

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS



**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS APLICADO
A LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA DE
MAIZ MORADO (*Zea mays L.*)”**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO DE
ALIMENTOS**

VÍCTOR ÁNGEL DÍAZ GASPAR

Callao, marzo de 2016

PERÚ

**“OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE
EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS APLICADO
A LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA DE
MAIZ MORADO (*Zea mays L.*)”**

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos.....	i
Índice de figuras.....	vii
Índice de gráficas.....	ix
Índice de tablas.....	x
Resumen.....	xii
Abstract.....	xiii
Capítulo I: Planteamiento del problema de investigación.....	1
1.1 Identificación del problema.....	1
1.2 Formulación del problema.....	2
1.2.1 Problema general.....	2
1.2.2 Problemas específicos.....	2
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Justificación e importancia.....	4
Capítulo II: Marco teórico.....	6

2.1 Antecedentes de la investigación.....	6
2.2 Bases teóricas.....	8
2.2.1 Características físicas y químicas del maíz morado (<i>Zea mays</i> L.).....	11
2.2.2 Componente bioactivo: Polifenoles, estructura química.....	13
2.2.3 Propiedades antioxidantes de los polifenoles.....	18
2.2.4 Antocianinas, estructura química y propiedades.....	21
2.2.5 Metodología de superficie de respuesta.....	31
Capítulo III: Variables e Hipótesis.....	35
3.1 Variables de la investigación.....	35
3.1.1 Variables independientes.....	35
3.1.2 Variables dependientes.....	35
3.2 Operacionalización de las variables.....	36
3.3 Hipótesis general e hipótesis específicas.....	36
3.3.1 Hipótesis general.....	37
3.3.2 Hipótesis específicas.....	37
Capítulo IV: Metodología.....	38
4.1 Lugar de ejecución.....	38

4.2 Materiales.....	38
4.2.1 Insumos.....	38
4.2.2 Equipos e instrumentos.....	38
4.2.3 Utensilios.....	39
4.2.4 Reactivos.....	39
4.3 Descripción del proceso	40
4.3.1 Caracterización del proceso de extracción de antocianinas.....	40
4.3.2 Elaboración de la bebida.....	43
4.4 Tipo de investigación.....	47
4.5 Diseño de la investigación	47
4.6 Población y muestra	49
4.7 Técnica e instrumentos de recolección de datos	49
4.8 Procesamiento estadístico y análisis de datos.....	51
4.8.1 Para hallar el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.).....	51

4.8.2	Para encontrar los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas durante la elaboración de una bebida natural.....	54
4.8.3	Para determinar si los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida son mayores a los que presenta otra bebida de igual formulación ya existente en el mercado.....	55
4.8.4	Para determinar la aceptabilidad de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura.....	56
Capítulo V: Resultados.....		57
5.1	Determinación de la ecuación polinómica que mejor ajusta al modelo experimental.....	57
5.2	Caracterización de la superficie de respuesta.....	60
5.3	Determinación de los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para el proceso de extracción de antocianinas.....	63
5.4	Comparación del contenido de antocianinas de la bebida elaborada a nivel piloto versus el de una bebida comercial actualmente vigente en el mercado.....	70

5.5 Prueba de grado de satisfacción de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura.....	73
Capítulo VI: Discusión de los resultados.....	75
6.1 Contrastación de las hipótesis con los resultados.....	75
6.2 Contraste de resultados con otros estudios similares.....	78
Capítulo VII: Conclusiones.....	80
Capítulo VIII: Recomendaciones.....	83
Capítulo IX: Referencias bibliográficas.....	84
Capítulo X: Apéndices.....	91
10.1 Matriz de consistencia.....	91
10.2 Datos del rendimiento de antocianinas para obtener los parámetros óptimos de tiempo y temperatura del estudio.....	92
10.3 Verificación gráfica del supuesto de normalidad del modelo.....	93
10.4 Verificación gráfica del supuesto de igualdad de varianza del modelo.....	93
10.5 Factores de estudio versus los residuales.....	94
10.6 Análisis del máximo punto atípico.....	95

10.7 Datos de rendimientos de antocianinas de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura versus los de la bebida comercial de marca "A".....	95
10.8 Análisis de comparación simple del rendimiento medio de antocianinas.....	96
10.9 Ficha de evaluación sensorial.....	97
10.10 Resumen de resultados de la evaluación sensorial.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 2.1: Variedades de <i>Zea mays L.</i> a 84 días de su cultivo.....	9
FIGURA N° 2.2: Mazorca de <i>Zea mays L.</i>	10
FIGURA N° 2.3: Estructura química de los polifenoles.....	14
FIGURA N° 2.4: Flavonoides: estructura básica y tipos.....	15
FIGURA N° 2.5: Reducción del oxígeno molecular.....	17
FIGURA N° 2.6: Estructura de antioxidantes sintéticos.....	20
FIGURA N° 2.7: Estados de resonancia de la estructura basal fenólica.....	21
FIGURA N° 2.8: Estructura de antocianinas.....	22
FIGURA N° 2.9: Sentido de acumulación de las antocianinas en el olote.....	23
FIGURA N° 2.10: Ruta de biosíntesis de las antocianinas.....	25
FIGURA N° 2.11: Posible mecanismo de quelación de un metal de la cianidina en presencia de ácido ascórbico como catalizador.....	28
FIGURA N° 2.12: Estructura de antocianinas a diferentes pH's.....	29
FIGURA N° 2.13: Espectro de absorción de la cianidina-3-ramnoglucósido a distintos valores de pH's.....	30
FIGURA N° 4.1: Diagrama de flujo del estudio	46

FIGURA N° 4.2: Diseño central compuesto rotacional..... 52

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA N° 5.1: Comportamiento del proceso de extracción.....	61
GRÁFICA N° 5.2: Superficie de respuesta del estudio realizado.....	62
GRÁFICA N° 5.3: Gráfica de contornos del estudio realizado.....	63
GRÁFICA N° 5.4: Superficie de respuesta del modelo canónico.....	66
GRÁFICA N° 5.5: Gráfica de contornos del modelo canónico.....	67
GRÁFICA N° 5.6: Gráfica de la escala hedónica de la bebida.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 2.1: Características físicas del maíz morado.....	11
TABLA N° 2.2: Composición química de la mazorca.....	11
TABLA N° 2.3: Composición química de la mazorca vs la chica morada.....	12
TABLA N° 3.1: Operacionalización de las variables.....	36
TABLA N° 4.1. Criterios de aceptación de la mazorca de maíz morado (<i>Zea mays L.</i>).....	40
TABLA N° 4.2: Diseño básico para el desarrollo de la superficie de respuesta.....	48
TABLA N° 5.1: ANVA del modelo de primer orden.....	57
TABLA N° 5.2: ANVA del modelo de segundo orden.....	58
TABLA N° 5.3: Coeficientes de determinación.....	60
TABLA N° 5.4: Valores de las variables independientes que maximizan la dependiente.....	64
TABLA N° 5.5: Exploración del punto óptimo del proceso.....	69
TABLA N° 5.6: Valores óptimos del proceso de extracción de antocianinas que se pueden aplicar a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (<i>Zea mays L.</i>).....	70

TABLA N° 5.7: Resumen de la prueba de comparación de medias de dos poblaciones con varianza desconocida.....	72
TABLA N° 6.1: Hipótesis general vs resultado.....	75
TABLA N° 6.2: Hipótesis específica 1 vs resultado.....	76
TABLA N° 6.3: Hipótesis específica 2 vs resultado.....	77
TABLA N° 6.4: Hipótesis específica 3 vs resultado.....	78

RESUMEN

En el desarrollo de la presente tesis se caracterizó el proceso de extracción de antocianinas durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*), empleando el método de análisis de superficies de respuesta, con temperaturas entre los 47,57 a 132,43°C, y tiempos de 11,36 a 138,64 minutos. Además, con la técnica del punto estacionario se encontró los parámetros de máximo rendimiento del proceso (33,991 mg/100 g), los cuales correspondieron a una temperatura de 98,3942 °C y un tiempo de 105,8944 minutos; sin embargo, al ser el tiempo demasiado prolongado, se le redujo al máximo posible sin incurrir en pérdidas considerables del rendimiento; para ello se realizó el análisis canónico, con el cual se definió como parámetros óptimos una temperatura de 100°C y un tiempo de 60 minutos, con una disminución de sólo el 2,49% del rendimiento con respecto al punto máximo, a la par con un ahorro del 45% del tiempo. También se demostró que el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas en la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura, que fue de 33,138 mg/g de coronta, es mayor al de una bebida comercial de similares características actualmente vigente en el mercado, cuyo rendimiento fue de 29,380 mg/g; utilizando el método del pH diferencial para la cuantificación y la prueba "T de Student" para la comparación de los rendimientos. Por último, el análisis sensorial realizado dio un resultado, que hace inferir que se tendrá una buena aceptación de los consumidores en el mercado.

ABSTRACT

In developing this present thesis the extraction of anthocyanins process was characterized, for the commercial manufacture of a natural drink of purple corn (*Zea Mays L.*) using the surface analysis method, for temperature intervals which were between 47,57 to 132,43°C, and times from 11,36 to 138,64 minutes. Also, with the methodology of the stationary point were found the parameters of maximum yield of the process (33,991 mg/100 g), which corresponded to a temperature of 98,3942°C and time of 105,8944 minutes, nevertheless, it was perceived that this time was too long, so it was decided to reduce to the maximum without incurring in considerable losses of the yield, for that reason the canonical analysis was used, which were determined that the optimal parameters of temperature was 100 ° C and 60 min, with a decrease of only 2,49 % of the yield of the process and with a saving of 45% of time. Also a comparison was made between the content of anthocyanins of our drink made with the optimal parameters of time and temperature which is 33.138 mg / g of cob, is better than the same formulation in a commercial drink, resulting 29.380 mg / g; using the pH differential method for quantification and the "Student T" for comparison and was demonstrated that our drink possesses a major content of this nutrient. Finally, the sensory analysis realized to our drink gave us a result, which makes us infer that this one will have a good acceptance by consumers.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Identificación del problema

La tendencia actual del mercado está orientada al consumo de bebidas naturales y con un contenido muy bajo o nulo de insumos químicos; dejándose de lado el concepto de “barato y bonito” por el de “sano y natural”.

Justamente en esta búsqueda de “lo sano y natural”, en los últimos años se ha visto la aparición de bebidas que emplean materias primas nativas; tales como, el maíz morado (*Zea mays L.*) por su elevado contenido de compuestos bioactivos, específicamente de antocianinas, las cuales le confieren propiedades antioxidantes a las bebidas elaboradas con ellas.

Sin embargo; la falta de trabajos de investigación o la no aplicación de éstos en los proceso tecnológicos, han provocado la aparición de bebidas, que si bien han logrado minimizar su contenido de insumos químicos, emplean tratamientos de conservación muy severos, los cuales disminuyen sustancialmente el valor nutritivo de las mismas.

En este contexto, si los profesionales del área o en general la industria de alimentos no se preocupa por encontrar una relación armoniosa entre los factores nutritivos, sensoriales y la aplicación de aditivos químicos en las bebidas naturales; es posible que en los

próximos años continúen apareciendo productos no sólo con menos insumos químicos (lo cual sería idóneo), sino también, con menor calidad nutritiva, generándose así; trastornos en la nutrición de la población juvenil, que es el mercado objetivo de este tipo de bebidas.

Por ende, es de suma importancia establecer los parámetros óptimos de temperatura y tiempo de extracción de antocianinas, a través de un modelamiento matemático, con los cuales se puedan elaborar bebidas naturales de maíz morado con alto valor nutritivo y que tengan una buena aceptabilidad por el público consumidor; de tal forma que el proceso no represente costos excesivos para la industria.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuáles son los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que pueden aplicarse a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*)?

1.2.2 Problemas específicos

- a. ¿Cuál es el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*)?

- b. ¿Serán los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida mayor a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado?
- c. ¿Qué aceptabilidad tendrá la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que puedan aplicarse a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*).

1.3.2 Objetivos Específicos

- a. Elaborar el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*).
- b. Determinar si los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida son mayores a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado.
- c. Hallar la aceptabilidad que tendrá la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas.

1.4 Justificación e importancia

El presente trabajo de investigación reviste una importancia significativa, porque intenta cubrir las exigencias que hoy en día la industria de elaboración de bebidas enfrenta por parte de los consumidores; quienes no solo buscan que el producto sea atractivo a sus sentidos, si no que aporte favorablemente a las actividades metabólicas de su organismo.

Teniendo en cuenta esta realidad, en los últimos años se está promoviendo el desarrollo de productos con materias primas novedosas y con procesos tecnológicos amigables con su contenido nutritivo. En este sentido es de vital importancia el aporte de la comunidad científica en la búsqueda de nuevos procesos y materias primas, los cuales deben garantizarle al consumidor un alimento de excelentes propiedades sensoriales y nutritivas.

El estudio se justifica, fundamentalmente; en la aplicación de la ciencia de alimentos, con la cual se optimizará un proceso tecnológico de extracción de antocianinas a través de su modelamiento matemático. Este modelo además de facilitar la predicción de los rendimientos del proceso a diferentes niveles de tiempo y temperatura; permitirá descubrir una región de máximo rendimiento donde se podrá establecer una relación armoniosa

entre los factores más importantes para la industria de comercialización de alimentos. Esto es; un elevado contenido de compuestos bioactivos (antocianinas) en el producto final, un producto de buena aceptabilidad sensorial y un proceso tecnológico que permita obtener costos finales bajos, de tal manera que el precio del producto pueda competir con los que existen actualmente en el mercado.

En resumen, la presente investigación se justifica en el plano científico, porque busca aportar mayores conocimientos tanto en el estudio de la extracción de antocianinas, como en su modelamiento matemático. Esto debido a las importantes propiedades antioxidantes y anti cancerígenas demostradas de estos compuestos flavonoides.

En el aspecto tecnológico, la investigación aspira a servir como conocimiento base para la industria de procesamiento de bebidas a partir del maíz morado; así se podrá predecir el contenido final de antocianinas que sus productos tendrán, dependiendo del tratamiento térmico al que lo sometan.

En el marco legal, la presente investigación obedece a los planteamientos de las disposiciones normativas que promueven el desarrollo de la investigación en el área científica de las universidades acorde con el proyecto educativo nacional vigente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

- a. CASTAÑEDA-OVANDO *et al.* ; en *Chemical Structure of Anthocyanins*; afirman que durante el proceso de extracción de antocianinas, el empleo de ácidos fuertes puede causar la hidrólisis parcial de sus fracciones acil, en caso las posea, especialmente en aquellas con doble grupo carboxílico, por lo que el uso de ácidos débiles como el cítrico son recomendables para mantener este tipo de sustituyentes intactos¹.
- b. DECKER; en *Phenolics: Prooxidants or Antioxidants?* Asegura que la actividad antioxidante de las antocianinas está relacionada a su capacidad de quelar metales, inhibir la enzima lipooxigenasa y captar radicales libres dentro de las células².
- c. GIUSTI y WROSLTAD; en *Characterization and Measurements of Anthocyanins By Uv-Vis, Spectroscopy*; sostienen que si a la absorbancia obtenida a un pH 1 (donde la molécula se encuentra en su máxima estabilidad como pigmento) le restamos la absorbancia medida a pH 4,5 (donde la molécula se encuentra en su estado incoloro) se podrá corregir los efectos de las impurezas de la muestra en el ensayo, por lo que la prueba de pH diferencial permite obtener un nivel de confiabilidad muy alto con respecto al contenido de antocianinas de la muestra³.

- d. HARBOME; en *Spectral Methods of Characterizing Anthocyanins*; afirma que las antocianinas son, después de la clorofila, el grupo más importante de pigmentos solubles en agua que pueden ser vistos por el ojo humano, y que se encuentran presentes en pétalos de flores y hojas de plantas⁴.
- e. MENDOZA; en *Conociendo la Cadena Productiva del Maíz Morado en Ayacucho*; sostiene que el maíz morado (*Zea mays L.*) después de ser sometido a un proceso de secado (12% de humedad) puede llegar a tener un total de 769 mg de antocianinas por cada 100g de producto (entre coronta y granos) lo cual lo convierte en una fuente muy atractiva de estos nutrientes⁵.
- f. MONTGOMERY; en *Diseño y Análisis de Experimentos*; define al análisis de superficies de respuesta como un método estadístico secuencial que permite obtener una ecuación matemática que predice con razonable exactitud el comportamiento de la variable dependiente, con respecto a las modificaciones de las variables independientes; además, a través de la metodología del punto estacionario se puede encontrar los valores de las variables independientes que lleven al máximo o al mínimo el valor de la dependiente⁶.
- g. ROONEY *et al.*; en *Tortillas*; declaran que el grano pigmentado del maíz se destina a la producción de harina orgánica y a la elaboración de otros alimentos, los cuales están empezando a incrementar su

demanda como consecuencia de la difusión del conocimiento científico que explica las propiedades bio activas que posee⁷.

- h. ST. LEGER *et al.*; en *Factors Associated with Cardiac Mortality in Developed Countries with Particular Reference to the Consumption of Wines*; aseguran que las antocianinas son la explicación a la llamada "Paradoja Francesa"; en la que se propone que el bajo riesgo de enfermedades coronarias en Francia se asocia con su alto consumo de vino tinto y por ende de antocianinas⁸.

2.2 Bases teóricas

El maíz morado (*Zea mays L.*), es una planta originaria del Perú. Fue identificada durante la época de la colonia por agricultores de los valles andinos de la costa central, entre los 1 000 y 2 400 m.s.n.m. y en la época prehispánica fue conocida como Oro, Sara o Kullisara.⁵ Además, el maíz morado está también distribuido en países como Bolivia y México, encontrándose muchos reportes históricos de ellos; por ejemplo, en el pensamiento maya, los maíces de color blanco, amarillo, rojo y morado se relacionaban con los rumbos cosmológicos de dicha cultura.⁹

Según Goodman y Brown¹⁰ en América se originaron casi el 90% de las razas de maíz, inclusive en este continente se encuentran actualmente 260 de sus razas y dentro de ellas hay una gran variación en el color del grano y la planta misma, como se muestra en la figura N° 2.1.



Figura N° 2.1. Variedades de *Zea mays L.* a 84 días de su cultivo (Mendoza, 2012)

Desde el punto de vista botánico, la planta del *Zea mays L.* es una gramínea de producción anual, llegando a alcanzar hasta los cinco metros de altura. Siendo su descripción y clasificación taxonómica la siguiente

Reino: Vegetal

División: Fanerógamas

Subdivisión: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Graminales

Familia: Gramineae

Tribu: Mayde

Género: *Zea*

Especie: *Zea mays* L.

