

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**“CONDICIONES FAVORABLES PARA LA EXTRACCIÓN DE
ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA SACHAPAPA MORADA
(*dioscórea trifida* L) MEDIANTE UN EQUIPO SOXHLET”**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO QUÍMICO

PRESENTADO POR

**LIZBETH DIANA ALBERCA LAVERIANO
SIXTO ALEXIS CARRERO TEJEDA
RENZO RONALD FLORES BARRAZA**

ASESOR

ING° CARLOS ALEJANDRO ANCIETA DEXTRE

Callao, Febrero, 2017

PERÚ

DEDICATORIA

A nuestros padres por el esfuerzo que han hecho para que se realicen mis sueños, por ser siempre la fuente de confianza.

AGRADECIMIENTO

A nuestra Universidad y todas las personas que laboran en ella, porque durante este proceso han sido un gran apoyo.

A nuestros profesores de la carrera, por todos los conocimientos compartidos, en especial a los que fueron un verdadero ejemplo de entrega y dedicación a la investigación.

PRÓLOGO DEL JURADO

La presente Tesis fue Sustentada por el señor Bachiller **CARRERO TEJEDASIXTO ALEXIS** ante el **JURADO DE SUSTENTACIÓN DE TESIS** conformado por los siguientes Profesores Ordinarios:

ING° LIDA CARMEN SANEZ FALCON	PRESIDENTE
ING° MARÍA ESTELA TOLEDO PALOMINO	SECRETARIO
ING° OSCAR MANUEL CHAMPA ENRIQUEZ	VOCAL
ING° CARLOS ALEJANDRO ANCIETA DEXTRE	ASESOR

Tal como está asentado en el Libro de Actas N° 1 de Tesis con Ciclo de Tesis Folio N° 01 y Acta N° 01 de fecha **CINCO DE JUNIO DE 2017**, para optar el Título Profesional de Ingeniero Químico en la Modalidad de Titulación de Tesis con Ciclo de Tesis, de conformidad establecido por el Reglamento de Grados y Títulos aprobado por Resolución N° 135–2017–CU de fecha 22 de junio de 2017 y modificado por Resolución N° 631–2017–R de fecha 24 de julio de 2017

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
1.1 Determinación del problema	8
1.2 Formulación del problema	9
1.3 Objetivos de la investigación	10
1.3.1 Objetivo general	10
1.3.2 Objetivos específicos	10
1.4 Justificación	10
1.5 Importancia	11
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1 Antecedentes del estudio	13
2.2 Bases Teóricas	17
2.2.1 Fundamento de Extracción	17
2.2.2 Métodos de extracción	18
2.2.3 Funcionamiento del equipo Soxhlet	22
2.2.4 Selección del Solvente	24
2.3 Marco Conceptual	25
2.3.1 Sacha Papa Morada	25
2.3.2 Características Físicoquímica de la Sachapapa Morada	26
2.3.3 Antocianinas	29
2.3.4 Estabilidad de las antocianinas	31
2.3.5 Propiedades funcionales de la Antocianina	33
2.4 Definiciones	36
III. VARIABLES E HIPÓTESIS	40
3.1 Definición de variables	40
3.2 Operación de variables	40
3.3 Hipótesis general e hipótesis específica	41
IV. METODOLOGÍA	42
4.1 Tipo de investigación	42

4.2	Diseño de investigación	42
4.3	Población y muestra	46
4.3.1	Población	47
4.3.2	Muestra	47
4.4	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	47
4.5	Plan de análisis estadísticos de datos	48
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	49
5.1	Equipos, materiales, insumos y reactivos	49
5.2	Tratamiento de materia prima	50
5.3	Preparación del Solvente	54
5.4	Obtención del producto final	56
5.5	Cuantificación de antocianinas	58
5.6	Operación y control de prueba	63
VI.	RESULTADOS	65
VI.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72
VII.	CONCLUSIONES	75
VIII.	RECOMENDACIONES	77
IX.	REFERENCIALES BIBLIOGRÁFICAS	78
	ANEXOS	85
	MATRIZ DE CONSISTENCIA	85

