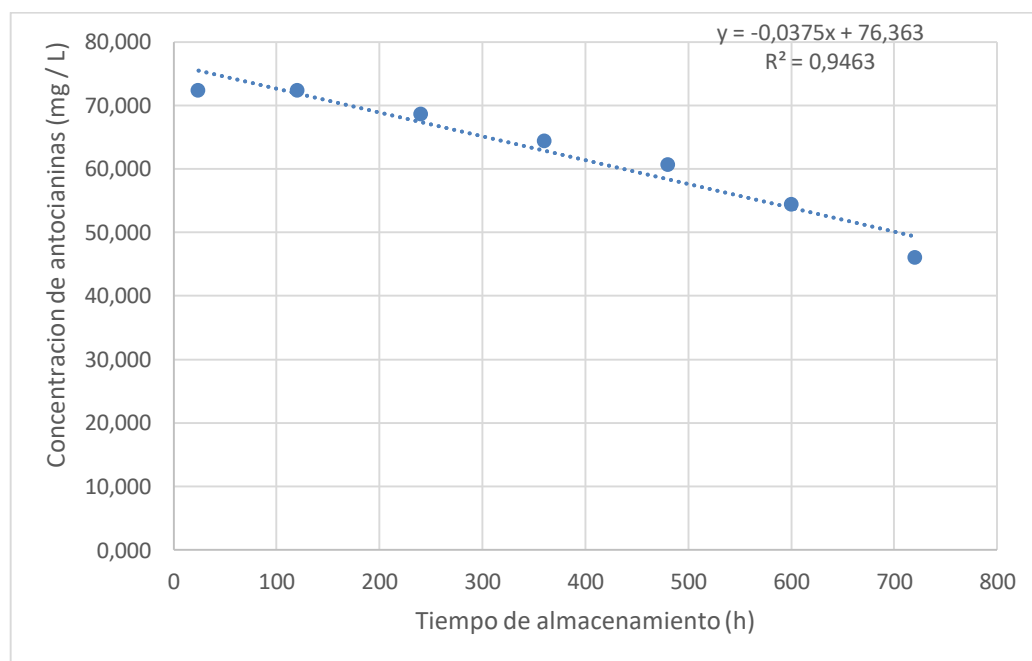


Figura 19. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Anexo 11. Concentración antocianinas totales (CAT) a pH 5

Tabla 23. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº TRAT.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
1	20	5	24	55,856
2	20	5	120	54,925
3	20	5	240	50,968
4	20	5	360	44,452
5	20	5	480	40,961
6	20	5	600	38,168
7	20	5	720	39,797