Nombre común: Maíz morado

Su inflorescencia masculina es una panícula formada por numerosas flores pequeñas, llamadas espículas; mientras que su inflorescencia femenina es una estructura única llamada mazorca, que crece envuelta en brácteas; y su fruto es una carióspside de forma redondeada, de color morado y situado en hileras a lo largo de toda la mazorca⁵ (Figura N° 2.2).

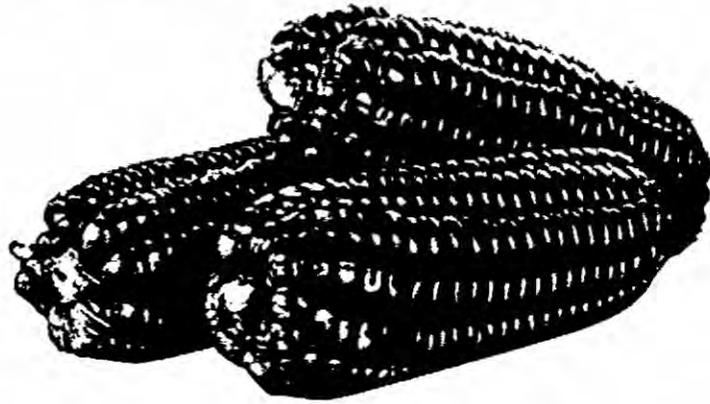


Figura N° 2.2. Mazorca de *Zea mays* L. (Mendoza, 2007).

Según Mendoza⁵ en el Perú existen muchas variedades de maíz morado, por ejemplo, el Morado Canteño, Morado Mejorado, Morado Caraz, Arequipeño, Cuzco Morado y Negro Junín. Siendo la variedad más comercial el Morado Canteño, porque se desarrolla bien entre los 1800 a 2500 m.s.n.m., además de ser tolerante a plagas, enfermedades y ser de fácil adaptación a diversos climas.

2.2.1 Características físicas y químicas del maíz morado (*Zea mays L.*)

En las tablas N° 2.1 y 2.2 se muestran las características físicas y químicas del maíz morado (*Zea mays L.*), del cual, el 85% representa el peso del grano y solo el 15% el de la coronta.⁹

TABLA N° 2.1. Características físicas del maíz morado (*Zea mays L.*)

Características	Promedio	Máximo	Mínimo
Largo de mazorca (cm)	16,0	20,0	12,0
Ancho de mazorca (cm)	5,0	5,8	4,0
Número de hiléras	10,0	12,0	8,0
Número de granos por hilera	25,0	36,0	18,0
Largo de granos (mm)	11,6	13,0	10,4
Ancho de granos (mm)	5,6	6,2	5,0
Espesor de granos (mm)	6,0	6,5	5,5

Fuente: Boletín de información técnica del Ministerio de Agricultura de Lima-Perú (1998), citado por Mendoza (2007).

TABLA N° 2.2. Composición química de la mazorca

COMPONENTE	PORCENTAJE	
	GRANO	CORONTA
Humedad	11,4	11,2
Proteínas	6,7	3,74
Grasa	1,5	0,32
Fibra	1,8	24,01
Carbohidratos	76,9	57,42

Fuente: Delgado, J. Tesis UNALM (1987), citado por Mendoza (2007)

Además, en la tabla N° 2.3, se puede observar las diferencias significativas entre las composiciones químicas de la mazorca del maíz morado con respecto a la bebida de chicha elaborada con la misma mazorca; ello tal vez, debido al inadecuado método de elaboración de la bebida, donde la lixiviación de los nutrientes del maíz hacia el líquido no fue eficiente.

TABLA N° 2.3. Composición química de la mazorca vs la chicha morada

Características	Maíz morado	Chicha morada
Calorías	357,00 g	20,00 g
Agua	11,40 g	95,00 g
Proteínas	6,70 g	0,00 g
Carbohidratos	76,90 g	5,00 g
Fibra	1,80 g	-
Ceniza	1,70 g	0,10 g
Calcio	12,00 mg	24,00 mg
Fósforo	328,00 mg	4,00 mg
Hierro	0,02 mg	1,30 mg
Tiamina	0,38 mg	0,00 mg
Riboflavina	0,02 mg	0,10 mg
Niacina	2,80 mg	0,04 mg

Fuente: Collazos (1962), citado por Mendoza (2007)

Un componente importantísimo que no es mencionado en la tabla anterior, es el contenido de polifenoles, los cuales de acuerdo con la

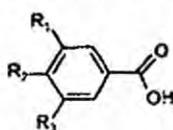
nomenclatura adoptada por la British Nutrition Foundation, son "Metabolitos Secundarios"; es decir, una serie de compuestos orgánicos que a pesar de no participar en forma directa en el desarrollo y crecimiento de la planta, su ausencia haría imposible su supervivencia,¹¹ ya que por ejemplo, según indica Fredes,¹² los polifenoles son compuestos cuya síntesis es favorecida cuando el organismo se encuentra en situaciones de estrés, protegiéndolo de los efectos degenerativos de éste. Un caso en extremo mencionado como sustento a ello, es el estudio realizado en 1989 por la Organización Mundial de la Salud, llamado "Proyecto Mónica", donde se demostró que las tasas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares en Francia eran menores que en otros países, como el Reino Unido y los Estados Unidos, a pesar que la dieta de los franceses era rica en grasas y como consecuencia presentaban un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, este efecto contradictorio entre la dieta de los franceses y su baja incidencia de enfermedades cardiovasculares fue atribuido al alto consumo de vino tinto, que es una bebida con un elevado contenido de compuestos fenólicos, siendo éstos la verdadera respuesta a la llamada "Paradoja Francesa".¹³

2.2.2 Componente bioactivo: Polifenoles, estructura química

Los polifenoles, se caracterizan por poseer dos anillos, uno aromático y otro bencénico con uno o varios grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales como glucósidos, ésteres, etc.¹⁴

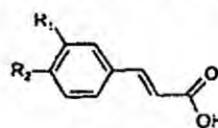
Manach *et al.*¹⁴ clasifican a los polifenoles en no flavonoides (también llamados ácidos fenólicos), estilbenos, lignanos, y flavonoides (que se caracterizan por tener dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos que forman un heterociclo oxigenado) (Figura N° 2.3).

Hydroxybenzoic acids



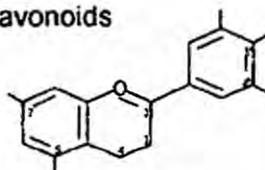
$R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$: Protocatecholic acid
 $R_1 = R_2 = R_3 = OH$: Gallic acid

Hydroxycinnamic acids

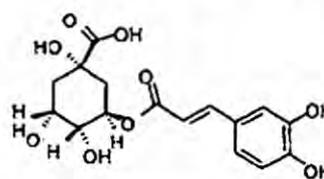


$R_1 = OH$: Coumaric acid
 $R_1 = R_2 = OH$: Caffeic acid
 $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$: Ferulic acid

Flavonoids

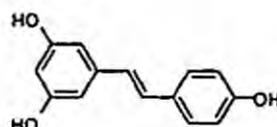


See Figure 2



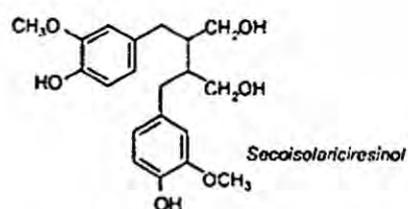
Chlorogenic acid

Stilbenes



Resveratrol

Lignans



Secoisolariciresinol

Figura N° 2.3. Estructura química de los polifenoles, (Manach *et al.*; 2004)

Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran las antocianidinas que además pueden poseer en su estructura uno o varios azúcares formando los llamados antocianos o antocianinas (Figura N° 2.4)

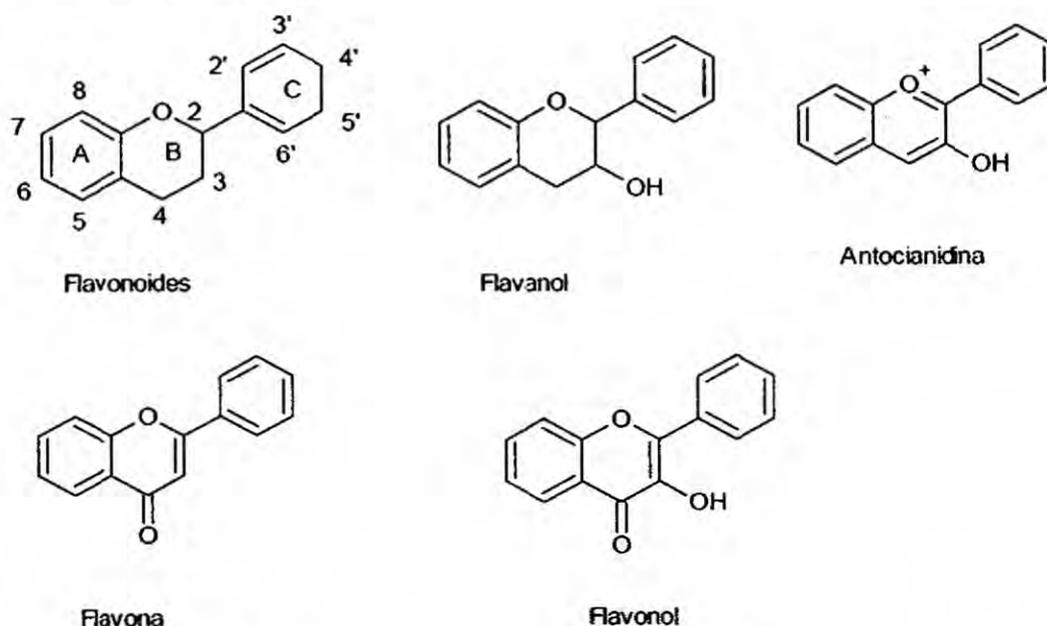


Figura N° 2.4. Flavonoides: estructura básica y tipos, (Martínez *et al.*; 2002)¹⁵

Los polifenoles en general son capaces de eliminar radicales libres provenientes del fenómeno conocido como estrés oxidativo, propio de los organismos aerobios como los seres humanos.¹⁶ Pues en estos organismos donde el oxígeno es esencial, se producen en forma inevitable Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) y radicales libres, los cuales provocan daños acumulativos en el funcionamiento del organismo. Sin embargo, los organismos poseen sus propias defensas (endógenas) antioxidantes, pero ellas en condiciones de enfermedad o propias del envejecimiento, pueden verse

desbordadas por la excesiva generación de ERO's y radicales libres. Este desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes se conoce bajo la denominación de estrés oxidativo.¹⁷

Los principales mecanismos de formación de ERO's son:

- La cadena de transporte electrónico mitocondrial de las células, a través del metabolismo oxidativo.
- Exceso de ejercicio físico.
- Pesticidas, contaminantes, humo de cigarrillo y algunos medicamentos.¹⁸

Estas ERO's son capaces de aceptar electrones de modo que van a generar desequilibrios en las moléculas vecinas, provocando daños al organismo, los cuales son consecuencia directa de las interacciones de las ERO's con:

- El ADN, que es dañado sobre todo, a nivel de las bases nitrogenadas que la conforman, perjudicando la acción de síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos grasos.
- Las proteínas, pues las ERO's son capaces de oxidar sus grupos funcionales, alterando la actividad de la proteína y de las enzimas.
- Los lípidos, ya que perjudican las membranas celulares, al oxidar los ácidos grasos poli insaturados, conduciendo a la peroxidación lipídica y a la formación de compuestos como

ácidos, aldehídos y cetonas propios de la rancidez, que son extremadamente tóxicos.¹⁹

Según Carocho *et al.*²¹ las ERO's se pueden clasificar en:

- **Especies radicalarias**, el anión superóxido (O_2^-), hidroxilo, óxido nítrico, hidroperóxilo (HO_2), peroxilo, alcoxilo. Las cuales se forman según el mecanismo mostrado en la figura N° 2.5.
- **Especies no radicalarias**, ácido hipocloroso, peroxinitrito, peróxido de hidrogeno, y el oxígeno singlete.

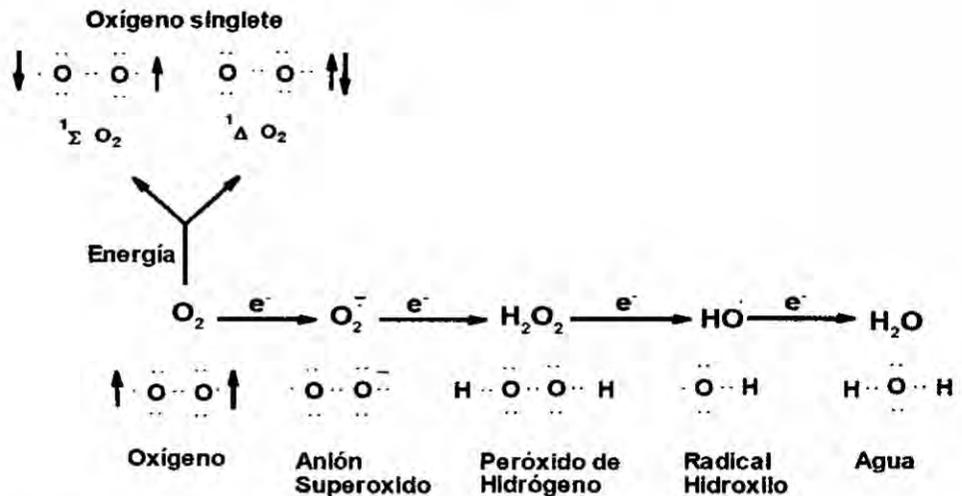


Figura N° 2.5. Reducción del oxígeno molecular, (León de Fernández, 2004)²⁰

Carocho *et al.*²¹ indican que las ERO's no son del todo perjudiciales, pues poseen funciones como la producción de energía, regulación del crecimiento celular, señales intercelulares, fagocitosis y síntesis de importantes compuestos biológicos.

Por otro lado los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados, lo que los hace, en su mayoría, altamente inestables y reactivos. Estos radicales libres para estabilizarse interactúan rápidamente con moléculas adyacentes mediante reacciones de oxidación-reducción.²² Generando así la inestabilidad de éstas, ocasionando una reacción en cadena, donde la formación de nuevos radicales libres puede provocar la síntesis de compuestos tóxicos²² que además pueden tener efectos biológicos distantes del sitio donde se originó el primer radical. Por ejemplo, el H₂O₂ no es especialmente tóxico para las células, pero puede atravesar las membranas y esto es importante, porque el medio extracelular posee muy pocos mecanismos antioxidantes.²³ Sin embargo, al igual que las ERO's los radicales libres son imprescindibles para el ser humano, pues participan en el transporte de electrones, la regulación de la presión sanguínea y el control de las infecciones.²⁴ Y esto resulta lógico, ya que algunos radicales libres pueden poseer en su estructura oxígeno y ser por tanto ERO's.

2.2.3 Propiedades antioxidantes de los polifenoles

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes sistemas de defensa antioxidante en el organismo. Uno de ellos es el sistema enzimático, conformado por moléculas como la superóxido

dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, siendo éstas la primera línea de defensa contra los radicales libres.²⁵

Como segunda línea de defensa, podemos mencionar a las moléculas no enzimáticas, con actividad antioxidante, éstas actúan antes o durante la reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos.²⁶

En los últimos años el interés por los antioxidantes de origen natural se ha incrementado de manera inmensurable, ello debido según Dorman *et al.*²⁷ a las siguientes tres razones:

- La baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidantes sintéticos.
- La eficacia antioxidante de una variedad de agentes fitoquímicos.
- La idea generalizada de que el consumo de ciertos compuestos fitoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento.

Además, existe entre los consumidores la ideología de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados. Esta ideología cobra fuerzas bajo el sustento de estudios como los de Fuchs,²⁸ quien asegura que el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), cuyas estructuras podemos observar en la figura N° 2.6, tienen efectos secundarios como el aumento del

colesterol, Hepatomegalia e inducción al cáncer hepático, entre otros.

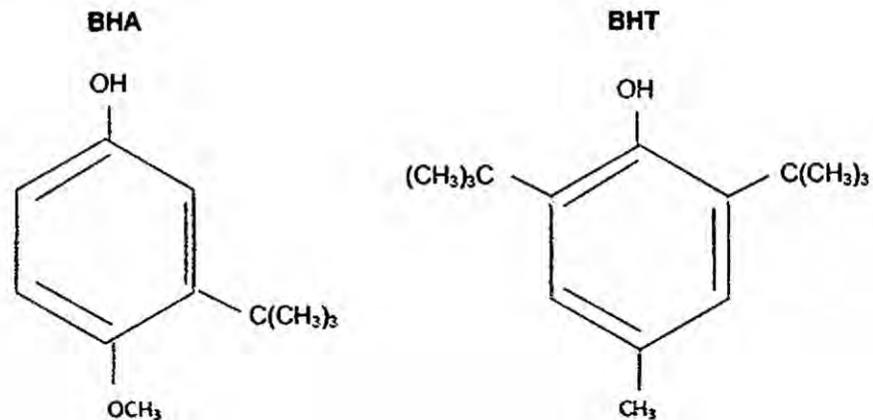


Figura N° 2.6. Estructura de antioxidantes sintéticos, (Fuchs, 1998)²⁸

Regresando a los polifenoles como compuestos antioxidantes, se debe mencionar que su mecanismo de acción se basa en la donación de un hidrógeno o de electrones provenientes de sus grupos hidroxilos al radical libre, deteniendo así las reacciones en cadena y a su vez formando el radical fenoxilo, el cual es menos reactivo dado a que se estabiliza por resonancia de los electrones "p" de su anillo aromático (Figura N° 2.7 de la página 21). Además, los o-dihidroxifenoles son secuestradores efectivos de iones metálicos e inhiben la generación de radicales libres. Por ende, es importante mencionar que el grado de actividad de los compuestos fenólicos está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula.²⁹⁻³⁰ Similarmente, Seeram y Nair,³¹ también comprobaron que en condiciones *in vitro*, el poder antioxidante de

los antocianos individuales está directamente relacionado con la estructura química de los mismos, y que la eficacia aumenta de forma proporcional al número de grupos OH en el anillo B, y en el caso de la cianidina en particular, la presencia de unidades glicosiladas en la posición 3 del anillo C decrece la actividad antioxidante.