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1.	EXTRACCIÓN POR SUMERSIÓN DEL SOLVENTE EN CONTACTO LA M.P	21
FIGURA 2.2.	DIAGRAMA DEL EQUIPO SOXHLET	23
FIGURA 2.3.	SACHAPAPA MORADA	28
FIGURA 2.4.	ESTRUCTURA MÁS COMÚN DE LA ANTOCIANINA GLUCOSILADA	29
FIGURA 2.5.	ESTRUCTURAS DE LAS ANTOCIANINAS EN FRUTOS Y VEGETALES.	30
FIGURA 2.6.	ESTRUCTURA DE ANTOCIANINAS A DIFERENTES pH'S	32
FIGURA 2.7.	HOJAS DE ACER PALMATUM EN EL OTOÑO	33
FIGURA 2.8.	ESTRUCTURA DE LAS AGLICONAS MAYORITARIAS CORRESPONDIENTES A CADA UNA DE LAS FAMILIAS DE COMPUESTOS FENOLICOS PRESENTES EN LOS FRUTOS DE ARANDANO	35
FIGURA 5.1.	SACHAPAPA MORADA PELADA PARA PROCEDER A LA DISMINUCIÓN DE TAMAÑO	51
FIGURA 5.2.	MUESTRA CORTADA EN TROZOS PEQUEÑOS PARA MAYOR COBERTURA DEL SECADO EN LA ESTUFA	51
FIGURA 5.3.	MUESTRA EN LA ESTUFA	52
FIGURA 5.4.	SECADO A UNA TEMPERATURA DE 73°C EN LA ESTUFA DE MARCA VENTICELL	52
FIGURA 5.5.	TRITURACIÓN MANUAL DE LA MUESTRA	53
FIGURA 5.6.	SE TAMIZÓ EN MALLAS DE 25, 35 Y 50	53
FIGURA 5.7.	ALCOHOL ABSOLUTO AL 100%	55
FIGURA 5.8.	PREPARACIÓN DE ALCOHOL AL 75 %	55
FIGURA 5.9.	PREPARACIÓN DE ALCOHOL AL 50 %	56
FIGURA 5.10.	MONTAJE DEL EQUIPO SOXHLET	59
FIGURA 5.11.	SE DEFINE LÍMITE DE UNA ETAPA DE VOLUMEN 50 mL	60
FIGURA 5.12.	EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 5 g DE SACHAPAPA MORADA, CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 25. OBTENIENDO DOS ETAPAS OPTIMAS	60
FIGURA 5.13.	EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 10 g DE SACHAPAPA MORADA, CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 25. OBTENIENDO CUATRO ETAPAS ÓPTIMAS	61
FIGURA 5.14.	EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 5 g DE SACHAPAPA MORADA, CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 35. OBTENIENDO DOS ETAPAS ÓPTIMAS	61
FIGURA 5.15.	EQUIPO ESPECTROFOTÓMETRO	63
FIGURA 5.16.	MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESPECTOFOMETRO	63
FIGURA 5.17.	BUFFER A pH 1,0 Y pH 4,5	64

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 2.1.	COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTOCIANINAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRIJOL ROJO, MEDIANTE ESL Y MAE	20
TABLA 2.2.	POLIFENOLES TOTALES, FLAVONOIDES, TANINOS Y ANTOCIANINAS EN LA SACHAPAPA MORADA	27
TABLA 2.3.	VALOR NUTRICIONAL DE LA SACHAPAPA MORADA	28
TABLA 2.4.	CONTENIDO DE COMPUESTOS FENOLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE OCHO VINOS	34
TABLA 4.1.	DISEÑO FACTORIAL (BOX – BENHKEN) = 17 CORRIDAS	45
TABLA 5.1.	CUADRO DE INSUMOS Y REACTIVOS	49
TABLA 5.2.	CUADRO DE EQUIPOS	49
TABLA 5.3.	CUADRO DE MATERIALES	50
TABLA 5.4.	CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD	54
TABLA 6.1.	RESUMEN DE ETAPAS ÓPTIMAS	66
TABLA 6.2.	LECTURA DE LAS ABSORBANCIAS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y TOTAL DE LA MUESTRA DE SACHAPAPA	66
TABLA 6.3.	LECTURA DE LAS ABSORBANCIAS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y TOTAL DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN EL EQUIPO SOXHLET	67
TABLA 6.4.	RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN EL EQUIPO SOXHLET	69
TABLA 6.5.	VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS	71
TABLA 7.1.	RESULTADO DE CORRIDA EXPERIMENTAL CON LAS VARIABLES DADAS POR MINITAB	73
TABLA 7.2.	VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS	73