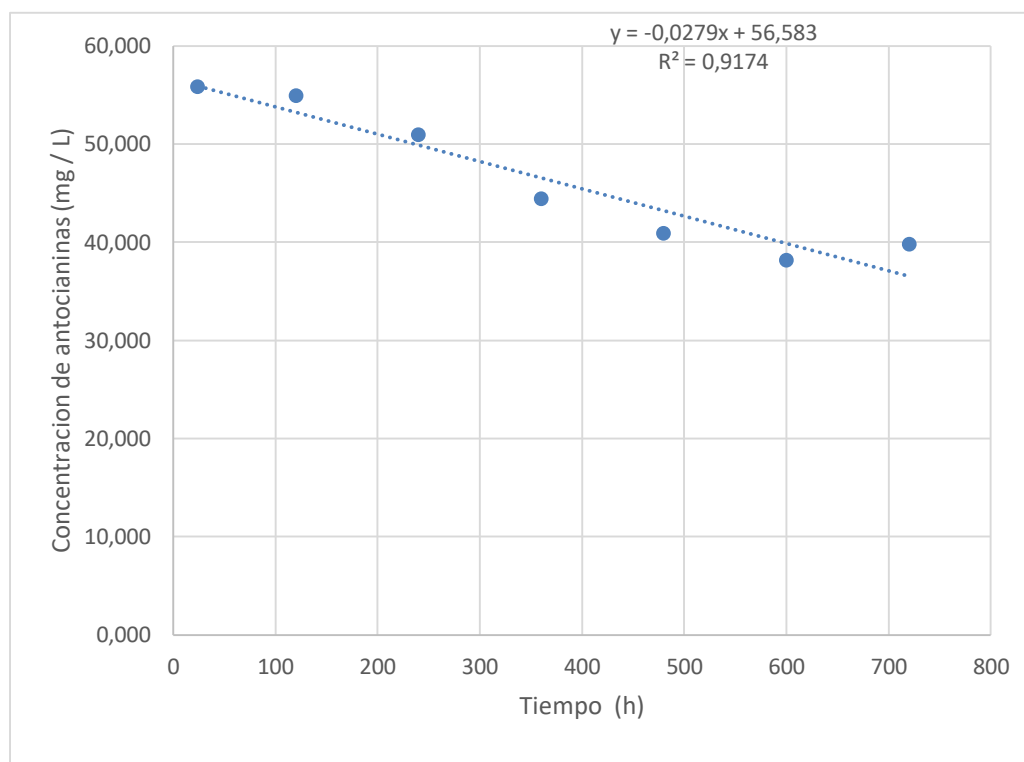


Figura 20. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Tabla 24. Concentracion antocianinas totales (CAT)

Nº TRAT.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	AT (mg / L)
8	20	5	24	80,525
9	20	5	120	73,543
10	20	5	240	71,449
11	20	5	360	64,001
12	20	5	480	59,347
13	20	5	600	55,390
14	20	5	720	57,718

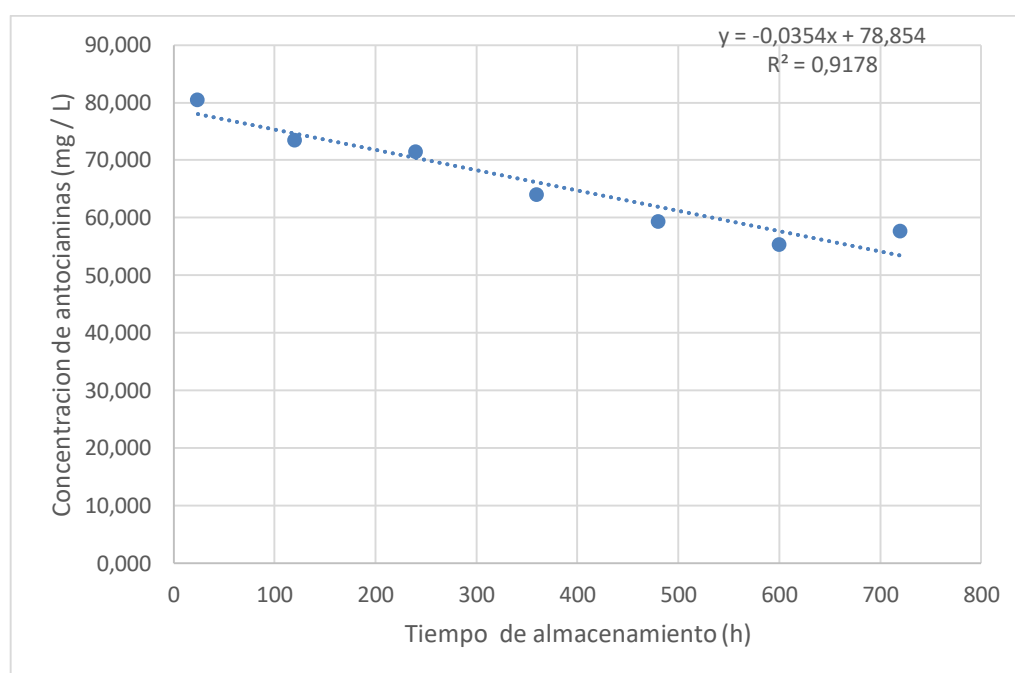


Figura 21. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Tabla 25. Concentración antocianinas totales (CAT)