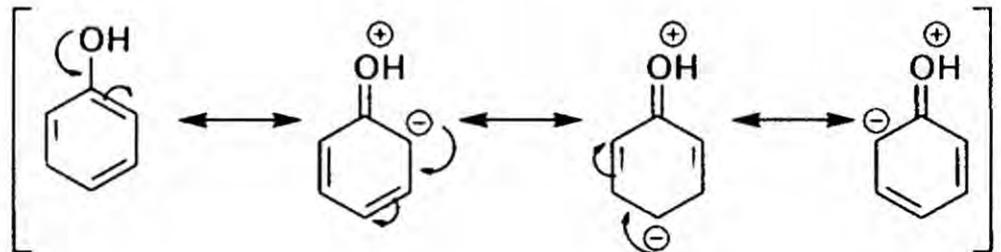


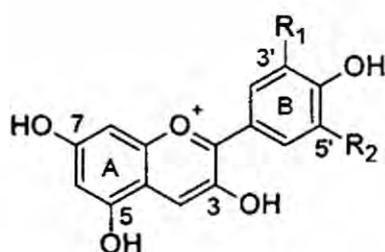
Figura N° 2.7. Estados de resonancia de la estructura basal fenólica, (Youssef El Hajj *et al.*, 2011)³²

Otro tipo de moléculas antioxidantes son aquellas que poseen una estructura insaturada conjugada aromática, por ejemplo, la alfa tocoferol (vitamina E) que es un nutriente esencial el cual funciona como antioxidante rompedor de cadenas y previene la propagación de las reacciones de radicales libres en todas las membranas celulares. El ácido ascórbico (vitamina C) es también parte del mecanismo normal de protección endógena.³³

2.2.4 Antocianinas, estructura química y propiedades

Tal y como se dijo líneas atrás, uno de los compuestos más importantes dentro de los polifenoles son las antocianinas (del griego

anthos significa flores y *kyanos* azul), ellas se diferencian de otros polifenoles por poseer azúcares dentro de sus grupos funcionales y, en su mayoría, presentar varios grupos $-OH$ ³⁴. Las antocianinas, a su vez, se diferencian entre ellas por el número de grupos hidroxilo que poseen, así como la naturaleza y número de azúcares que están unidos a la molécula, a la posición de esta unión y la naturaleza y número de ácidos aromáticos unidos al azúcar de la molécula³⁵ (Figura N° 2.8)



Anthocyanidin	R ₁	R ₂	Colour
Pelargonidin	H	H	Orange
Cyanidin	OH	H	Orange-red
Delphinidin	OH	OH	Bluish-red
Peonodin	OCH ₃	H	Orange-red
Petunidin	OCH ₃	OH	Bluish-red
Malvidin	OCH ₃	OCH ₃	Bluish-red

Figura N° 2.8. Estructura de antocianidinas, (Jing, 2006)³⁶

La función biológica primaria de las antocianinas en la planta, es la percepción visible que generan para la atracción de animales con propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además, se encargan de la filtración de la luz, y pueden acumularse en vacuolas como resultado del ya mencionado estrés oxidativo. Dentro de las vacuolas, las antocianinas, pueden estar localizadas en organelos

esféricos conocidos como antocianoplastos, que se forman mientras la síntesis de pigmentos está en operación.³⁷ En la planta de *Zea mays L.* según afirma Mendoza⁹, la distribución de las antocianinas en el olote de la planta se da tal y como se muestra en la figura N° 2.9, donde se puede apreciar que la pigmentación de la mazorca inicia en la base de la coronta y se va distribuyendo hacia el ápice de la misma, mientras que en el grano, la pigmentación tiene un sentido contrario, iniciando en el ápice del mismo hacia la parte que la une con la coronta.



Figura N° 2.9. Sentido de acumulación de las antocianidinas en el olote, (Mendoza, 2012)

Según indica Raghvendra (2011), citado por Mendoza⁹, la biosíntesis de los compuestos fenólicos se produce a partir de dos rutas, la del ácido malónico (ocurre principalmente en hongos, bacterias y en algunas plantas superiores) y la ruta del ácido

shikímico (frecuentemente en plantas superiores). En la ruta del ácido shikímico se convierten carbohidratos simples que se derivaron de la glucólisis, en la ruta de la pentosa fosfato y el ciclo de Calvin, en ácido shikímico, el cual da origen a la fenilalanina, triptófano, tirosina, etc. Posteriormente, como se muestra en la figura N° 2.10 de la página 25, la fenilalanina sufre un proceso de desaminación inducido por la fenilalanina amoniolasa (PAL); después de este proceso, se adhieren hidroxilos y otros grupos sustituyentes, a lo que quedó de la molécula de fenilalanina, dando origen a diversos ácidos orgánicos como el cinámico, entre otros precursores de los compuestos fenólicos. En el caso específico de las antocianinas, se da origen al ácido p-cumárico, a este ácido, se adiciona la CoA-SH formando así el p-cumaril-CoA, que inmediatamente y en conjunto con la enzima chalcona sintetasa participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15C. Este compuesto intermedio de 15C es transformado en una flavonona (naringenina) en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Dicha flavonona puede dar origen a diversos compuestos, entre ellos las antocianidinas, que son el resultado de una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación. Finalmente la molécula de antocianidina se estabiliza por glucosilación del

heterociclo, reacción en la que interviene una glicosil transferasa, y posteriormente posibles reacciones de metilación de los hidroxilos.

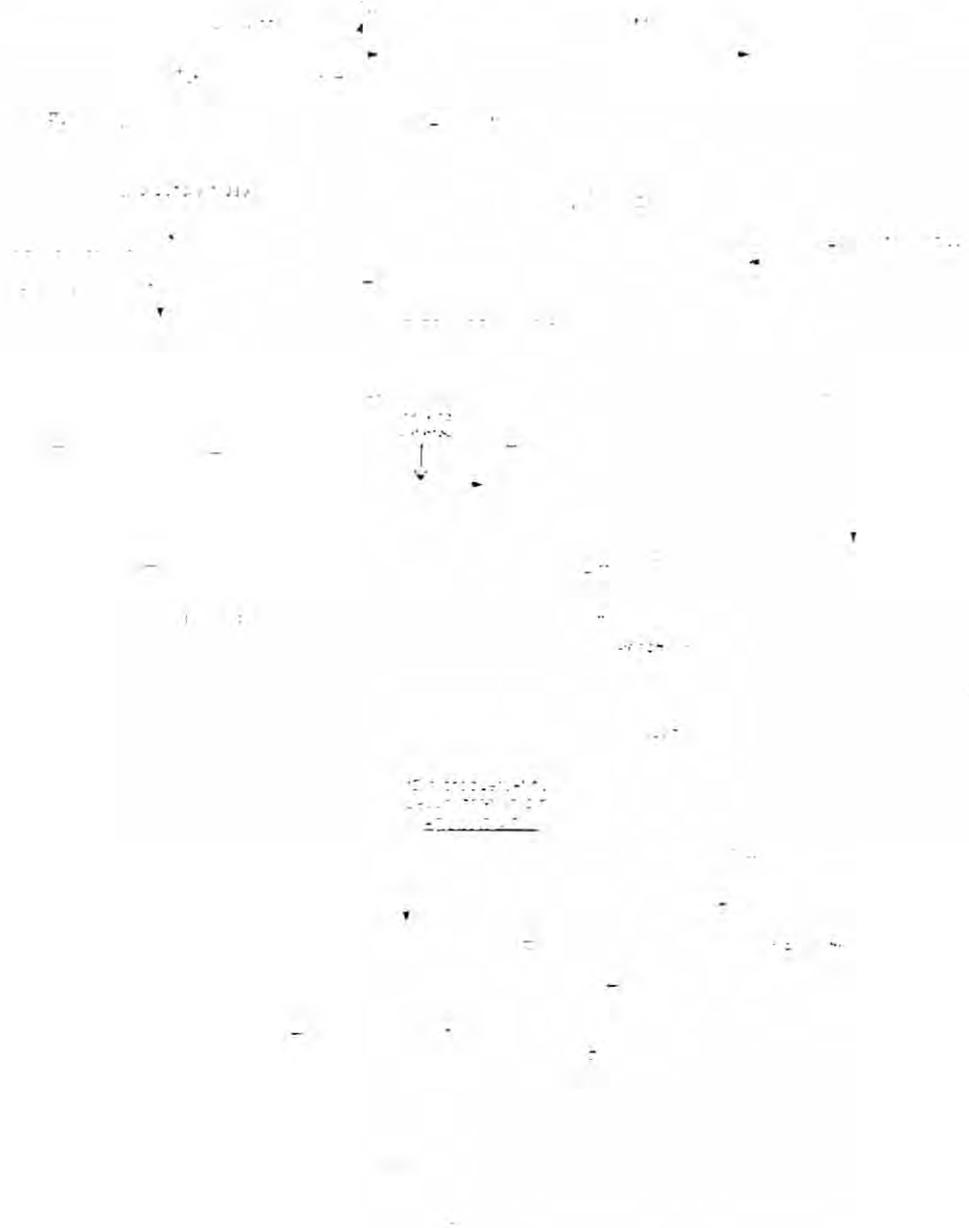


Figura N° 2.10. Ruta de la biosíntesis de las antocianinas, (Mendoza, 2012)

De todas las antocianidinas que actualmente se conocen (aproximadamente 20), las más importantes son la pelargonidina, la delphinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina, nombres que derivan de la fuente vegetal de donde se aislaron por primera vez; la combinación de éstas con los diferentes azúcares genera aproximadamente 150 antocianinas. Estos azúcares comúnmente unidos al compuesto fenólico son la glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa, entre otras de menor significación.³⁸

Las antocianinas son pigmentos lábiles que experimentan reacciones de degradación (siendo ésta su principal limitación para ser productos de alto rendimiento comercial). Sin embargo, al incrementar las sustituciones glucosídicas y en particular, las acilaciones de azúcares residuales con ácido cinámico, incrementará la estabilidad del pigmento. Además, la polimerización de las antocianinas, no solo hará más intenso la coloración del pigmento, sino que la hará más estable a los cambios pronunciados de pH y temperatura.³⁹ Esta polimerización se dará como consecuencia del añejamiento de las bebidas que posean este compuesto, como por ejemplo, el vino tinto.⁴⁰

La gran mayoría de compuestos flavonoides deben ser modificados en su estructura para poder ser absorbidos por el organismo, así por ejemplo, los polifenoles unidos a glucosa, galactosa o xilosa son absorbidos en el intestino delgado tras su

deglucosilación por las enzimas p-glucosidasa y lactasa-floricin-hidrolasa,⁴¹ mientras que los compuestos fenólicos unidos a ramnosa deben llegar al colon y ser hidrolizados por las ramnosidasas bacterianas antes de su absorción. Por el contrario, las antocianinas parecen constituir una excepción a la regla, ya que las formas predominantes en las que son encontradas en la sangre, son sus glucósidos intactos. Algunos autores sugieren que el responsable de este fenómeno, es un mecanismo específico de absorción a nivel gástrico, que podría implicar su transporte vía bilitranslocasa gástrica.⁴² Del mismo modo se ha investigado la viabilidad de los antocianos utilizando diferentes dosis, confirmándose que los mismos son rápidamente absorbidos, y pueden ser detectados una hora y media después de la administración. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas detectadas varían significativamente y en general se detectan niveles muy bajos menores a 1 μ M.⁴³ Además de ello, autores como Serafin *et al.*⁴⁴ aseguran que las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos son reducidas *in vivo* por causa de su afinidad por las proteínas, lo cual es un síntoma evidente que las propiedades antioxidantes de las antocianinas no solo depende de sus características estructurales, sino también, de su interacción con otros componentes del bolo alimenticio.

Según Fennema,⁴⁵ el núcleo flavilio de los pigmentos de antocianina es deficiente en electrones y, por tanto muy reactivo, modificando su poder como pigmento. Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio, tal y como se ilustra en la figura N° 2.11; por esta razón, se recomienda que las latas que contengan alimentos con antocianinas, sean recubiertas por una laca que evite el desprendimiento de estos metales.³⁸

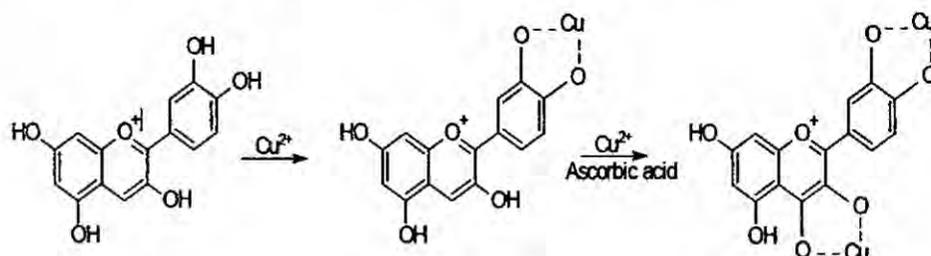


Figura N° 2.11. Posible mecanismo de quelación de un metal de la cianidina en presencia de ácido ascórbico como catalizador, (Youssef El Hajj *et al.*, 2011)

Las antocianinas por su diversidad estructural no son igualmente resistentes a los efectos de deterioro de varios agentes, cuando el grado de hidroxilación de la aglicona se incrementa, la estabilidad generalmente decrece; por otro lado la sustitución con los grupos metoxilos y/o la glicosilación tienen un efecto contrario. Además, el color de éstas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Un incremento en la hidroxilación

produce desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que un incremento en las metoxilaciones produce coloraciones rojas.⁴⁶

Uno de los principales factores del medio que afectan la estabilidad del color de las antocianinas es el pH. Dependiendo del pH las antocianinas pueden existir en cuatro especies diferentes: base quinoidal, catión flavilio, pseudobase carbinol y chalcona. En soluciones muy ácidas (pH < 0,5) el catión flavilio de color rojo es la única estructura. Con incrementos del pH, la concentración del catión decrece al mismo tiempo que se van formando nuevas estructuras incoloras como lo indica la figura N° 2.12⁴⁷

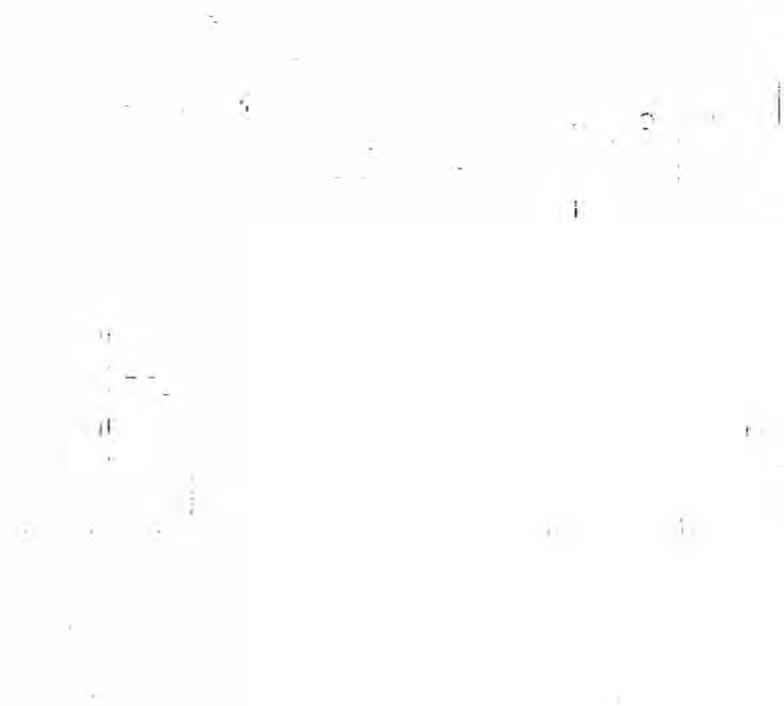


Figura N° 2.12. Estructura de antocianinas a diferentes pH's. (Giusti y Wrosta, 2001)

Esta pérdida del color se verá reflejada en la caída del pico de absorbancia del pigmento a una longitud de onda de aproximadamente 510 nm, tal y como se muestra en la figura N° 2.13. Y justamente en la medida de esta caída de absorbancia debido a la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4,5 incoloras) es que se fundamenta el método espectrofotométrico del pH-diferencial propuesto por Giusti y Wrostedt.³

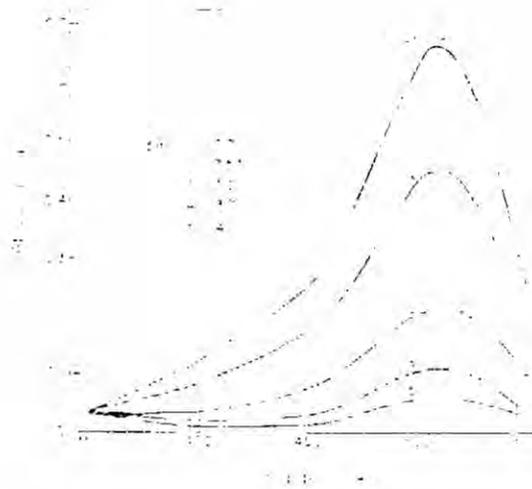


Figura N° 2.13. Espectro de absorción de la cianidina-3-ramnoglucósido a distintos valores de pH, (Francis, 1989)⁴⁸

Para este método se deben preparar diluciones de la muestra líquida con buffer pH 1 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 máxima absorbancia (λ_{max} = 510 nm) y a 700 nm. Para luego obtener la concentración del pigmento,

empleando para ello, la ecuación de la Lambert-Beer que se describe a continuación.

$$C=A/\epsilon L \dots \dots \dots (1)$$

Donde, C es la concentración molar, A es la absorbancia, ϵ corresponde a la absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda) y L es la longitud recorrida en cm.

Por último la concentración en mg/L puede ser determinada multiplicando la concentración molar por el peso molecular del pigmento (PM) y por el factor de dilución (FD).

$$\text{Total antocianinas (mg/L)} = A \times PM \times FD \times 1000 / (\epsilon \times L) \dots \dots \dots (2)$$

Para el cálculo del contenido de antocianinas se utiliza el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antociano presente en mayor proporción, en este caso es la cianidina (PM 449,2 y ϵ 26900).

Además, hay que tener especial cuidado en la pureza de los reactivos, para que la reacción se dé de la forma preestablecida, así como también deberá de tenerse especial cuidado que las muestras estén diluidas lo suficiente como para estar dentro del rango de lectura del espectrofotómetro, el cual por lo general es menor a 1,2.