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 6.1. PLOTEO EN MINITAB MEDIANTE EL MODELO BOX – BEHN KEN	70
GRÁFICO 6.2. OPTIMIZADOR DE RESPUESTA EN MINITAB MEDIANTE EL MODEO BOX – B EHNKEN	70
GRÁFICO 6.3. GRÁFICO DE CONTORNO DE CONCENTRACIÓN MEDIANTE EL MODEO BOX – BEHNKEN	71

RESUMEN

La presente investigación tiene como finalidad determinar las condiciones favorables para la extracción de antocianinas a partir de la Sachapapa morada utilizando un equipo de Soxhlet.

Se determinaron las condiciones iniciales y preparación de la muestra, definiendo como temperatura de secado 73°C, se obtuvo un porcentaje de humedad 88,68%, el tipo de solvente a utilizar de acuerdo a la aplicación que se le quiera dar, en este caso etanol a 100%, 75% y 50% de pureza debido a que no es tóxico y tiene alta polaridad, el tamaño de partícula que se utilizó fue por separación granulométrica con una serie de tamices de malla 50, 35 y 25 (Tamiz USP), la cantidad de muestra inicial en el equipo soxhlet fue de 5g, 7,5g y 10g

El resultado obtenido con mayor concentración de antocianinas monoméricas es 122,73cianidina $\frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$, cuyas condiciones favorables

para la extracción de antocianinas a partir de la Sachapapa morada fue el solvente etanol al 100%, tamaño de partícula malla 25 y cantidad de muestra inicial de 10g

Dando como resultado para la extracción soxhlet con un rendimiento de 54,83 %, se obtiene una mayor concentración de antocianinas.

Palabras clave: Antocianinas, Extracción, equipo soxhlet, sachapapa morada.

ABSTRACT

This research aims to determine the conditions for the extraction of anthocyanins from purple Sachapapa using soxhlet equipment.

The initial conditions and preparation of the sample were determined, by defining as dried 73°C temperature, humidity 88,68 obtained %, type of solvent to be used according to the application that you want to give, in this case ethanol at 100%, 75% and 50% of purity because it is not toxic and has high polarity , particle size that was used was by particle size separation with a series of 50, 35 and 25 mesh sieve (sieve USP), the amount of initial sample in soxhlet equipment was 5 g, 7,5 g and 10g

He result retrieved with greater concentration of anthocyanins monomeric is 122,73 cyanidin $\frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$, whose conditions favorable for the extraction

of anthocyanins from it Sachapapa purple was the solvent ethanol to the 100%, size of particle mesh 25 and amount of shows initial of 10 g

Giving as result for the extraction soxhlet with a performance of 54.83%, is gets a greater concentration of anthocyanins.

Key words: anthocyanins, extraction, soxhlet, purple sachapapa equipment.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Determinación del problema

En las zonas tropicales, subtropicales y amazónicas se encuentran una variedad de recursos naturales, entre ellas encontramos la Sachapapa morada (*dioscórea trifida L.*), son tubérculos que se caracterizan por tener alto contenido de humedad, propiedades antioxidantes y prevenir enfermedades como el cáncer o enfermedades neurológicas, entre otras.

A pesar de que los tubérculos son de alta calidad nutritiva y son muy apreciados en la cocina de varias comunidades amazónicas, se ha observado poca actividad comercial de la Sachapapa morada (*dioscórea trifida L.*), la mayor parte del cultivo realizado por los agricultores tradicionales es para su propia subsistencia (Carmo, 2002).

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

En la actualidad no se encuentra un aprovechamiento óptimo de este recurso, por la cual surge el estudio de cuáles deben ser las condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la Sachapapa morada y de esta manera obtener un producto de alta calidad y reducir costos de producción.

Para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada utilizamos el método de extracción sólido – líquido.

1.2 Formulación del problema

Problema general

¿Cuáles son las condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada mediante un equipo de Soxhlet?

Problema específico

- a) ¿Cuáles son las características físicas y químicas de la sachapapa morada?
- b) ¿Cuáles son las condiciones favorables en el proceso de extracción de antocianinas de la sachapapa morada?
- c) ¿Cuál es el mayor rendimiento de la antocianina obtenida?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar las condiciones favorables extracción de antocianinas de la sachapapa morada mediante un equipo de Soxhlet.