Nº Trat.	Temperatura (°C)	pH	Tiempo (h)	CAT (mg / L)
15	20	5	24	63,769
16	20	5	120	61,209
17	20	5	240	56,554
18	20	5	360	50,503
19	20	5	480	43,055
20	20	5	600	39,797
21	20	5	720	36,306

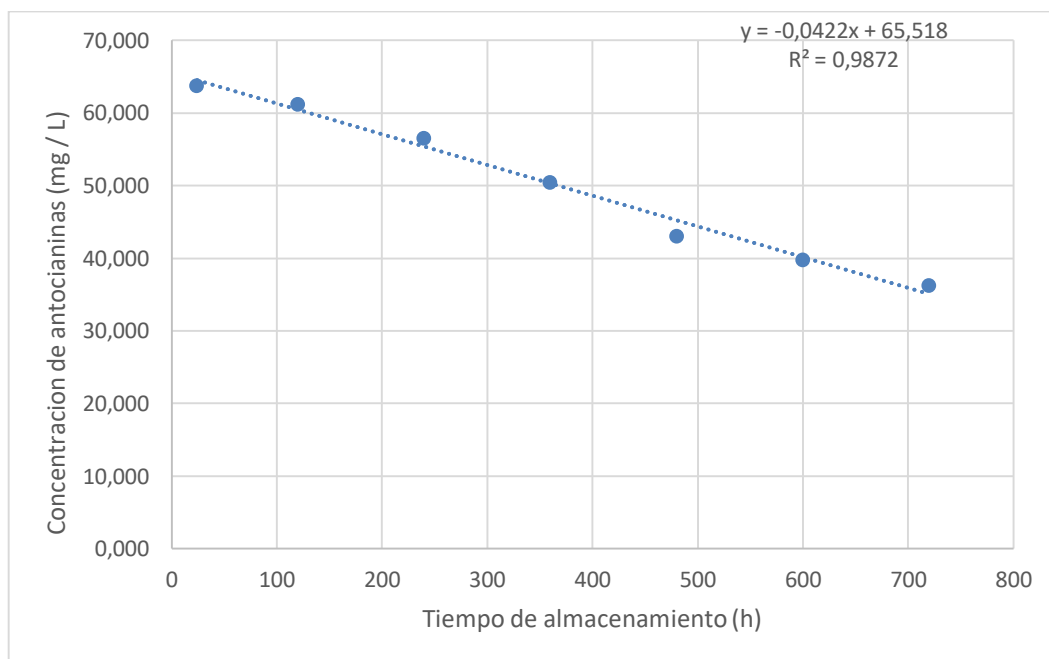


Figura 22. Concentración (mg / L) versus tiempo de almacenamiento (h).

Anexo 12. Energía de activación a pH 4

Tabla 26. Energía de activación para el extracto a pH 4

pH	T (°C)	T (k)	1/ T (K)	k	ln k
4	0	273	0,0037	0,0081	-4,8159
4	10	283	0,0035	0,0336	-3,3932
4	20	293	0,0034	0,0375	-3,2834