2.2.5 Metodología de superficie de respuesta

Si se realizaran diversas mediciones del rendimiento de antocianinas con el método del pH diferencial, donde se modifiquen en forma controlada las variables independientes, se podría realizar una optimización de dicho proceso. Para tal fin se podría utilizar el método de experimentación tradicional o uno a la vez, que consiste en mantener constante los valores de todos los factores excepto el que se analiza,⁴⁹ pero no resulta económicamente eficiente, debido a que requiere un gran número de experimentos, consume mucho tiempo y no permite extrapolar ni interpolar datos. En base a estos inconvenientes, una mejor opción a todas luces es el empleo del Método de Superficies de Respuesta (MSR), el cual según Montgomery⁶ es una herramienta estadística matemática que simplifica los diseños experimentales, y permite a la vez manipular simultáneamente muchas variables, obteniéndose así una zona de formulación factible, que corresponde a alternativas de mezclas de diferentes factores y que a su vez cumplen con restricciones impuestas y aclaradas desde el diseño mismo del proceso.

Si todos los factores que se manipulan son variables cuantitativas, es lógico considerar que la variable dependiente puede ser definida como una función de los niveles de estas variables.

$$Y_u = f(X_{1u}, X_{2u}, \dots, X_{iu}) + e_{u\dots\dots\dots} \quad (3)$$

Donde: $u=1,2,\dots,N$ representan las N observaciones en el experimento factorial y X_{iu} representa el nivel i -ésimo factor en la u -ésima observación. A la función f se le llama "superficie de respuesta". El residuo e_u mide el error experimental de la u -ésima observación.⁵⁰

Esta metodología será de mayor utilidad cuando las variables independientes puedan presentar algún tipo de interacción entre sus efectos. Además, la región experimental de la variable dependiente puede poseer una curvatura, que permitirá obtener un punto óptimo. En ese caso se deberá encontrar el punto estacionario del proceso, el cual puede representar un punto máximo cuando se desea maximizar la variable dependiente, o un punto mínimo, cuando lo que se busca es disminuirla.⁶

El objetivo principal de la MSR, según Montgomery⁶, es determinar las condiciones de operación óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se satisfagan los requerimientos de operación. Y es justamente cuando el experimentador se encuentra relativamente cerca del óptimo, que se requiere de un modelo matemático que incorpore la curvatura para aproximar la respuesta. En la mayoría de los casos, el modelo es de segundo orden. Para ajustar tal modelo, se requiere el Diseño Central Compuesto o DCC. En general, el DCC consta de un

factorial 2^k , donde "k" es el número de factores, y n_c corridas centrales. Sin embargo, una ecuación cuadrática posee seis parámetros (constantes) por estimar, tal y como se indica en la ecuación 4, los cuales desafortunadamente no pueden ser hallados con este modelo pues solo posee cinco corridas independientes. Por lo que una solución simple y de gran efectividad es aumentarle al diseño $2k$ "corridas axiales" o estrellas al modelo.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \hat{\beta}_{11} x_1^2 + \hat{\beta}_{22} x_2^2 + \hat{\beta}_{12} x_1 x_2 : \dots\dots (4)$$

Habrán entonces dos parámetros muy importantes en el diseño que deben especificarse⁶: la distancia α de las corridas axiales al centro del diseño y el número de puntos centrales n_c .

Un criterio muy usado para la elección del α es la "Rotabilidad" del modelo, esto quiere decir, que el modelo tenga una varianza razonablemente consistente y estable de la respuesta predicha en los punto de interés. Por lo tanto la varianza de la respuesta predicha es constante en esferas. Un diseño con esta propiedad dejará la variabilidad de "y" sin cambio cuando el diseño se rota alrededor del centro $(0, 0, \dots, 0)$, de ahí el nombre de Diseño Compuesto Central Rotacional (DCCR).

CAPÍTULO III

VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1 Variables de la investigación

3.1.1 Variables independientes

a. Temperatura de extracción

Es la temperatura, en grados Celsius, a la cual se dio el proceso de extracción de antocianinas.

b. Tiempo de extracción

Es el tiempo, en minutos, durante el cual se dio el proceso de extracción de antocianinas.

3.1.2 Variables dependientes

a. Rendimiento de antocianinas

Es la cantidad de antocianinas presentes al final del proceso de extracción, en miligramos por cada gramo de coronta sometida al proceso.

b. Aceptabilidad de la bebida de maíz morado elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura hallados en el estudio

Es el grado de aceptación del producto con respecto a sus cualidades sensoriales.

3.2 Operacionalización de las variables:

Se detallan en la tabla N° 3.1 que se presenta a continuación

Tabla N° 3.1. Operacionalización de las variables

VARIABLES		TIPO	INDICADOR	INSTRUMENTO
VARIABLES INDEPENDIENTES	Temperatura de extracción	Cuantitativo	47,57°C	Termómetro digital
			60°C	
			90°C	
			120°C	
			132,43°C	
	Tiempo de extracción	Cuantitativo	11,36 minutos	Cronómetro
			30 minutos	
			75 minutos	
			120 minutos	
			138,64 minutos	
VARIABLES DEPENDIENTES	Rendimiento de Antocianinas	Cuantitativo	Prueba de pH diferencial	Espectrofotómetro UV-VIS
	Aceptabilidad de la bebida elaborada	Cuantitativo	PRUEBAS AFECTIVAS: prueba de grado de satisfacción con escala Hedónica	Test a panelistas semi entrenados

3.3 Hipótesis general e hipótesis específicas

3.3.1 Hipótesis general

Realizando el proceso de extracción de antocianinas a temperaturas comprendidas desde los 47,57 a 132,43°C, y tiempos desde 11,36 a 138,64 minutos, se podrá caracterizar la zona óptima del proceso y con ello se determinarán los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que se puedan aplicar a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*).

3.3.2 Hipótesis específicas

- a. El modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*), al tratarse de una zona óptima, se regirá por una ecuación de segundo grado.
- b. El contenido de antocianinas de esta bebida será superior a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado.
- c. La aceptabilidad de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura de extracción de antocianinas que se hallarán en el presente estudio, será positiva por parte de los consumidores.

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA

4.1 Lugar de ejecución

Trabajo realizado en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Alimentos de la Universidad Nacional del Callao (agosto 2015).

4.2 Materiales

4.2.1 Insumos

- ✓ Corontas de *Zea Mays* (maíz morado).
- ✓ Ácido Cítrico.
- ✓ Agua tratada.
- ✓ Azúcar blanca.
- ✓ Canela.

4.2.2 Equipos e instrumentos

- ✓ Marmita.
- ✓ Estufa de convección.
- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Mortero.
- ✓ Espectrofotómetro UV-VIS.
- ✓ pH – metro.
- ✓ Refractómetro.
- ✓ Termómetro digital.

- ✓ Buretas.
- ✓ Cronómetro.
- ✓ Probetas.
- ✓ Pipetas.

4.2.3 Utensilios

- ✓ Mesas de acero inoxidable.
- ✓ Cuchillos de acero inoxidable.
- ✓ Jarras medidoras.
- ✓ Espumadera de acero quirúrgico.
- ✓ Cucharones de acero inoxidable.
- ✓ Luna reloj.
- ✓ Espátulas.
- ✓ Pro pipetas.
- ✓ Tamiz de diámetro 1mm.
- ✓ Vaso Becker.
- ✓ Botellas de vidrio.
- ✓ Tapas plásticas.

4.2.4 Reactivos

- ✓ KCl 0.2M
- ✓ HCl 0.2M.
- ✓ Acetato de sodio.
- ✓ NaOH 1N.
- ✓ Agua destilada.

4.3 Descripción del proceso

El presente estudio fue realizado en dos fases según lo detalla el diagrama de flujo de la figura N° 4.1 de la página 46.

4.3.1 Caracterización del proceso de extracción de antocianinas

El estudio tuvo su primera fase a nivel laboratorio, donde se caracterizó y modeló el proceso de extracción de antocianinas.

a. Recepción

El maíz morado fue adquirido en el mercado mayorista de Santa Anita con una humedad dentro de los estándares del 20-25%, una longitud de 17-20 cm de mazorca, y un peso promedio de 191 g.

b. Pesado

Se realizó el pesado de la mazorca entera, a fin de obtener el rendimiento final del proceso.

c. Selección

Se realizó un muestreo por atributos, donde los criterios de aceptación y rechazo fueron obtenidos de Solid Perú, citado por Mendoza⁵, para mazorcas de primera calidad.

TABLA N° 4.1. Criterios de aceptación de la mazorca de maíz morado (*Zea mays L.*)

CRITERIO	ACEPTACIÓN
Longitud de mazorca	> 15 cm
Daño físico	Ausencia
Daño microbiológico perceptible	Ausencia
Granos no pigmentados	Ausencia

Fuente: Solid Perú, citado por Mendoza (2007)

d. Desgranado

Se realizó en forma manual con el fin de separar el grano de la coronta, quedando solo la coronta en el proceso.

e. Limpieza

Se pasaron las corontas por una zaranda para eliminar pequeñas impurezas.

f. Pesado

Se pesaron los granos y corontas por separado para obtener el porcentaje de rendimiento de las corontas con respecto a la mazorca entera; además, el peso promedio de las corontas fue de 25 g.

g. Laminado

Las corontas fueron cortadas en láminas circulares de aproximadamente 3 mm de espesor, y así incrementar la superficie de contacto en el posterior proceso de secado.

h. Secado

Fue llevado a cabo en una estufa de convección (sin control del flujo de aire) a una temperatura de 65 °C por 2 horas, hasta alcanzar una humedad aproximada del 8%, con una carga de secado de 0,47 g/cm².

i. Molienda

Se hizo para incrementar la superficie de contacto entre la muestra y el solvente, aunque al realizarse manualmente, en un mortero, su tamaño de partículas no fue estándar.

j. Pesado

Se pesaron las corontas molidas para determinar el rendimiento que se obtendrá del proceso de extracción, en mg de antocianinas en función a cada gramo de coronta sometida al proceso.

k. Dilución:

Las corontas molidas se diluyeron en el líquido de extracción, el cual fue agua tratada regulada a pH 2 con ácido cítrico, en una relación de 2,5 g de coronta molida en 100 ml de líquido de extracción.

l. Extracción de antocianinas

Las corontas molidas y disueltas en agua tratada con pH regulado, se sometieron a tratamiento térmico de acuerdo a los parámetros pre-establecidos en el diseño de la tabla N° 4.2 de la página 48, obteniéndose un extracto colorido y rico en antocianinas.

m. Enfriado y Filtrado

Se bajó la temperatura hasta 30 °C y luego se procedió a filtrar el extracto con malla de 1 mm de diámetro a fin de retirar las partículas suspendidas en él.

n. Cuantificación de antocianinas en el extracto

Para ello se empleó el método de pH diferencial descrito por Giusti y Wroslad³.

o. Elaboración de la superficie de respuesta

Para el procesamiento de datos se usó un Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR) con 4 (2^k) puntos factoriales, 4 ($2k$) puntos axiales y 5 repeticiones en su punto central, teniéndose un total de 13 tratamientos.

p. Obtención de los parámetros óptimos

Los parámetros óptimos del proceso se hallaron con la metodología del punto estacionario y análisis canónico descrito por Montgomery.⁶

4.3.2 Elaboración de la bebida en una planta piloto

En la segunda fase del estudio se procedió a elaborar la bebida utilizando para esto una formulación base (extracto de maíz morado, azúcar blanca, canela, ácido cítrico y agua tratada); además, al extracto de maíz morado, obtenido con los parámetros óptimos encontrados en la primera etapa del estudio, se le adicionó una mezcla de agua tratada, para luego estandarizarla y pasteurizarla. La cantidad de los insumos empleados estuvo en función a alcanzar los siguientes parámetros finales en la bebida,

✓ pH = 3

✓ Acidez = 0,2 % de ácido cítrico

✓ °Brix = 13

Para elaborar la bebida se repitieron los pasos de la primera fase, desde el ítem "a" hasta el "m", mientras que en paralelo, el agua tratada y la canela, pasaron por los siguientes tratamientos antes de ingresar a la línea principal del proceso.

- **Lixiviación**

Se llevó a cabo a 80 °C por 3 minutos, con el fin de transferir los compuestos aromáticos y saborizantes de la canela al líquido, siendo la masa de la canela equivalente al 0,05% del volumen del líquido.

- **Filtrado**

Fue en caliente y con malla metálica de 1 mm de diámetro.

Retomando el extracto de corontas de maíz morado, se siguieron los siguientes pasos.

- n. **Mezclado**

Se mezcló el agua tratada, que estaba a 78 °C, con el extracto de maíz morado (*Zea mays L.*) en una relación volumétrica de 2 de agua tratada y 1 de extracto. La agitación fue constante.

- o. **Estandarizado**

Se realizó a una temperatura de 70°C adicionándole ácido cítrico y azúcar blanca hasta alcanzar una acidez de 0,2% de ácido cítrico y 13 ° Brix, mientras se continuó agitando.

p. Pasteurizado

Se mantuvo la temperatura a 72 °C por 10 minutos.

q. Envasado

Se realizó al vacío, en frascos de vidrio opacos de 250 ml y tapa de cierre rosca, para evitar el descenso de su contenido de antocianinas.

r. Enfriado

El producto fue enfriado rápidamente para mantener su calidad.

s. Etiquetado

Se colocó toda la información del producto.

t. Almacenado

Se almacenaron en un lugar limpio, fresco, seco, y evitando lo más posible el contacto con la luz, pues ello provocaría la degradación del pigmento.

Por último a la bebida elaborada a nivel piloto se le hizo la prueba sensorial de "Grado de Satisfacción" (que se describirá posteriormente en la página 56), y la cuantificación de antocianinas con el método del pH diferencial, lo mismo que se le hizo a una bebida comercial actualmente vigente en el mercado de la misma formulación, y por último se procedió a realizar una prueba estadística de comparación de medias estableciendo si existen diferencias significativas o no entre sus rendimientos de antocianinas, usando el estadístico "T de Student".

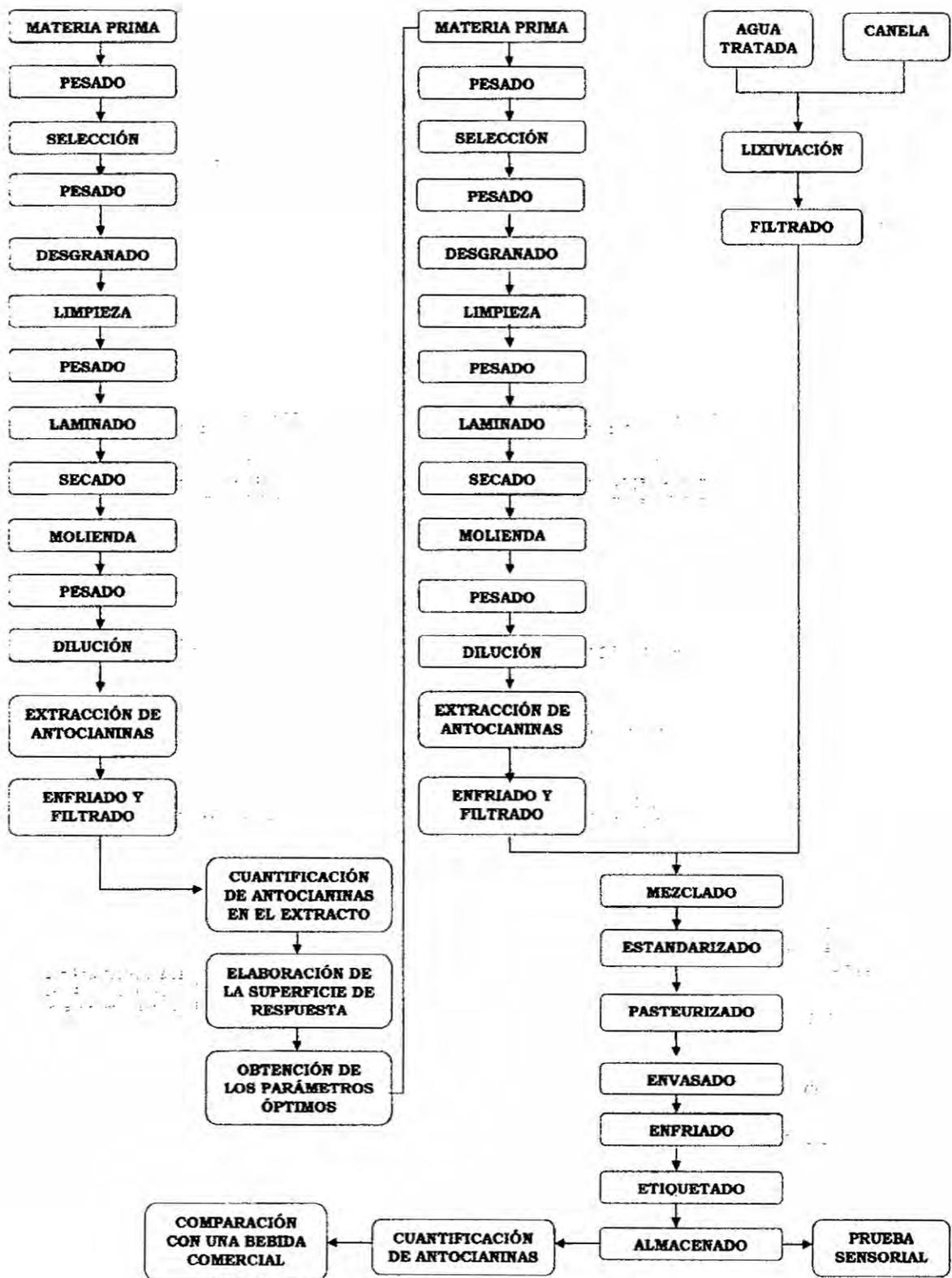


Figura N° 4.1. Diagrama de flujo del estudio.

4.4 Tipo de investigación

Se realizó una investigación del tipo aplicada porque el propósito de este estudio es resolver un problema de naturaleza práctica, pues así sus resultados serán de posterior utilidad para mejorar el procesamiento de bebidas a base de maíz morado (*Zea mays L.*). Además, esta investigación es experimental y cuantitativa por cuanto se recolectaron datos a través de la experimentación en laboratorio a partir de la operacionalización de las variables bajo estudio.