1.3.2 Objetivos específicos

- 1) Identificar las características físicas y químicas de la sachapapa morada.
- 2) Determinar las condiciones favorables en el proceso de extracción de antocianinas de la sachapapa morada.
- 3) Determinar el mayor rendimiento de la antocianina obtenida.

1.4 Justificación

- a) **Legal.**- El producto obtenido debe cumplir con las normas establecidas al consumidor.
- b) **Teórica.**- Existen pocos estudios referentes a la sachapapa morada, entre ellos algunos que dan a conocer la presencia de antocianinas, y otros fenoles, pero no se tiene información sobre la extracción de estos pigmentos. El presente estudio contribuirá al desarrollo y ampliación de

conocimientos en el proceso que está asociado a la extracción de antocianinas de la Sachapapa morada y otros frutos que la contengan.

- c) **Tecnológica.**- El presente estudio se justifica tecnológicamente porque la extracción de la sachapapa morada se optimiza mediante el uso del equipo Soxhlet, debido a que podemos controlar una gran cantidad de variables a diferencia de otros métodos. El equipo Soxhlet también lo utilizamos en la extracción de aceites, contenido graso, colorantes, aceites esenciales, debido al óptimo funcionamiento.
- d) **Económica.**- El presente estudio tiene por finalidad encontrar las condiciones óptimas para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada, para obtener el mayor rendimiento posible y disminuir costos mediante el uso adecuado de solvente, materia prima, el ahorro de tiempo, energía y mano de obra. Mediante el equipo de extracción Soxhlet optimizamos el rendimiento y la calidad de la antocianina, por medio de un proceso cíclico y automatizado, esto nos garantiza una rentabilidad alta.

1.5 Importancia

El presente trabajo radica la importancia en beneficiar sector alimentario para invertir en extracción de antocianinas con el equipo Soxhlet, ya que es eficiente a condiciones favorables determinadas, menos costoso y sencillo a diferencia de otros métodos de extracción; así como a

los agricultores de la amazonia para la estimulación a la siembra Sachapapa morada, porque contiene antocianinas beneficiosas para la salud.

II. MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes del estudio

Para el siguiente trabajo de investigación se realizó una revisión bibliográfica acerca del tema:

- a) Apoyadas en los estudios de Heras Et, al. (2013), Herrera y Rodríguez (2016) desarrollaron el proyecto de tesis "Evaluación del extracto de flavonoides y antocianinas contenidos en el Agraz", utilizando dos metodologías para la extracción de antocianinas, una es por extracción por solventes con equipo SOXHLET utilizando etanol como solvente, y el otro método utilizado es la extracción asistida por microondas, con el objetivo de evaluar la concentración y el rendimiento obtenido de antocianinas en el Agraz , haciendo una comparación entre ambos métodos, asimismo establecer las condiciones favorables para dicha extracción. Los resultados obtenidos arrojaron que el método de extracción que proporciona el mayor contenido de antocianinas es el método de extracción por solventes Soxhlet, utilizando la materia prima previamente liofilizada, concluyeron que el tiempo de extracción es más extenso y por consiguiente hay mayor contacto de la muestra con el solvente.

- b) Ordoñez y Saavedra (2016) desarrollaron una investigación sobre “Extracción y uso del colorante natural de la flor de Jamaica (hibiscus sabdariffa) como alternativa para la elaboración de salchicha y yogurt”, desarrollado en la universidad de Cuenca en Ecuador, con el objetivo de determinar extracción y uso del colorante natural de la flor de jamaica como alternativa para la elaboración de salchicha y yogurt. Se apoyó en las investigaciones de García (2004) Respecto a la metodología, emplearon el método de extracción con el equipo Soxhlet. Concluyeron que se logró satisfacer la extracción y sustitución del colorante de la flor de Jamaica en la elaboración de salchicha tipo Viena y el yogurt de mora; mediante la evaluación de aceptabilidad de cada producto terminado y las encuestas realizadas se determinó la dosis del colorante que mejor se ajuste al aspecto físico visual de un producto del mercado nacional.
- c) Zapata (2014), desarrolló la una tesis doctoral con el objetivo de caracterizar el proceso de extracción de antocianina a partir de arándanos, y estudiar el uso potencial de los extractos como antioxidantes y colorante natural en la industria alimentaria. Se apoyó en las investigaciones de Aguilera y Meza (2011) Para la extracción de antocianinas de arándanos se emplearon dos metodologías, una consistió en una extracción con solvente denominado “Extracción sólido – líquido de antocianinas” y la otra consistió en un proceso fermentativo denominado “Extracción de antocianinas por