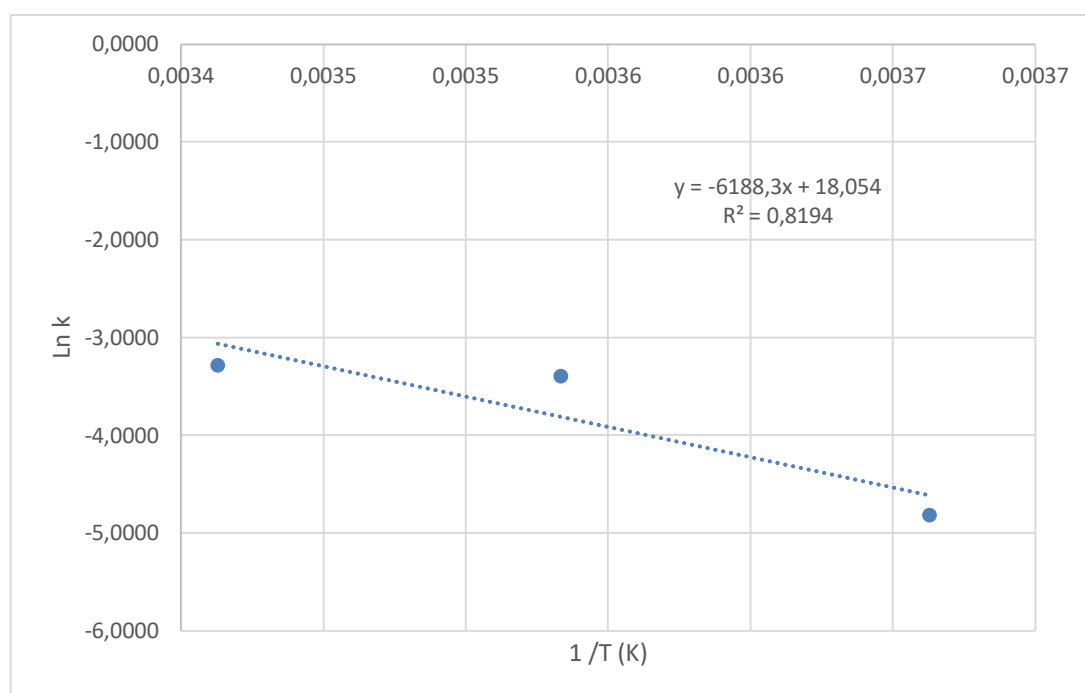


Figura 23. Grafica de Arrhenius para la determinar energía de activación.

Anexo 13. Energía de activación a pH 5

Tabla 27. Energía de activación para el extracto de zarzamora a pH 5

pH	T (°C)	T (K)	1/ T (K)	k	ln k
5	0	273	0,0037	0,0279	-3,5791
5	10	283	0,0035	0,0354	-3,3410
5	20	293	0,0034	0,0422	-3,1653