4.5 Diseño de la investigación

Se realizó un Diseño Central Compuesto Rotacional (DCCR), donde las variables independientes o "Factores" del diseño fueron

- **FACTOR A: (X_1) Temperatura;**
 - ✓ nivel bajo: 60°C
 - ✓ nivel alto: 120°C
 - ✓ puntos axiales: 47,57 y 132,43°C
 - ✓ punto central: 90°C
- **FACTOR B: (X_2) Tiempo;**
 - ✓ nivel bajo: 30 minutos
 - ✓ nivel alto: 120 minutos
 - ✓ puntos axiales: 11,36 y 138,64 minutos
 - ✓ punto central: 75 minutos

Además, tal y como lo muestra la tabla N° 4.2 los niveles del diseño fueron codificados, para facilitar los posteriores cálculos, con -1 para los niveles bajos, con +1 para los altos; los puntos centrales con 0 y los puntos axiales con $\sqrt{2}$ y $-\sqrt{2}$, para sus niveles superiores e inferiores respectivamente; haciendo una corrida en cada uno de los puntos factoriales y axiales, mientras que para los puntos centrales se hicieron cinco réplicas.

TABLA N° 4.2. Diseño básico para el desarrollo de la superficie de respuesta

VARIABLES NATURALES		VARIABLES CODIFICADAS		ORDEN DE CORRIDA
FACTOR A	FACTOR B	X ₁	X ₂	
60	30	-1	-1	5
120	30	+1	-1	9
60	120	-1	+1	11
120	120	+1	+1	6
90	75	0	0	1
90	75	0	0	2
90	75	0	0	7
90	75	0	0	8
90	75	0	0	13
132.43	75	$\sqrt{2}$	0	3
47.57	75	$-\sqrt{2}$	0	10
90	138.64	0	$\sqrt{2}$	12
90	11.36	0	$-\sqrt{2}$	4

4.6 Población y muestra

4.6.1 Población

Está determinada por la totalidad de corontas de maíz morado (*Zea mays L.*) que se comercializan en el mercado mayorista de Santa Anita en Lima.

4.6.2 Muestra

Para la caracterización del proceso de extracción de antocianinas en el laboratorio, se requirió 1 Kg de maíz morado (*Zea mays L.*), mientras que para la elaboración de la bebida a nivel piloto, se necesitó de 5 Kg y para la comparación del contenido de antocianinas 1L de la bebida comercial.

4.7 Técnica e instrumentos de recolección de datos

Al haberse recogido los datos en forma directa, a través de la manipulación de las variables independientes en el transcurso del experimento, las fuentes presentan un carácter primario; haciendo empleo para ello de las siguientes técnicas

a. Temperatura de extracción

Se midió con un termómetro colocado en el punto central de la marmita donde se realizó el proceso de extracción de antocianinas.

b. Tiempo de extracción

Se inició el conteo del tiempo desde que se alcanzó la temperatura indicada como parámetro de estudio, para ello se hizo empleo de un cronómetro.

c. Rendimiento de antocianinas

Se empleó el método de pH diferencial, de acuerdo a Giusti & Wroslad,³ utilizando un espectrofotómetro UV-VIS y su contenido se expresó como cianidina-3-glucósido de acuerdo a la siguiente expresión

$$\text{Total antocianinas (mg/L)} = A \times PM \times FD \times 1000 / (\epsilon \times l) \dots \dots \dots (2)$$

Donde: A = (A₅₁₀ - A₇₀₀) pH 1,0 - (A₅₁₀ - A₇₀₀) pH 4,5; PM (Peso molecular); FD = factor de dilución; l = longitud de paso de celda en cm; ε = 26900 coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido; 1000 = factor de conversión de g a mg.

d. Aceptabilidad de la bebida de maíz morado elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura hallados en el estudio

Fue determinada por panelistas, los cuales calificaron la bebida asignándole valores del 1 al 9 de acuerdo a la escala Hedónica que se les entregó en forma de un test (Apéndice 10.9), dando por resultado el grado de aceptabilidad de los consumidores.

También se emplearon fuentes de información secundarias, tales como trabajos de investigación y publicaciones teóricas de

diversos autores, de tal forma que representen fuentes fidedignas y confiables de recursos académicos que nos permitan respaldar nuestros resultados y a la vez contrastarlos a fin de lograr alcanzar los objetivos establecidos en el presente estudio.

4.8 Procesamiento estadístico y análisis de datos

Todos los cálculos estadísticos, al igual que las tabulaciones y respectivas gráficas fueron realizadas con el programa Microsoft Excel en su versión 2007.

4.8.1 Para hallar el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*)

Se inició realizando el análisis de varianza para determinar si el modelo lineal se ajusta o no al experimento, pues según Montgomery,⁶ si se está muy cerca de la zona óptima del proceso, el experimento mostrará un mejor ajuste con una ecuación de segundo grado que con una lineal. Para este primer análisis de varianza donde se demostró que un modelo lineal no es el adecuado se utilizaron solo los puntos factoriales y centrales (sin considerar los axiales) del diseño de la tabla N° 4.2 (pág. 48).

Luego al análisis se le incrementaron los puntos axiales, los cuales fueron codificados según el siguiente criterio de rotabilidad

$$\alpha = (n_f)^{1/4} \dots\dots\dots (5)$$

Reemplazando en la ecuación 5 para n_f = número de puntos factoriales, α será igual a $\sqrt{2}$ ó 1.414213, por lo tanto el diseño gráfico del método estadístico usado quedó como se muestra en la figura N° 4.2

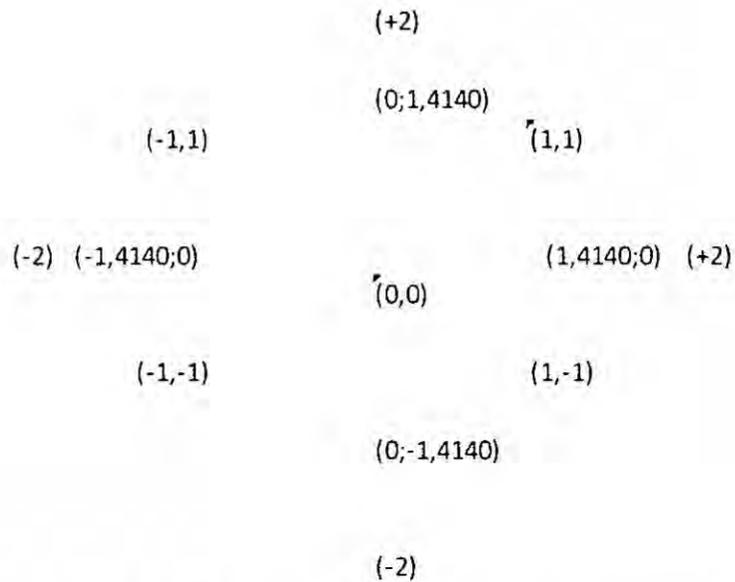


Figura N° 4.2. Diseño central compuesto rotacional

Con la adición de los datos de los puntos axiales se hizo un nuevo análisis de varianza donde se verificó la adecuación del modelo cuadrático descrito a continuación.

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 X_1 + \hat{\beta}_2 X_2 + \hat{\beta}_{11} X_1^2 + \hat{\beta}_{22} X_2^2 + \hat{\beta}_{12} X_1 X_2 + \dots \quad (4)$$

Donde:

X_1 : Factor A

X_2 : Factor B

β : Coeficiente de regresión

Para la estimación de los coeficientes de regresión se hizo empleo del método de mínimos cuadrados, el cual consiste en elegir las β de la ecuación 4 de tal modo que la suma de cuadrados de los errores se minimice. Siendo más sencillo de resolver si las ecuaciones se expresan en su notación matricial, la cual es presentada a continuación en su forma desarrollada y resumida

$$\beta = (X'X)^{-1} X'y \dots \dots \dots (6)$$

Donde:

y = es un vector ($n \times 1$) de las observaciones

X = es una matriz ($n \times p$) de los niveles de las variables
Independientes

β = es un vector ($n \times 1$) de los coeficientes de la regresión

n = número de observaciones totales

$p = k + 1$

k = número de factores en estudio

Una vez obtenida la ecuación de regresión se procedió a realizar la gráfica de superficie de respuesta y la gráfica de contornos, las cuales ayudaron a la visualización de la zona de mayor rendimiento del proceso en estudio.

4.8.2 Para encontrar los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas durante la elaboración comercial de una bebida natural de maíz morado (*Zea mays L.*)

Una vez hallado el modelo matemático, fue aplicada la técnica del punto estacionario para encontrar el punto de mayor rendimiento del proceso, para ello se usó la siguiente ecuación

$$X_s = (-1/2) B^{-1} b \dots \dots \dots (7)$$

Donde:

- ✓ **B**: es una matriz simétrica ($k \times k$) cuyos elementos de la diagonal principal son los coeficientes cuadráticos puros, y cuyos elementos que están fuera de la diagonal principal son la mitad de los coeficientes cuadráticos mixtos.
- ✓ **b**: es un vector ($k \times 1$) de los coeficientes de primer orden.

Sin embargo, fue necesario un análisis de los parámetros obtenidos a fin de determinar si el punto de máximo rendimiento es en realidad, el punto óptimo, pues es imprescindible que los parámetros hallados de tiempo y temperatura sean de fácil operacionalización y además no representen un costo innecesario de recursos para la empresa. Luego de ello, al observar que la aplicación de los parámetros, para el punto de máximo rendimiento, era excesivamente costoso se procedió al análisis

canónico de la superficie de respuesta a fin de encontrar el camino adecuado para modificar los parámetros de tiempo y temperatura hasta que dejen de ser excesivamente costosos sin abandonar la zona de máximo rendimiento del proceso.

4.8.3 Para determinar si los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida son mayores a los que presenta otra bebida de igual formulación ya existente en el mercado

Se hizo una prueba estadística de comparación simple donde se compararon las medias de ambas poblaciones en estudio (la bebida comercial y la elaborada en base a los parámetros establecidos en nuestro estudio).

La prueba estuvo basada en la aceptación o rechazo de las siguientes hipótesis estadísticas

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 > \mu_2$$

Por lo tanto se trató de una prueba de una sola cola, estando regida por el estadístico "T de Student", siendo el estadístico calculado "T_c", que se describe a continuación.

$$T_c = \frac{y_1 - y_2}{S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}} \dots\dots\dots(8)$$

Donde:

$y_1 - y_2$ = es la diferencia de medias de ambas bebidas

S_p = estimación de la Desviación estándar muestral.

n_1 y n_2 = son el número de muestras de ambas bebidas.

Este T_c fue comparado con el T_{tabulado} para poder determinar la existencia o no de diferencias significativas.

4.8.4 Para determinar la aceptabilidad de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura

Se tuvo que convertir la escala hedónica en puntajes numéricos (Extremadamente agradable = 9, hasta extremadamente desagradable = 1). Se promediaron las respuestas de todos los panelistas y se realizó una gráfica de barras para determinar el grado de aceptabilidad del producto.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Determinación de la ecuación polinómica que mejor ajusta al modelo experimental

Tal y como se describió líneas atrás, al culminar la primera etapa del estudio en el laboratorio y tras recolectar, a través del método de pH diferencial, los rendimientos del proceso (Apéndice 10.2), se procedió a determinar si el experimento se encontraba dentro de la región de máximo rendimiento, para ello Montgomery⁶ afirma que el experimento, si ese fuese el caso, debería ajustarse a un modelo polinomial de segundo orden. Por lo que se realizó el Análisis de Varianza (ANVA), donde primero se demostró que un ajuste lineal es inadecuado (tabla N° 5.1).

TABLA N° 5.1. ANVA del modelo de primer orden

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Fc	Ft
MODELO	3	26.84	8.95	28.99	24.26
FACTOR A	1	20.63	20.63	66.85	31.33
FACTOR B	1	5.78	5.78	18.73	31.33
INTERACCIÓN AB	1	0.43	0.43	1.40	31.33
RÉSIDUAL	5	31.06	6.21		
CUADRÁTICA PURA	1	29.83	29.83	96.66	31.33
ERROR PURO	4	1.23	0.31		
TOTAL	8	57.91			

La verificación del término cuadrático puro indica con un nivel de certeza estadística del 99,5% que el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada. Esta curvatura en la superficie puede

indicar que nos encontramos cerca del óptimo. Por lo tanto se procedió al análisis de varianza para el modelo de segundo orden, en el cual los puntos axiales o estrellas han sido adicionados a los datos a procesar, obteniéndose los resultados de la tabla N° 5.2, que se muestra a continuación

TABLA N° 5.2 ANVA del modelo de segundo orden

Fuente de Varianza	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _t
MODELO	5	93.34	18.67	60.49	22.46
FACTOR A	1	25.47	25.47	82.55	31.33
FACTOR B	1	11.97	11.97	38.79	31.33
FACTOR A ²	1	54.30	54.30	175.94	31.33
FACTOR B ²	1	4.75	4.75	15.39	31.33
INTERACCIÓN AB	1	0.43	0.43	1.40	31.33
RESIDUAL	7	3.16	0.45		
FALTA DE AJUSTE	3	1.92	0.64	2.08	31.33
ERROR PURO	4	1.23	0.31		
TOTAL	12	96.49			

En base a que el F_c de la falta de ajuste es mucho menor al F_t para un nivel de significancia del 0,5%, se puede concluir con un nivel de certeza estadística del 99,5% que el modelo de segundo orden es una aproximación adecuada al comportamiento real del experimento. Por lo que se procede a establecer la ecuación de segundo orden que permita predecir los rendimientos de antocianinas cuando la matriz alimenticia es sometida a los factores de extracción que son objeto del presente estudio, obteniéndose entonces la siguiente ecuación

$$Y = 33,32 + 1,78X_1 + 1,22X_2 - 0,33X_1X_2 - 2,79X_1^2 - 0,82X_2^2 \dots\dots(9)$$

Donde "Y" representa el rendimiento de antocianinas en mg/g de muestra, y las "X" son las variables independientes en conducta codificada para los valores establecidos en la tabla N° 4.2 de la página 48.

Para facilitar el manejo de esta ecuación, fueron transformadas las variables codificadas, a variables naturales, obteniéndose la ecuación número 10

$$Y = -3,07 + 0,64X_1 + 0,11X_2 - 0,00024X_1X_2 - 0,003X_1^2 - 0,00041X_2^2$$

Donde "Y" representa lo mismo que en la ecuación número 9, y las "X" los factores preestablecidos en el diseño de la investigación en la página 48 del presente trabajo, para sus valores naturales o reales.

Como un indicador de la precisión de la ecuación obtenida se hizo empleo del coeficiente de determinación "R²", que mide según Montgomery⁶ la proporción de la variabilidad total explicada por el modelo. Sin embargo, según explica él mismo, un peligro potencial con este estadístico es que siempre se incrementa cuando se agrega factores al modelo, incluso cuando estos no son significativos. Por ello se usará también el "R² ajustado", el cual está ajustado para el número de factores del modelo, siendo un mejor predictor que el R².

TABLA N° 5.3. Coeficientes de determinación

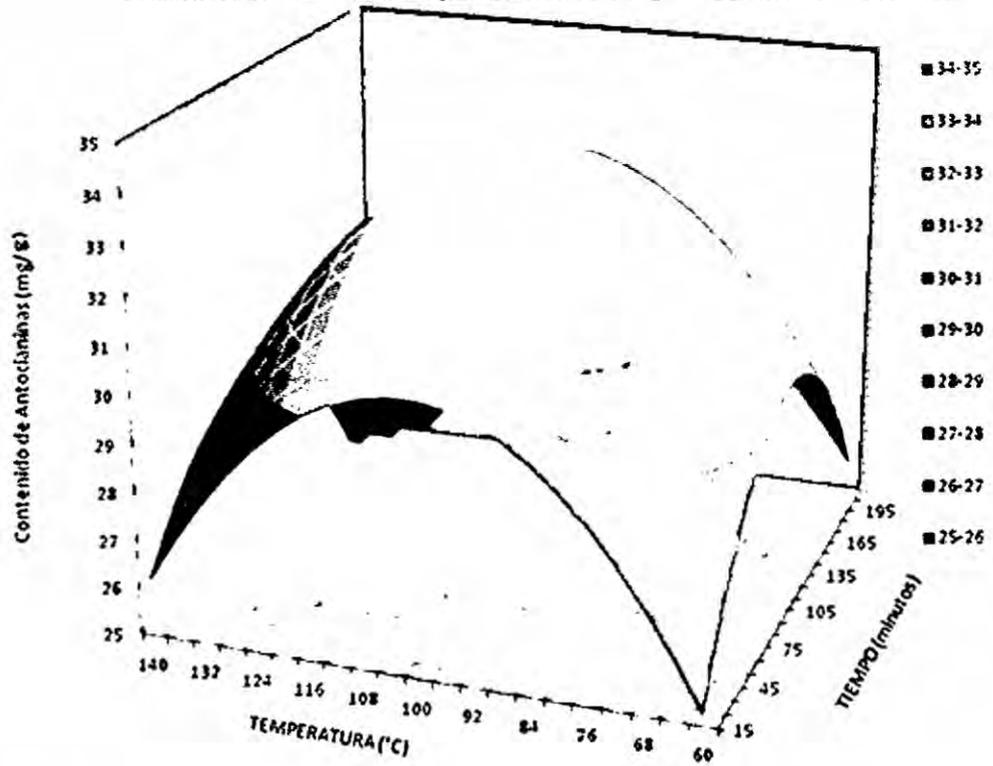
R^2	$R^2_{AJUSTADA}$	DIFERENCIA
0.96	0.94	0.02

Esto corrobora que el modelo matemático establecido, describe de manera muy cercana a la realidad el proceso de extracción de antocianinas bajo las condiciones experimentales pre establecidas y dentro de la región de estudio, ello es importante de resaltar, pues la ecuación aquí obtenida no debe usarse para extrapolar datos fuera del rango de estudio o para condiciones diferentes a las pre establecidas en el diseño.