extracción (30°C a 60°C) y tiempo extracción (4 a 12 horas). La optimización del modelo mostró que las condiciones de extracción con 50% de solvente acidificado, tiempo de proceso de cuatro horas y temperatura de 30°C presentó los mayores contenidos de antocianinas, alcanzando $62 \frac{mg}{100g}$

- f) Leiva Daniel, Diana (2009) desarrollaron una investigación sobre "Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidantes en licores y fruto de mora", con el objetivo de determinar el contenido de antocianinas monoméricas, poliméricas y su relación con la actividad antioxidante en licores de mora y fruto de mora, así como evaluar parámetros fisicoquímicos en los licores. Se apoyaron en las investigaciones de Avalos Et, al. (2003) Respecto a la metodología, empleo el método de extracción con el equipo Soxhlet. Concluyeron que el fruto maduro de zarzamora de la región de Xivo Veracruz tiene un contenido de antocianinas monoméricas de $183,63 \pm 0,33$ mg de cianidina 3- $\frac{glucósido}{100g}$ de fruto fresco, un contenido de fenoles totales de $477,12 \pm 6,91$ mg equivalentes de ácido $\frac{gálico}{100g}$ de peso fresco y su actividad antioxidante expresada como mM equivalentes de $\frac{trolox}{g}$ peso fresco fue de $3,75 \pm 0,1$

2.2 Bases Teóricas

2.2.1 Fundamento de Extracción

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

A nivel comercial, las antocianinas se obtienen principalmente de los subproductos industriales de la uva. En la actualidad existe la tendencia de utilizar los extractos antociánicos sin necesidad de realizar la separación de los distintos componentes, debido a que todos ellos, no sólo los colorantes, presentan propiedades antioxidantes (Fennema, 2000) En relación a la extracción, señala que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y, especialmente, grupos acilos, además de factores como la temperatura y la luz (Wrolstad, 2000)

2.2.2 Métodos de extracción

La separación de un compuesto por extracción se basa en la transferencia selectiva del compuesto desde una mezcla sólida o líquida con otros compuestos hacia una fase líquida (normalmente un disolvente orgánico). El éxito de la técnica depende básicamente de la diferencia de solubilidad en el disolvente de extracción entre el compuesto deseado y los otros compuestos presentes en la mezcla inicial. El principal objetivo de la extracción es separar selectivamente el producto de una reacción, o bien eliminarlas impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción, gracias a sus diferencias de solubilidad en el disolvente de extracción elegido. Caubet Et, al. (2015)

Existen diferentes métodos de extracción entre los cuales se llevarán a cabo, extracción por solventes orgánicos (soxhlet), extracción asistida con microondas y método directo:

a) Extracción por solventes orgánicos.- Es una operación de transferencia de masa en un sistema de dos fases líquidas considerada como uno de los procesos más efectivos y económicos para purificar, concentrar y separarla sustancia de interés de otros que no lo son. Conocida también como intercambio iónico líquido y se basa en el principio por el cual una solución metálica puede distribuirse en cierta proporción entre dos solventes inmiscibles, uno de los cuales es

usualmente acuoso y el otro un solvente orgánico como lo es el etanol acidificado. Esto es posible debido a que varios reactivos orgánicos poseen un alto grado de afinidad selectiva con determinados iones metálicos.

b) Extracción asistida por microondas.- "La extracción por microondas ha sido usada por muchos años para extraer compuestos de diferentes matrices: muestras biológicas, alimentos, agua contaminada y muchos otros tipos de muestras. La energía de microondas ha sido empleada y desarrollada en los últimos años para la extracción de compuestos orgánicos a partir de matrices ambientales, además de su uso para la digestión de muestras para el análisis de metales. Las microondas son radiaciones electromagnéticas portadores de información y vectores de energía, conformadas por un campo eléctrico y un campo magnético, por lo que estas ondas tienen la capacidad de absorber una fracción de energía electromagnética y convertirla en el calor. Rodríguez y Herrera (2013)