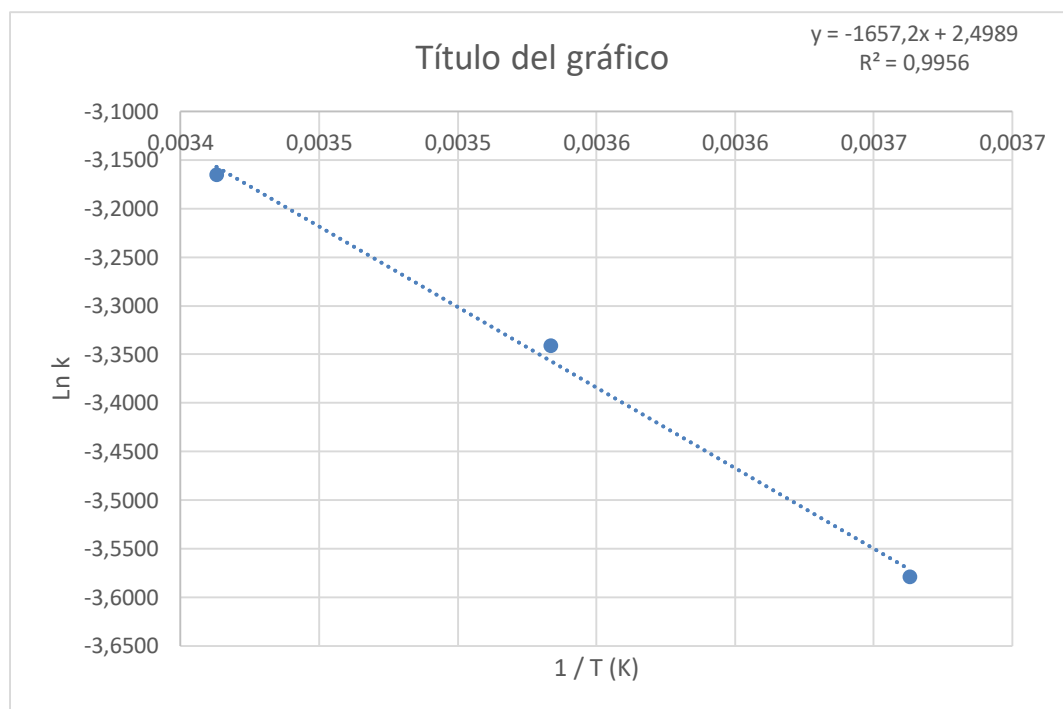


Figura 19. Grafica de Arrhenius para la determinar energía de activación.

Anexo 14. Constancia del traductor del resumen al idioma quechua.



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE EL PRESENTE DOCUMENTO, Prof. DIOMEDES CAYO CARDENAS F. hace constar que:

Se ha traducido del idioma español a la lengua quechua el resumen de la tesis titulado: **Influencia de la temperatura y el pH en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de zarzamora (*Rubus urticifolius Poir*)**, para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Dicho trabajo corresponde a la Bachiller en Ingeniería Agroindustrial Carmen Ethel Pacheco Llamocca, egresada de la Escuela profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad José María Arguedas.

Se emite la presente constancia a petición de la interesada.

Andahuaylas, 03 de enero de 2020

 UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ MARÍA ARGUEDAS
CENTRO DE IDIOMAS

.....
Amawta: Diómedes C. Cárdenas Fortán
.....
DOCENTE FACILITADOR DEL IDIOMA QUECHUA
Prof. Diómedes Cayo Cárdenas F.
Traductor

Anexo 15. Matriz de consistencia

	Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variab	Definición conceptual	Dimensión	Unidades	Escalas	Diseño o método	Técnica	Instrumentos de medición
G	¿Cuál es el efecto de la temperatura y el pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)?	Evaluar la influencia de la temperatura y el pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de las antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)	La estabilidad de las antocianinas es afectada por el tiempo, la temperatura y el pH.	V. Independientes	El tiempo	0,5,10,15,20,25,30	Días	Nominal	Experimental		
					El pH	3,4,5		Nominal	Experimental.	Potenciometría	Potenciómetro
					La temperatura	0,10,20	°C	Nominal	Experimental.	Termometría	Termómetro digital.
E1	¿Cuál es el rendimiento de antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)?	Determinar el rendimiento de antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>).	Tiempo de almacenamiento, temperatura y pH influyen en el rendimiento de antocianinas.	Rendimiento	Es la proporción entre el resultado que se obtiene y los medios que se emplearon para alcanzar al mismo.	Peso	Porcentaje	Nominal	Experimental	Cálculo matemático	Balanza analítica.
E2	¿Cuál es el efecto de la temperatura y el pH en un periodo de tiempo en el contenido de las antocianinas de los frutos de Zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)?	Determinar la concentración de antocianinas por efecto de diferentes temperaturas y pH en un periodo de tiempo en la estabilidad de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)	El tiempo de almacenamiento, la temperatura y el pH influyen en la estabilidad de antocianinas de los frutos de la zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)	V. Dependientes	Antocianinas	Contenido de antocianinas	Absorbancia (nm)	Nominal	Experimental	Espectrofotometría.	Espectrofotómetro.
E3	¿Cuál es la energía de activación a diferentes temperaturas y pH en un periodo de tiempo de las antocianinas de los frutos de Zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)?	Determinar la energía de activación por efecto de diferentes temperaturas y pH en un periodo de tiempo de las antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)	El tiempo de almacenamiento, la temperatura y el pH influyen en la energía de activación de las antocianinas de los frutos de zarzamora (<i>Rubus urticifolius Poir</i>)		Energía de activación (E_a)	Es la diferencia entre la energía de los reactivos y la energía mínima que deben alcanzar para reaccionar.		kJ /mol	Nominal	Experimental	