5.2 Caracterización de la superficie de respuesta

Una vez obtenida la ecuación de segundo orden, se procedió a la caracterización de la superficie de respuesta con los datos ajustados del experimento, para ello se debió utilizar la ecuación 9 y así poder predecir el rendimiento de antocianinas para una combinación de diversas temperaturas versus tiempos; obteniéndose la gráfica N° 5.1

GRÁFICA N° 5.1. Comportamiento del proceso de extracción

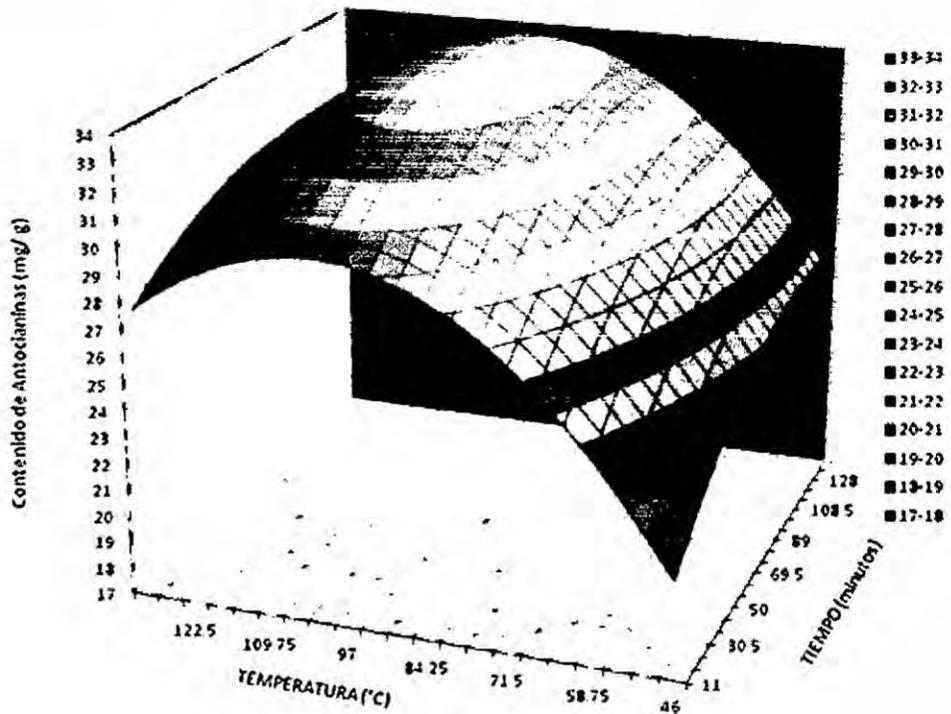


Sin embargo, a pesar que esta gráfica nos muestra a la perfección la conducta del proceso frente a los factores de temperatura y tiempo, (donde la sobre exposición a temperaturas y tiempos altos provoca una disminución del rendimiento por degradación de las antocianinas), ha utilizado la extrapolación de datos fuera del rango del estudio, lo cual según Montgomery,⁶ no es recomendable, por lo que ésta será usada sólo como ayuda visual para sustentar las conclusiones del presente estudio.

Para superar dicho inconveniente se realizó el gráfico nuevamente, esta vez solo para los rangos de los factores pre

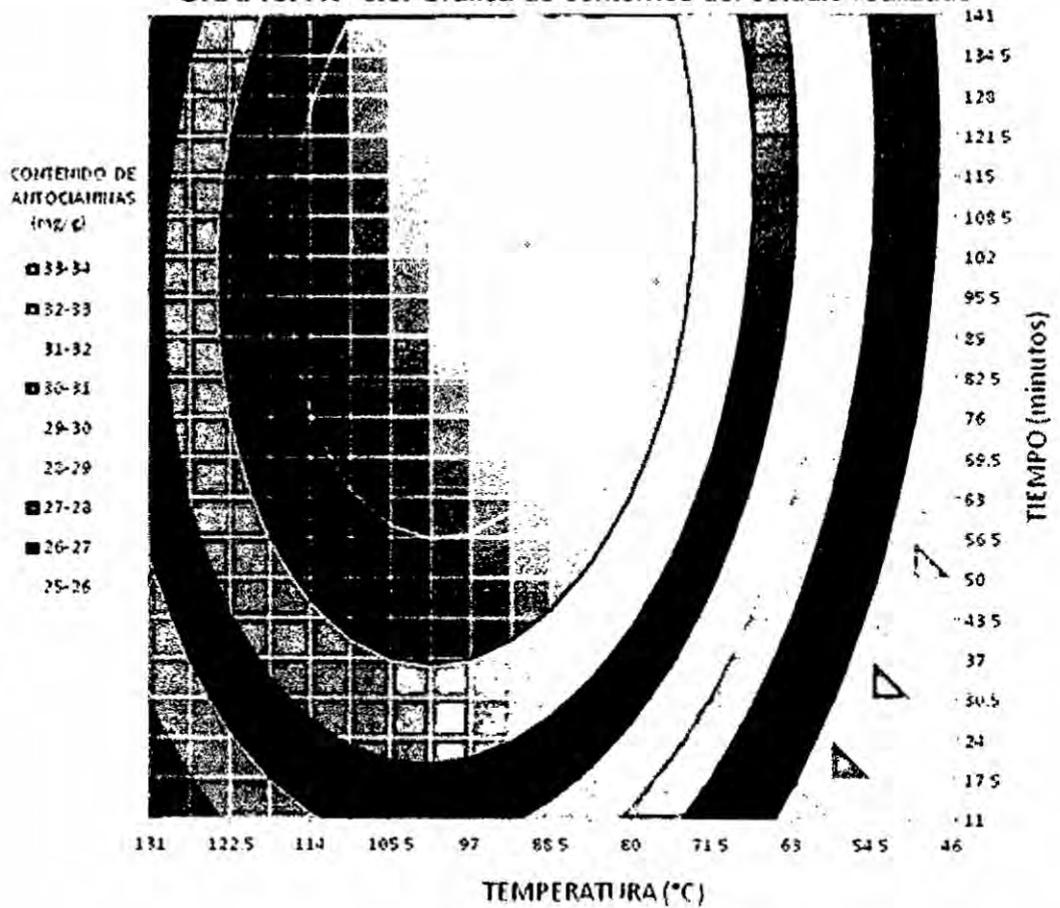
establecidos en el diseño del experimento, obteniéndose la gráfica N° 5.2

GRÁFICA N° 5.2. Superficie de respuesta del estudio realizado



Esta gráfica nos muestra también la tendencia del nutriente a degradarse (y por tanto a disminuir el rendimiento del proceso) a temperaturas excesivamente altas y tiempos prolongados; sin embargo, para facilitar la interpretación y la localización visual del punto de máximo rendimiento, se recurrió a la gráfica auxiliar o también llamada gráfica de contornos, que se muestra en la gráfica N° 5.3

GRÁFICA N° 5.3. Gráfica de contornos del estudio realizado



Esta gráfica facilita la interpretación de la superficie de respuesta, además nos muestra la región de máximo rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, la cual se aprecia de color verde, ello permitirá encontrar los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para el proceso de extracción de antocianinas que se pueda aplicar a la elaboración de una bebida comercial de maíz morado (*Zea mays L.*).

5.3 Determinación de los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para el proceso de extracción de antocianinas

Haciendo empleo de la metodología del punto estacionario descrito anteriormente, se obtuvieron los siguientes parámetros para el máximo rendimiento de extracción de antocianinas

TABLA N° 5.4. Valores de las variables independientes que maximizan la dependiente

NOMENCLATURA	VARIABLE	VALOR ÓPTIMO	UNIDADES
Temperatura	X ₁	98,3942	°C
Tiempo	X ₂	105,8944	Minutos
Rendimiento de Antocianinas	Y	33,991	mg/g

De la tabla anterior se puede decir que en un proceso de extracción donde los parámetros pre establecidos del estudio (pH, solvente de extracción) se mantengan constantes y solo se modifiquen el tiempo y la temperatura a los valores óptimos descritos en la tabla N° 5.4, se obtendrá un máximo de rendimiento de 33,991 mg de antocianinas por cada gramo de coronta de maíz morado. Sin embargo, y a pesar que con estos parámetros se obtiene el máximo rendimiento del proceso, un tiempo de aproximadamente 106 minutos parece ser excesivo y representa un consumo de energía elevado para poder mantener la temperatura constante por todo este tiempo, por lo cual, regresando a la gráfica de contorno de la gráfica N° 5.3 de la

página 63, observamos que la región de máximo rendimiento del proceso es relativamente amplia, y además con base al análisis de varianza de la tabla N° 5.2 de la página 58, también podemos decir que el proceso presenta una mayor dependencia de la temperatura que del tiempo de extracción. Por lo que se decidió disminuir el tiempo del proceso al mínimo posible, a fin de disminuir su costo, ello sin abandonar la zona de máximo rendimiento y utilizando parámetros de las variables independientes que presenten facilidad operacional en un proceso a nivel industrial. Por tanto, se realizó el análisis canónico, a fin de no solo darle fundamento estadístico a la decisión pre dicha, sino también para encontrar el “camino de regreso” desde el punto estacionario a un punto de menor costo sin incurrir en pérdidas considerables en el rendimiento del proceso.

Para ello, fue necesario transformar primero el modelo de la ecuación 10, en un nuevo sistema de coordenadas con el origen en el punto estacionario, y después hacer la rotación de los ejes de este sistema hasta que sean paralelos a los ejes principales de la superficie de respuesta ajustada, para ello se tuvo que desarrollar el siguiente modelo ajustado

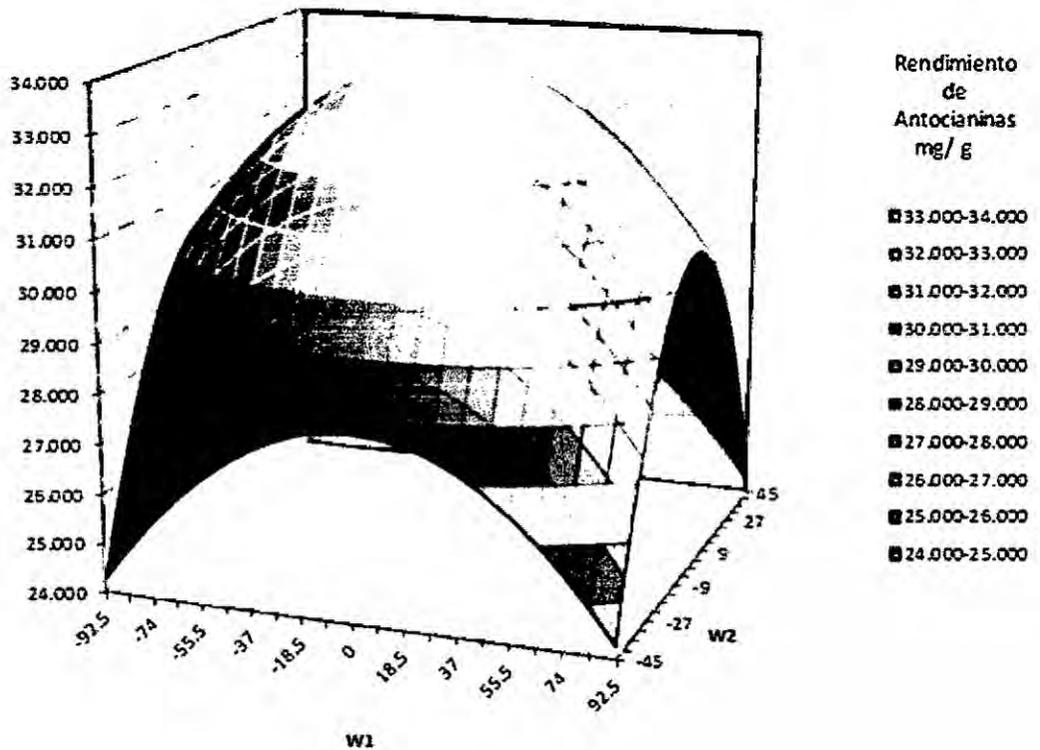
$$y = y_{\text{máx}} + \lambda_1 W_1^2 + \lambda_2 W_2^2 \dots \dots \dots (11)$$

Donde las $\{w_i\}$ son las variables independientes transformadas, las $\{\lambda_i\}$ son constantes y $\{y_{m\acute{a}x}\}$ representa al máximo rendimiento predicho en el punto estacionario. Obteniéndose así la ecuación

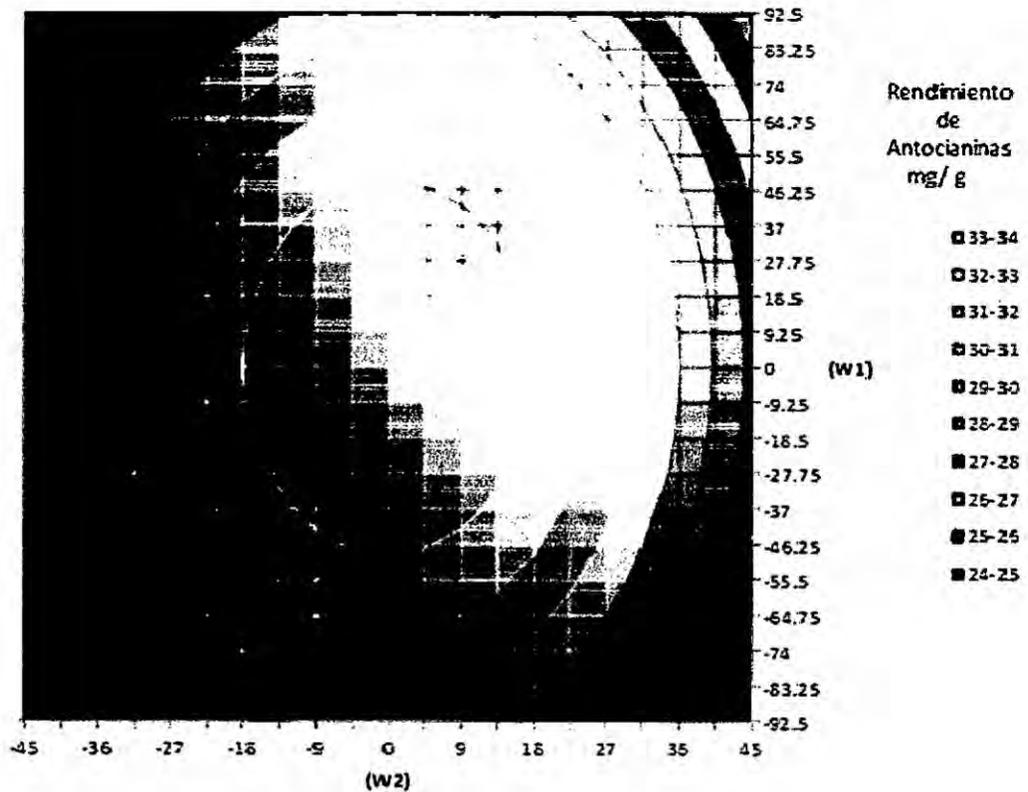
$$y = 33,991 - 0,0004124 w_1^2 - 0,003089 w_2^2 \dots\dots\dots (12)$$

y con ella se realizó las siguientes gráficas

GRÁFICA N 5.4. Superficie de respuesta del modelo canónico



GRÁFICA N° 5.5. Gráfica de contornos del modelo canónico



Analizando la ecuación 12, observamos que la menor modificación al rendimiento del proceso se dará con la modificación la w_1 , por lo tanto ésta será la variable a modificar a fin de disminuir el coste del proceso. Posteriormente al haber analizado la gráfica de contornos N° 5.5, se pudo determinar que el mejor camino es mantener la w_2 lo más cercano posible a "0" y la w_1 lo más cerca posible a -46,25; con ello se disminuirá el coste del proceso sin salir de la zona de máximo rendimiento del mismo. Sin embargo, ahora nace la necesidad de encontrar una relación matemática que permita relacionar los puntos en el espacio (w_1, w_2) con los del espacio (x_1, x_2) .

En general, según Montgomery⁶ las variables x se relacionan con las variables canónicas w por

$$w = M'(x - x_s) \dots \dots \dots (13)$$

Donde M es una matriz ortogonal ($k \times k$). Las columnas de M son los eigenvectores normalizados asociados con $\{\lambda_i\}$. Es decir, si m_i es la columna i -ésima de M , entonces m_i es la solución de

$$(B - \lambda_i I)m_i = 0 \dots \dots \dots (14)$$

Para la que $\sum_{j=1}^k m_{ji}^2 = 1$

Desarrollando las ecuaciones 13 y 14 se llegó a obtener las siguientes relaciones

$$W_1 = -0.04538 X_1 + 0.99897 X_2 + -101.3197907 \dots \dots (15)$$

$$W_2 = -0.99897 X_1 + 0.04538 X_2 + 93.48698037 \dots \dots (16)$$

Reemplazando en la ecuación 14 y 15 para $w_1 = -46,25$ y $w_2 = 0$, se obtienen los siguientes valores para las "X" y el rendimiento predicho

$$X_1 = 96,287^\circ\text{C}$$

$$X_2 = 59,501 \text{ minutos}$$

$$y = 33,078 \text{ mg/g}$$

Comparando estos nuevos valores con los del máximo rendimiento de la tabla N° 5.4 de la página 64, se puede observar que el tiempo de 59,501 minutos que ahora se propone es muy ventajoso frente a los 105,8944 que se proponía en el punto

estacionario, teniendo incluso que disminuir la temperatura en 2,1072°C, lo que representa un ahorro de energía y tiempo considerables, ello incurriendo en una pérdida del rendimiento de apenas 2,67%. Sin embargo, como es fácil de notar, los tiempos y temperaturas propuestos, si bien es cierto pueden ser alcanzados con facilidad a la escala de laboratorio, en un proceso industrial serían difícil de mantener constantes e incluso de alcanzarlos con extrema exactitud, por lo que se decidió explorar la vecindad de los nuevos parámetros obtenidos (tabla N° 5.5), a fin de establecer como puntos óptimos del proceso, aquellos que también sean de fácil operacionalización.

TABLA N° 5.5. Exploración del punto óptimo del proceso

VARIABLES NATURALES		RENDIMIENTO PREDICHO (mg/g)
TEMPERATURA (X ₁)	TIEMPO (X ₂)	
95	55	32,860
100	55	32,950
95	60	33,061
100	60	33,144

Basándonos en los datos de la tabla N° 5.5 se decidió operar el proceso con los siguientes parámetros

TABLA N° 5.6. Valores óptimos del proceso de extracción de antocianinas que se pueden aplicar a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (*Zea mays L.*)

NOMENCLATURA	VARIABLE	VALOR ÓPTIMO	UNIDADES
Temperatura	X_1	100	°C
Tiempo	X_2	60	Minutos
Rendimiento de Antocianinas	Y	33,144	mg/g

Con un análisis rápido de los datos de la tabla N° 5.6 versus los de la tabla N° 5.4 de la página 64 se puede observar que con solo el aumento de dos grados centígrados al proceso de extracción, se puede reducir el tiempo del proceso en un casi 45%, lo cual representa un menor costo del proceso reflejado en un menor consumo de energía, mano de obra, tiempo de trabajo, etc. Ello sin dejar de lado el alto contenido de antocianinas que según la ecuación 10 se esperaría que fuese de 33,144 mg por cada gramo de coronta, lo cual representa solo una disminución del 2,49% de antocianinas en comparación al máximo rendimiento, un valor desde el punto vista comercial, aceptable.