Este procedimiento es usado para extraer compuestos insolubles o ligeramente solubles en agua de matrices generalmente sólidas como lo es la arcilla, lodos, sedimentos o residuos sólidos. El proceso utiliza energía del microondas proveniente de magnetrones independientes que rotan logrando una distribución homogénea de las microondas en la muestra para generar condiciones de presión y temperatura elevada

en un recipiente cerrado que contiene la sustancia. Villemur, Rimini (2013)

TABLA 2.1

COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE ANTOCIANINAS OBTENIDAS A PARTIR DE FRIJOL ROJO, MEDIANTE ESL Y MAE

Picos	ESL	MAE
	Área de pico (mAU x min)	
1	1 832,02 ± 15,8	758,62 ± 17,32
2	1 902,53 ± 15,8	1 851,15 ± 14,3
3	614,98 ± 8,2	547,88 ± 5,2
4	639,68 ± 9,3	463,40 ± 3,9
5	534,97 ± 7,5	397,53 ± 7,4

ESL: extracción convencional sólido-líquido; MAE: extracción asistida por microondas, siglas en inglés. Los valores representan el promedio de 3 réplicas ± DE.

Fuente: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/50>

Esto lo convierte en un método fácil y eficiente, porque la rapidez en el calentamiento es la principal ventaja de las microondas frente a los métodos tradicionalmente empleados en la extracción con solventes, que causan el calentamiento a partir de la transmisión de la energía al material de forma indirecta. Por lo tanto, el empleo de las microondas permite ahorrar tiempo de manera significativa; disminuir los volúmenes de disolventes necesarios en los tratamientos, asimismo, de energía en el proceso; además, no contamina el medioambiente, lo cual se manifiesta en la reducción de los costos en general y permite obtener alta recuperación de los compuestos de

interés. Salomón Et, al. (2013)

c) Extracción Directa.-

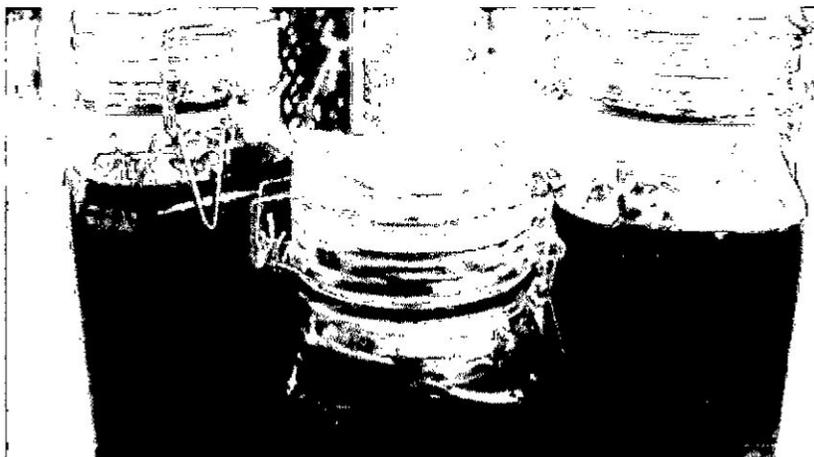
La extracción directa es aquella en que la materia prima se pone en contacto directo con el solvente.

Como hemos indicado el solvente utilizado puede ser agua o alcohol y con cada uno de estos solventes se pueden tener diferentes formas de extracción:

- 1) Extracción por Sumersión.-** Deja la materia prima en remojo en el solvente por varias horas de esta forma se puede extraer el colorante sin degradación, pero el rendimiento es bajo.

FIGURA 2.1

EXTRACCIÓN POR SUMERSIÓN DEL SOLVENTE EN CONTACTO LA M.P



Fuente: <http://www.tusplantasmedicinales.com/como-se-utilizan-las-plantas-medicinales/>

- 2) Extracción por Cohobación.-** Esta extracción debe hacer sea Menos de 100°C para evitar una fuerte degradación del colorante.

Cada una de las formas de extracción descritas anteriormente presenta una variante adicional porque generalmente se les añade ácido para realizar la extracción a un pH entre 3 y 5 donde la degradación de las antocianinas es menor.

En extracciones a nivel de laboratorio se prefiere el uso de alcohol como solvente, pero a nivel industrial el agua es el solvente más indicado debido a su menor costo. Elías y Gamero (1988).