5.4 Comparación del contenido de antocianinas de la bebida elaborada a nivel piloto versus el de una bebida comercial actualmente vigente en el mercado

Una vez concluida la primera fase del estudio llevada a cabo en el laboratorio donde se obtuvieron los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que se pueden aplicar al proceso de elaboración de una bebida comercial de maíz morado (*Zea mays L.*), se procedió a la elaboración del producto a nivel de una planta piloto, siguiendo las pautas establecidas en el diagrama de flujo de la figura N° 4.1 de la página 46. Posteriormente, se sometió el producto al análisis de su contenido de antocianinas con el método de pH diferencial, descrito anteriormente, mismo que se hizo también a una bebida comercial de la misma formulación actualmente vigente en el mercado, a la cual denominaremos como marca "A", con objeto de resguardar en el marco legal la identidad de la marca que no autorizó se emplee su nombre y formulación en el presente trabajo. Con los resultados (Apéndice 10.3) se determinó si existe diferencia significativa entre ambas muestras, según los datos mostrados en la tabla N° 5.7, para satisfacer a la ecuación 8 de la página 55

TABLA N° 5.7. Resumen de la prueba de comparación de medias de dos poblaciones con varianza desconocida

NOMENCLATURA	VARIABLE	VALOR
Contenido de Antocianinas de la bebida elaborada con los parámetros óptimos (promedio)	Y_1	33,138
Contenido de Antocianinas de la bebida comercial (promedio)	Y_2	29,380
Estimación de la varianza muestral	S_p^2	1,4250
Tamaño de muestra de nuestra bebida	n_1	13
Tamaño de muestra de la bebida comercial	n_2	13
Nivel de significancia	α	0,005
Variable estadística calculada	T_c	8,0246
Variable estadística tabulada	T_t	2,7969

Para ello se planteó las siguientes hipótesis estadísticas:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1 : \mu_1 > \mu_2$$

Observando el valor de la T_c versus T_t de la tabla N° 5.7, se concluye con una certeza estadística del 99,5%, que el contenido de antocianinas de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas, es mayor al de la bebida comercial de maíz morado (*Zea mays L.*) actualmente vigente en el mercado, denominada marca "A".

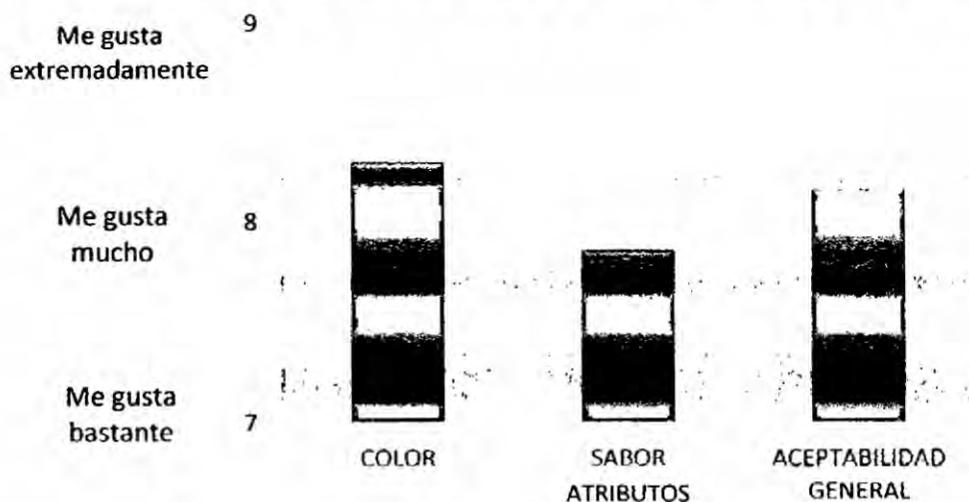
Además que la diferencia entre sus contenidos de antocianinas variará dentro del rango de 2,45 y 5,07 mg/ g. Según la siguiente ecuación

$$y_1 - y_2 - T_{\alpha,2} S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)} \leq \mu_1 - \mu_2 \leq y_1 - y_2 + T_{\alpha,2} S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)} \dots (15)$$

5.5 Prueba del grado de satisfacción de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura

Las pruebas sensoriales se realizaron con estudiantes de la Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao que han cursado de manera aprobatoria el curso de Análisis Sensorial de los Alimentos. La prueba de grado de satisfacción fue realizada a un universo de 50 personas (Apéndice 10.10), obteniéndose los siguientes resultados como consecuencia de la evaluación de las fichas sensoriales (Anexo 10.9)

GRÁFICA N° 5.6. Gráfica de la escala hedónica de la bebida



En la gráfica N° 5.6 se observa el promedio de la escala hedónica versus los atributos de calidad sensorial de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura que se pueden aplicar a la elaboración de una bebida comercial de maíz morado (*Zea mays L.*).

En la misma gráfica se muestra que el atributo de menor puntuación es el sabor, sin dejar de ser bueno, y el de mayor puntuación, el color. Además, la aceptabilidad general de la bebida está en un nivel que nos permite inducir que el producto tendrá buena acogida por parte de los consumidores en el mercado.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.1 Contratación de las hipótesis con los resultados

Para facilitar la interpretación de este ítem se emplearán las siguientes tablas

TABLA N° 6.1. Hipótesis general vs resultados

HIPÓTESIS GENERAL	RESULTADO
Realizando el proceso de extracción de antocianinas a temperaturas comprendidas desde los 47,57 a 132,43°C, y tiempos desde 11,36 a 138,64 minutos, se podrá caracterizar la zona óptima del proceso y con ello se determinarán los parámetros óptimos de extracción de antocianinas que se puedan aplicar a la elaboración de una bebida de maíz morado (<i>Zea mays L.</i>).	Punto máximo de extracción de Antocianinas: X_1 : 98,3942 °C X_2 : 105,8944 minutos Y : 33,991 mg/g Punto óptimo de extracción de Antocianinas que se puede aplicar a la elaboración de una bebida de maíz morado (<i>Zea mays L.</i>): X_1 : 100 °C X_2 : 60 minutos Y : 33,144 mg/100g

Con la metodología de superficie de respuesta (MSR) y utilizando un Diseño Central Compuesto Rotacional, se logró caracterizar la zona óptima del proceso de extracción de antocianinas dentro del rango de los parámetros indicados en la hipótesis general. Luego se empleó la técnica del punto

estacionario y a partir de él, se buscó con el análisis canónico el "camino de regreso" desde el punto estacionario a un punto de menor costo sin recurrir en pérdidas considerables en el rendimiento; con base a parámetros que se puedan operar en los equipos de la planta y que representen un costo bajo de producción. Por lo que la hipótesis general del presente estudio es aceptada.

TABLA N° 6.2. Hipótesis específica 1 vs resultado

HIPÓTESIS ESPECÍFICA 1	RESULTADO
<p>El modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (<i>Zea mays L.</i>) al tratarse de una zona óptima, se regirá por una ecuación de segundo grado.</p>	<p>Ecuación con variables naturales que permita predecir los rendimientos de antocianinas cuando la matriz es sometida a los factores de extracción que son objeto del presente estudio.</p> $Y = -3,07 + 0,64X_1 + 0,11X_2 - 0,00024X_1X_2 - 0,003X_1^2 - 0,00041X_2^2$

Como se observa en la tabla N° 6.2 y en base al análisis de varianza de la tabla N° 5.2 de la página 58, se puede decir con un nivel de certeza estadística del 99,5% que el modelo de segundo orden es una aproximación adecuada al comportamiento real del

experimento, por lo que la hipótesis específica N° 1 del presente estudio queda aceptada.

TABLA N° 6.3. Hipótesis específica 2 vs resultado

HIPÓTESIS ESPECÍFICA 2	RESULTADO
<p>El contenido de antocianinas de esta bebida será superior a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado.</p>	<p>En base a la prueba estadística "T de Student" y con un nivel de significancia de 0,05: Variable estadística calculada: $T_c = 8,0246$ Variable estadística tabulada: $T_t = 2,7969$</p>

Habiéndose planteado la hipótesis nula donde se dice que el contenido medio de antocianinas de nuestra bebida es estadísticamente igual al de una bebida comercial actualmente vigente en el mercado. Ésta se rechazó con un nivel de significancia del 0,5%.

Por lo que se procedió a aceptar la hipótesis alterna de una cola, donde se dice que el contenido promedio de nuestra bebida es estadísticamente superior al de la bebida de la misma formulación y que está actualmente en el mercado. Quedando por tanto, la hipótesis específica N° 2 aceptada.

TABLA N° 6.4. Hipótesis específica 3 vs resultado

HIPOTESIS ESPECIFICA	RESULTADO
la aceptabilidad de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura de extracción de antocianinas, que se hallarán en el presente estudio, será positiva por parte de los consumidores	Observando en la gráfica N° 5.6 que el atributo de menor puntuación es el sabor, sin dejar de ser bueno, y el de mayor puntuación, el color. Además, la aceptabilidad general de la bebida está en un nivel que nos permite inducir que el producto tendrá buena acogida por los consumidores.

Quedando por tanto, la hipótesis específica N° 3 ratificada.

6.2 Contraste de resultados con otros estudios similares

Gorriti *et al.*⁵¹ realizaron la extracción de antocianinas de las corontas de maíz morado a diferentes pH, tiempos, temperaturas y solventes, obteniendo al final de su proceso un extracto rico en antocianinas. Observando que para un proceso de pH 2 y solución extractora de agua destilada, obtuvo su máximo rendimiento (33,509 mg/g) a una temperatura de 90°C y un tiempo de 240 minutos, un rendimiento menor al nuestro, y desde lejos con un tiempo excesivamente prolongado. Esta diferencia se puede deber al tipo de ácido utilizado para ambos procesos, pues en el presente estudio se empleó un ácido orgánico débil, el ácido cítrico, mientras que para su estudio Gorriti *et al.* emplearon HCl, que como ya se mencionó anteriormente degrada la molécula de antocianina; otro

factor muy importante es el tipo de tratamiento estadístico que se empleo en el estudio, pues Gorriti *et al.* solo realizaron un análisis de varianza donde escogieron la mejor combinación entre las que realizaron experimentalmente, mientras que en este estudio se realizó el análisis de superficie de respuestas que permite caracterizar todo el proceso dentro del rango bajo estudio, lo que nos permite alcanzar la optimización del proceso tras un modelamiento matemático con una ecuación de segundo orden.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

En base a los objetivos preestablecidos en el presente estudio se establecen las siguientes conclusiones

- Los parámetros para la máxima extracción de antocianinas en el proceso de elaboración de una bebida de maíz morado son 98,3942°C y 105,44 minutos, obteniéndose 33,991 mg de antocianinas por cada gramo de coronta; sin embargo, tras realizarse el análisis canónico, y en base a la facilidad operacional de los parámetros y buscando la combinación de éstos que produzca un menor consumo de recursos, se eligió una temperatura de 100°C y un tiempo de 60 minutos, como los parámetros óptimos de extracción de antocianinas que se puedan aplicar a la elaboración de una bebida comercial de maíz morado (*Zea mays L.*). Obteniendo un rendimiento de antocianinas de 33,144 mg de antocianinas por cada gramo de coronta, sólo menos del 2,49% con respecto al máximo, por lo que se considera dentro de la zona óptima de rendimiento del proceso.
- La ecuación matemática que ayudará a predecir con razonable exactitud estadística el proceso de extracción de antocianinas bajo los parámetros preestablecidos del estudio es:

$$Y = -3,07 + 0,64X_1 + 0,11X_2 - 0,00024X_1X_2 - 0,003X_1^2 - 0,00041X_2^2$$

- Con base a la prueba "T de Student" y a un nivel de significancia del 0,5% se puede concluir que la bebida elaborada con los parámetros

óptimos de tiempo y temperatura para la extracción antocianinas, presenta un mayor contenido de antocianinas (33,138 mg/g) que una bebida comercial (29,380 mg/g), de las mismas características y formulación, actualmente vigente en el mercado a la cual se le denominó marca "A"; siendo su contenido superior en un rango comprendido entre 2,45 y 5,07 mg/g.

- Con la prueba sensorial de grado de satisfacción realizada, se puede concluir que la aceptabilidad general de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para el proceso de extracción de antocianinas, está en un nivel que nos permite inducir que el producto tendrá buena aceptación de los consumidores en el mercado.

Otras conclusiones a las que se pudieron arribar analizando los resultados obtenidos en el presente estudio

- Con base al análisis de varianza de la tabla N° 5.2 de la página 58, se puede concluir con un nivel de significancia del 0,5% que el proceso de extracción de antocianinas a un pH 2 y usando como solvente una solución de agua tratada; es dependiente en mayor proporción de la temperatura que del tiempo, y ello se hace notar al momento de la elección de los parámetros óptimos de extracción que se pueden aplicar a la elaboración de una bebida comercial, pues con aumentar menos de 2°C se logró disminuir en aproximadamente 45% el tiempo de proceso (sin abandonar la zona óptima del mismo).

- Con fundamento en el análisis de varianza de la tabla N° 5.2 de la página 58, se puede concluir que en el proceso de extracción de antocianinas a un pH 2 y usando como solvente una solución de agua tratada, la interacción entre la temperatura y el tiempo de extracción es estadísticamente insignificante con un nivel de significancia del 0,5%.
- Debido a las limitaciones propias de una producción a nivel piloto en contraste con una a gran escala y con maquinarias con tecnología de punta, el sabor de nuestra bebida fue el atributo sensorial de menor puntuación, siendo ésta la que influyó de manera negativa la aceptabilidad general del producto.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda adicionar un porcentaje de granos de maíz morado molido a la formulación de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura determinados en el presente estudio a fin de mejorar la aceptabilidad del sabor de la misma. Sin embargo, este porcentaje a añadir deberá ser determinado en un posterior estudio.
- Se recomienda evitar el uso de temperaturas elevadas y tiempos prolongados en procesos de extracción de compuestos orgánicos, pues estos si bien pueden desprender los compuestos con mayor facilidad, también provocarán la degradación de los mismos, lo cual dará un efecto neto de disminución del rendimiento del proceso.
- Cuando se busca el "camino de regreso" desde el punto estacionario a un punto de menor costo sin recurrir en pérdidas considerables en el rendimiento, se hace imprescindible el empleo del análisis canónico, el cual también nos dará a través de sus coeficientes una idea muy exacta de que constante se debe modificar a fin de que el rendimiento se vea perjudicado lo menos posible; sin embargo, también se recomienda analizar bien el costo en recursos que representa la modificación de cada variable, pues la que menos afecte el rendimiento también podría ser la más costosa de modificar.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CASTAÑEDA-OVANDO, A. *et al.*; 2009; Chemical Studies of Anthocyanins in Foods: a review. *Food Chemistry*, pp: 859-871.
2. DECKER, E. A. 1997. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*. pp: 396 -398.
3. GIUSTI MM, WROSLTAD RE., 2001. Characterization and measurements of anthocyanins by UV-VIS spectroscopy. En *Current protocols in Food Analytical Chemistry* pp: 13.
4. HARBOME, J.B. 1958. "Spectral methods of characterizing anthocyanins", *Biochemical* pp: 22-28.
5. MENDOZA, M. 2007. Conociendo la cadena productiva de maíz morado en Ayacucho. pp: 20-24.
6. MONTGOMERY, D. 2002. Diseño y análisis de experimentos, pp: 427-500.
7. ROONEY, L. y col. 2004. Tortillas. In: *Encyclopedia of grain science*. Elsevier: Oxford, UK. Vol. 3. pp: 290-298.
8. ST. LEGER A. y col. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wines. *Lancet*, 1, pp: 1017-1020.
9. MENDOZA, C. 2012; Las antocianinas en el maíz: su distribución en la planta y producción; Tesis para optar al grado de Maestro en

Ciencias; Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas; Texcoco-México.

10. GOODMAN, M. M. y W. L. BROWN; 1998; Races of corn. En: Corn and Corn Improvement. Sprague G. F. y J.W. Dudley (eds.) 3rd Ed. Vol. 18 USA. pp: 33-79.
11. CROTEU R, *et al.*; 2000. Natural products (secondary metabolites). En: Biochemistry and Molecular Biology of Plants (Buchanan B, Grissem W, Jones R Eds.) American Society of Plant Phytochem Anal 17:8-14.
12. FREDES, C.; 2009; Antioxidantes en Berries Nativos Chilenos; Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas de la Pontífice Universidad Católica de Chile. N° 6; pp: 470-476
13. CRIQUI MH, RINGEL BL. 1994. Does diet or alcohol explain the French Paradoxa? Lancet 344:1719-1723.
14. MANACH C, *et al.*; 2004; Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. Review of 97 bioavailability studies. 81: 230-242.
15. MARTÍNEZ, S.; 2002; Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes; Departamento de Fisiología, Universidad de León; España XVII (6) 271-278.
16. RICE-EVANS CA, *et al.*; 1997; Antioxidant properties of phenolic compound. Trends Plant Sci 2:152-159.

17. LEE J, *et al.*; 2004; Reactive Oxygen Species, Again, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*. 3:21-33.
18. TAWAHA K, *et al.*; 2007; Antioxidant Activity and total Phenolic Content of Selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*; 104: 1372-1378.
19. WEYEMI U, *et al.*; 2012; The Emerging Role of ROS-generating NADPH oxidase NOX4 in DNA-damage response. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*; 7: 77-81.
20. LEÓN DE FERNÁNDEZ O.S.; 2004; Estrés Oxidativo Teoría. En: Rosas A.R. *Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales*. CYTEC. Carácas.
21. CAROCHO M, FERREIRA I.; 2013; A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. *Food and Chemical Toxicology*; 51: 15-25.
22. HALLIWELL B; 1994; Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease: Curiosity, Cause, or Consequence. *Lancet*; 344:721-724.
23. FERRER Y. *et al.*; 2009; El Estrés Oxidativo y su Impacto en las Cataratas. *Rev. Cub. Farm.*; 43(3): 1-5.
24. BUITRAGO D., *et al.*; 2005; Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*; 27: 231-234.

25. SIES H.; 1993; Strategies of antioxidant defense. Eur J. Biochem; 213-219.
26. CARDOSO M. *et al.*; 2013; A review on antioxidant, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology; 51: 15-25.
27. DORMAN H., HILTUNEN R.; 2004; Fe (III) reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis L.*) extract and subfractions. Food Chemistry; 88: 193-199.
28. FUCHS J.; 1998; Potentials and limitations of the natural antioxidants alpha-Tocopherol. L-Ascorbic Acid and Beta-Caroteno in cutaneous photoprotection. Free Radic Biol Med 25(7): 848-873.
29. NICOLAIEW N. *et al.*; 1998; Comparison between extra virgin olive oil and oleic acid rich sunflower oil: effects on postprandial lipemia and LDL susceptibility to oxidation. Ann Nutr. Metab. 42: 251-260.
30. GARCÍA A.; 2005; Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Tesis doctoral Europea. Facultad de Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos; Universidad de Murcia, España.
31. SEERAM N., NAIR M.; 2002; Inhibition of lipid peroxidation and structure activity-related studies, of the dietary constituent's anthocyanins, anthocyanidins and catechins. J. Agr. Food Chem. 50: 5308-5312.

32. YOUSSEF EL HAJJ *et al.*; 2001; Low cost process for phenolic compounds extraction from cabernet sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) Optimization by Response Surface Methodology; en Food and Nutrition Science; 3: 89-103.
33. VENERO J.; 2002; Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. Rev. Cub. Med. Milit.; 33(1): 1-4.
34. MUÑOZ O. *et al.*; 2003; Antocianos, colorantes de aplicación industrial. Revista de Fitoterapia 3(2): 147-152.
35. KONG J. *et al.*; 2003; Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry 64, 923-933.
36. JING P.; 2006; Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemopreventive activity and structure/function relationships. PhD thesis; The Ohio State University, U.S.A. pp: 5-90.
37. LEWIS C., WALKER J.; 1995; Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. Food Chemistry; 54: 319-325.
38. BADUI S.; 1999; Química de los alimentos; Longman de México Editores; México; 648 pp.
39. WROSTALD R.; *et al.*; 2005; Tracking color and pigment changes in anthocyanins products. Trends in Food Science and Technology; 16: 423-4280.
40. CASSANA F., CATANIA C.; 2006; Pirantocianos, nuevos pigmentos en los vinos tintos: aspectos científicos e implicancias tecnológicas. Revista de Enología Vol 3.

41. KARAKAYA S.; 2001; Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 52: 501-508.
42. PASSAMONTI S. *et al.*; 2002; the interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 631-636.
43. PRIOR, L. y X. WU; 2006; Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research* 40(10): 1014-1028.
44. SERAFIN M. *et al.*; Antioxidant activity of blueberry fruits is impaired by association with milk. *Free Radical Biol. Med.* 46: 769-774.
45. FENNEMA O.; 1993; *Química de los alimentos*; ed. Acribia S.A.; Zaragoza, España; 1095 pp.
46. GARZÓN G.; 2008; Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión *acta Biol. Colomb.*; 3: 27-36.
47. CHANDRA A. *et al.*; 1992; Evaluation and characteritaton of anthocyanins pigments in tart cherries (*Prunus Cerasus L.*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 40: 867-898.
48. FRANCIS F.; 1989; Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 28:273-301.
49. PINTO J.; 1995; Aplicación de la metodología de superficie de respuesta en la optimización del proceso de clarificación de jugo de manzana. Tesis para optar el grado académico de Ingeniero de Industrias Alimentarias. UNALM. Perú.

50. COCHRAN W., COX G.; 1990; Diseños experimentales. Segunda edición. Editorial Trillas. México.
51. GORRITI, A *et al.*; 2009; Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays L.* "Maíz morado", Revista de Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM; 12(2): 64-74.

CAPÍTULO X APÉNDICES

10.1 Matriz de consistencia:

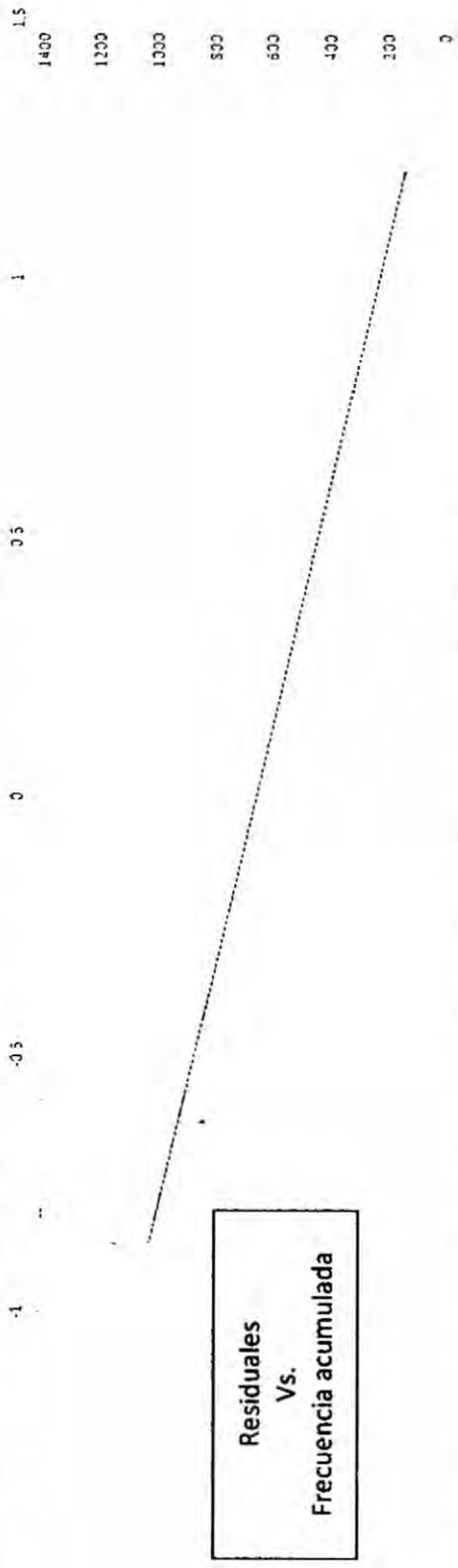
"OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS APLICADO A LA ELABORACIÓN DE UNA BEBIDA DE MAIZ MORADO (Zea mays L.)"

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES		
			TIPO	NOMBRE	
¿Cuáles son los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que puedan aplicarse a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.)?	Hallar los parámetros óptimos de tiempo y temperatura para la extracción de antocianinas que puedan aplicarse a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.).	Hg: Realizando el proceso de extracción de antocianinas a temperaturas comprendidas desde los 47,57 a 132,43°C, y tiempos desde 11,36 a 138,64 minutos, se podrá caracterizar la zona óptima del proceso y con ello se determinarán los parámetros óptimos de extracción de antocianinas que se pueda aplicar a la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.).	VARIABLES INDEPENDIENTES	TEMPERATURA	INDICADORES
					47,57°C
					60°C
					90°C
				120°C	
ESPECÍFICOS	ESPECÍFICOS				
Problema específico 1: ¿Cuál es el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y la temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.)?	Objetivo específico 1: Elaborar el modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y la temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.).	H1: El modelo matemático que permitirá predecir el rendimiento del proceso de extracción de antocianinas, tras la modificación del tiempo y la temperatura durante la elaboración comercial de una bebida de maíz morado (Zea mays L.) al tratarse de una zona óptima, se registrará por una ecuación de segundo grado.	VARIABLES DEPENDIENTES	TIEMPO	INDICADORES
					11,36 minutos
					30 minutos
					75 minutos
					120 minutos
				138,64 minutos	
Problema específico 2: ¿Serán los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida mayor a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado?	Objetivo específico 2: Determinar si los valores de antocianinas obtenidos en esta bebida son mayores a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado.	H2: El contenido de antocianinas de esta bebida será superior a los que presenta otra de la misma formulación ya existente en el mercado.	VARIABLES DEPENDIENTES	RENDIMIENTO DE ANTOCIANINAS	INDICADORES
					Prueba de pH diferencial
Problema específico 3: ¿Qué aceptabilidad tendrá la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas?	Objetivo específico 3: Hallar la aceptabilidad que tendrá la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura en el proceso de extracción de antocianinas.	H3: la aceptabilidad de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura de extracción de antocianinas, que se hallarán en el presente estudio, será positiva por parte de los consumidores.		ACEPTABILIDAD DE LA BEBIDA ELABORADA	PRUEBAS AFECTIVAS: prueba de grado de satisfacción con escala Hedónica

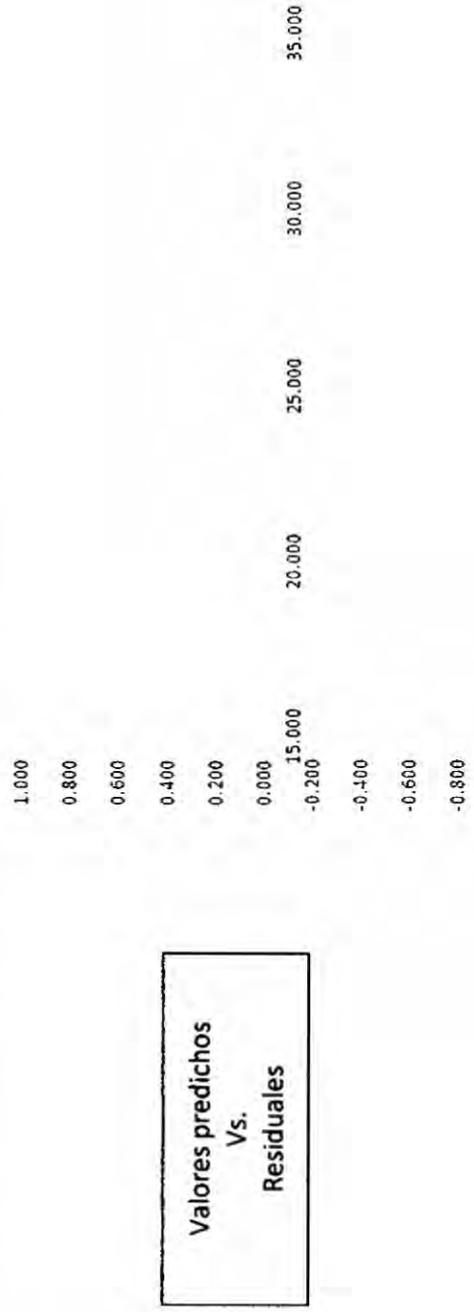
10.2 Datos del rendimiento de antocianinas para obtener los parámetros óptimos de tiempo y temperatura del estudio:

VARIABLES NATURALES		RESPUESTA (mg/g)
A	B	y
60	30	25.856
120	30	31.056
60	120	28.918
120	120	32.802
90	75	32.761
90	75	33.012
90	75	33.405
90	75	33.212
90	75	34.219
132.43	75	29.642
47.57	75	25.971
90	138.64	33.489
90	11.36	29.969

10.3 Verificación gráfica del supuesto de normalidad del modelo:

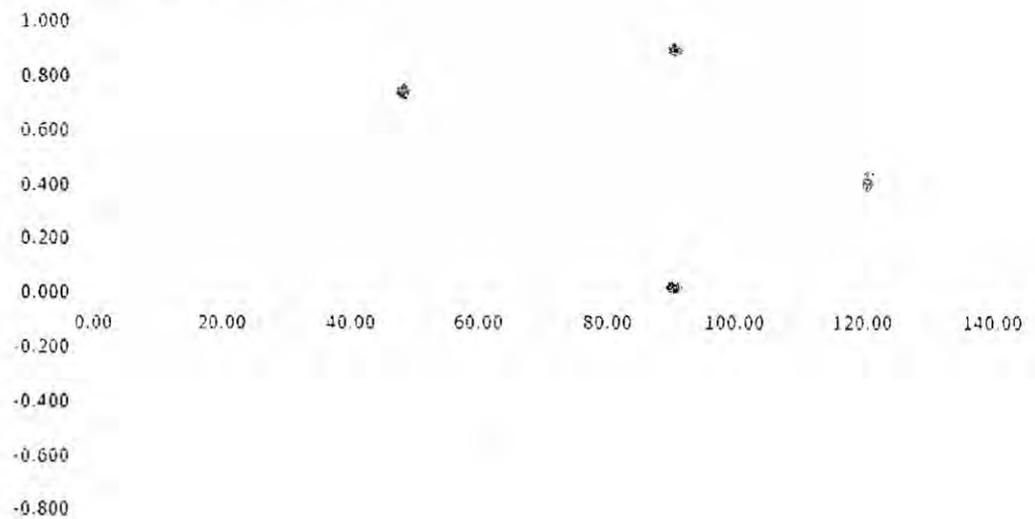


10.4 Verificación gráfica del supuesto de igualdad de varianza del modelo:

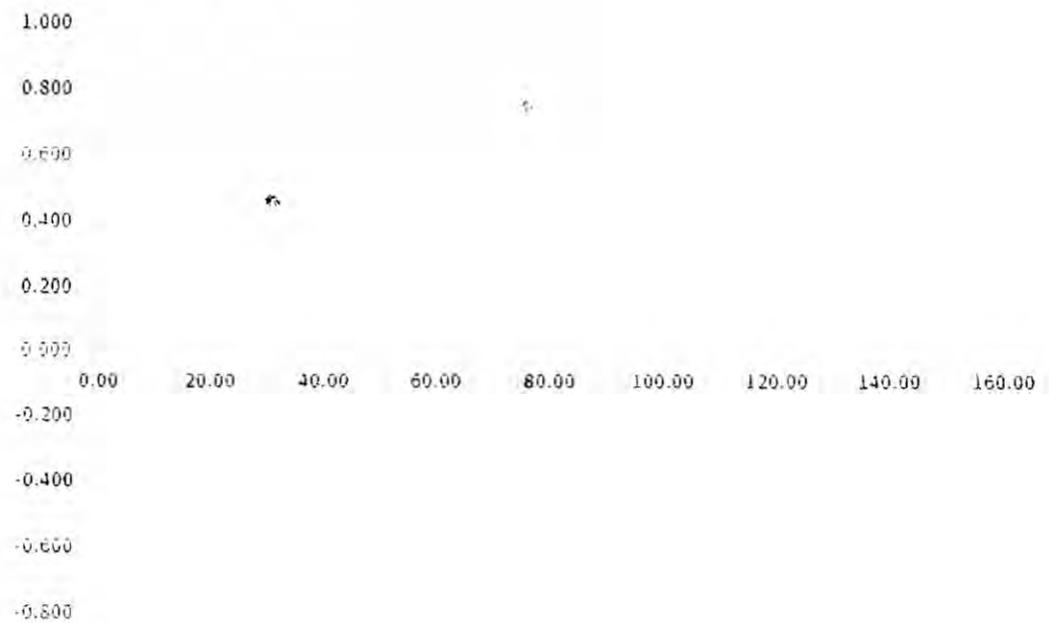


10.5 Factores del estudio versus los residuales:

10.5.1 Factor A vs residuales



10.5.2 Factor B vs residuales



10.6 Análisis del máximo punto atípico:

e =	-1.54	d =	2.797
Cme =	0.309		

Un Residual Estandarizado mayor a ± 3 o ± 4 , merece especial atención

Donde:

e = máximo residual

Cme = Cuadrado medio del error

10.7 Datos de rendimientos de antocianinas de la bebida elaborada con los parámetros óptimos de tiempo y temperatura vs los de la bebida comercial de marca "A"

BEBIDA CON LOS PARÁMETROS ÓPTIMOS (mg/100g)	BEBIDA COMERCIAL (mg/g)
33.985	28.631
33.542	30.658
32.159	30.659
33.222	27.561
31.567	28.781
34.001	28.932
33.902	29.851
32.654	28.645
33.654	27.216
33.060	28.3001
31.456	30.985
34.128	32.058
33.458	29.666

10.8 Análisis de comparación simple del rendimiento medio de antocianinas:

NOMENCLATURA			
$\mu_1 =$	Media de la Población en estudio 1	$T_t =$	Variable Estadística tabulada
$\mu_2 =$	Media de la Población en estudio 2	$T_c =$	Variable Estadística calculada
$\alpha =$	Nivel de significancia	$y_1 =$	Promedio de la muestra 1
$S_p^2 =$	Estimación de la Varianza Muestral	$y_2 =$	Promedio de la muestra 2
$S =$	Estimación de la Desviación estándar	$n =$	Tamaño de muestra
Sean las Hipótesis: $H_0: \mu_1 = \mu_2$ $H_1: \text{que son diferentes (dos colas), mayor o menor (una cola)}$			
<p>Además la Variable Estadística es:</p> $T_c = \frac{y_1 - y_2}{S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}}$ <p>Condición: $T_1 = T_{\alpha/2}$ (dos colas) $T_t = T_\alpha$ (una cola)</p>			
<p>Donde:</p> $S_p^2 = \frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$ <p>Grados de Libertad: $g.l. = n_1 + n_2 - 2 = v$</p>			
<p>Intervalo de Confianza para la diferencia de las medias:</p> $y_1 - y_2 - T_{\alpha/2} S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)} \leq \mu_1 - \mu_2 \leq y_1 - y_2 + T_{\alpha/2} S_p \sqrt{(1/n_1) + (1/n_2)}$ <p>Intervalo de Confianza: $2.447735244 \leq \mu_1 - \mu_2 \leq 5.068864756$</p>			

10.9 Ficha de evaluación sensorial:

Tipo: Afectiva

Nombre:

Método: Escala hedónica

Fecha:

Producto:

Hora:

Instrucciones:

Pruebe las muestras de la bebida que se le presentan e indique según la escala, su opinión sobre ellas.

Marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra

ESCALA	COLOR	SABOR	ACEPTABILIDAD GENERAL
Me gusta extremadamente	-	-	-
Me gusta mucho	-	-	-
Me gusta bastante	-	-	-
Me gusta ligeramente	-	-	-
No me gusta ni disgusta	-	-	-
Me disgusta ligeramente	-	-	-
Me disgusta bastante	-	-	-
Me disgusta mucho	-	-	-
Me disgusta extremadamente	-	-	-

COMENTARIOS:

.....
.....
.....

Muchas gracias por su participación

10.10 Resumen de resultados de la evaluación sensorial:

Tipo: Afectiva

Nombre:

Método: Escala hedónica

Fecha:

Producto:

Hora:

Instrucciones:

Pruebe las muestras de la bebida que se le presentan e indique según la escala, su opinión sobre ellas.

Marque con una X en el lugar que indique su opinión acerca de cada muestra

ESCALA	COLOR	SABOR	ACEPTABILIDAD GENERAL
Me gusta extremadamente	17	3	12
Me gusta mucho	30	26	35
Me gusta bastante	3	21	3
Me gusta ligeramente	0	0	0
No me gusta ni disgusta	0	0	0
Me disgusta ligeramente	0	0	0
Me disgusta bastante	0	0	0
Me disgusta mucho	0	0	0
Me disgusta extremadamente	0	0	0

COMENTARIOS:

.....

.....

.....

Muchas gracias por su participación