2.2.3 Funcionamiento del equipo Soxhlet

El equipo Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenido en los cartuchos desechables. La capacidad aproximada en un equipo de laboratorio es de 500 ml de volumen primario con una recirculación de 100 ml cada cinco minutos aproximadamente en estado estable. La velocidad de reflujo depende directamente de la eficiencia y el tamaño del condensador. Rojas (2008)

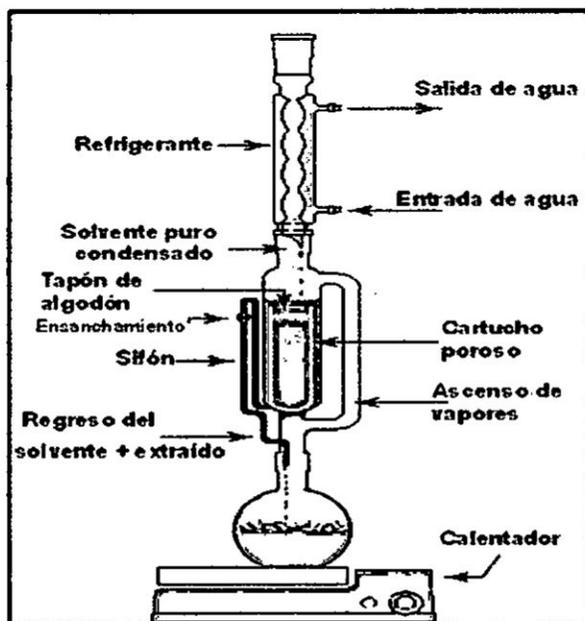
Durante la extracción en el Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y

evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos. Las altas temperatura de ebullición para la recuperación del solvente pueden disminuirse usando.

evaporación flash o separación por membrana para recuperar el solvente; sin embargo en nuestro caso se emplea el método de evaporación en el mismo equipo Soxhlet, tomando en cuenta que primero se debe eliminar y/o sacar del equipo extractor el cartucho de muestra, de esta forma se producirá la evaporación del solvente el cual se condensara posteriormente en el extractor, a la vez que también se producirá la concentración del extracto en el balón esto se realizará hasta que la consistencia del mismo sea espesa. Caldas (2012)

FIGURA N° 2.2

DIAGRAMA DEL EQUIPO SOXHLET



Fuente: <http://procesosbio.wikispaces.com/Extracción+sólido-líquido>

a) Ventajas :

- 1) Gran capacidad de recuperación e instrumentación simple.
- 2) No se requiere filtración posterior. El disolvente orgánico se evapora quedando sólo analito.
- 3) El disolvente y la muestra están en contacto íntimo y repetido. De manera que se mejora muchísimo la extracción porque siempre se emplea un disolvente limpio.
- 4) El disolvente proviene de una condensación luego es líquido y está caliente.
- 5) Favorece la solubilidad del analito.

b) Desventajas :

- 1) Es un proceso lento e imposible de acelerar.
- 2) Se requiere gran cantidad de disolvente.
- 3) Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.
- 4) Necesidad de etapa final de evaporación.
- 5) El método no depende de la matriz.

2.2.4 Selección del Solvente

Debe seleccionarse un solvente conveniente de tal forma que ofrezca el mejor balance de varias características deseables:

- a) Alto límite de saturación y selectividad respecto al soluto por extraer.
- b) Capacidad para producir el material extraído con una calidad no alterada por el disolvente.
- c) Estabilidad química en las condiciones del proceso.
- d) Baja viscosidad, baja presión de vapor.
- e) Baja toxicidad e inflamabilidad.
- f) Baja densidad.
- g) Baja tensión superficial.
- h) Facilidad y economía de recuperación de la corriente de extracto y
- i) Bajo costo.

Cada solvente diferente produce extractos y composiciones específicos. Caldas (2012)

2.3 Marco Conceptual

2.3.1 Sacha Papa Morada

Presenta un elevado contenido de pigmentos antocianinas (pigmento natural inocuo), los que pertenecen al grupo de los bioflavonoides con gran actividad antioxidante (neutralizador de radicales libres). Las antocianinas son 20 veces más potentes que la vitamina C y 50 veces más potentes que la vitamina E, tienen propiedades anti inflamatorias del colágeno, nivela la glucosa de la sangre, ayudan a bajar las reacciones

alérgicas y restauran el sistema nervioso, protegen y restauran los lípidos del tejido cerebral de la oxidación, previenen contra las enfermedades neurológicas y detienen las pérdidas neuróticas por edad avanzada, además son anti artríticas, previenen el cáncer y enfermedades degenerativas. Tienen una poderosa capacidad de reforzar las paredes de los vasos sanguíneos, calmante de los nervios, disturbios hormonales (mujeres), contiene hormonas similares a la hormona progesterona. Relaja los músculos de calambres, promueve la respiración. Bueno para tratar males de la vejiga y piedras en el riñón, para tratar síndrome pre-menstrual. Anti tumoral. El tubérculo de la Sacha papa morada es un alimento reconocido en las poblaciones amazónicas por su contenido en proteínas, carbohidratos, calcio, fósforo, tiamina, riboflavina, niacina, vitamina C.

Para las unas tortillas, panes, mazamorras, postres etc. Con imaginación y habilidad culinaria nos lleva a preparar deliciosos y nutritivos potajes.

Fuente: <http://naturalmedicinaperu.jimdo.com/tienda/frutos-y-super-comidas>

2.3.2 Características Físicoquímica de la Sachapapa Morada

Dioscórea trifida (sachapapa morada) es una planta de tallos volubles, delgados que enrollan hacia la izquierda, provistos de dos a ocho alas membranosas, generalmente en mayor número y desarrollo en la parte

inferior del tallo. Las hojas miden hasta 25 cm de largo, son digitadas, con tres a siete segmentos o lóbulos, con el central más grande.

TABLA 2.2
POLIFENOLES TOTALES, FLAVONOIDES, TANINOS Y
ANTOCIANINAS EN LA SACHAPAPA MORADA

Características	Estándar	% CV	Contenido (mg equivalente/100g dw) ^a
Polifenoles totales ⁽¹⁾	Ácido gálico	1,59	166,10 ± 1,52
Flavonoides ⁽²⁾	Quercetina	16,88	27,63 ± 2,69
Taninos ⁽³⁾	Ácido gálico	1,52	9,62 ± 0.084
Antocianinas	Cianidina 3-glucósido	11,77	21,59 ± 1,47

^a Datos expresados en media ± SEM de n = 3. CV = coeficiente de variabilidad entre repeticiones.

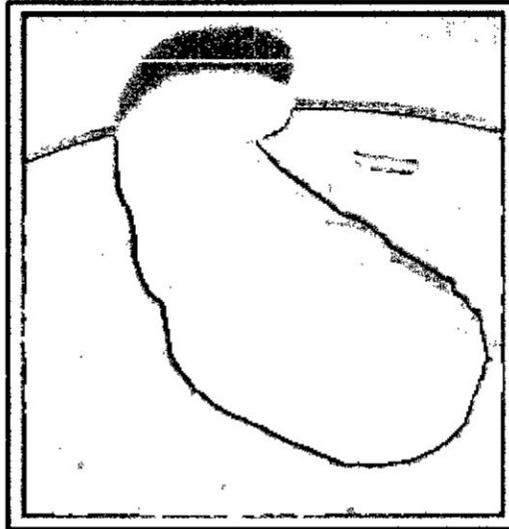
⁽¹⁾ $Y = 0.007X + 0,0263$. $R^2 = 0.9995$; ⁽²⁾ $Y = 0.0151X$. $R^2 = 0,9974$; ⁽³⁾ $Y = 0,0753X - 0.0117$, $R^2 = 0.9992$.

Fuente: <http://docplayer.es/36789080-Antocianinas-polifenoles-actividad-anti-oxidante-de-sachapapa-morada-dioscorea-trifida-l-y-evaluacion-de-lipoperoxidacion-en-suero-humano.html>

El tallo subterráneo es un órgano irregular y corto del que emergen los tallos aéreos, raíces y estolones, estos últimos en círculos sucesivos. El estolón que mide hasta 70 cm de largo, se ensancha formando el tubérculo. Los tubérculos varían mucho en forma y tamaño, aun en la misma planta; se observa forma esférica, fusiforme, claviforme y a menudo con ramificaciones muy cortas. La superficie es rugosa, a veces con raicillas. La pulpa es uniforme, compacta y varía de color blanco, amarillo hasta morado, con un sabor y apariencia muy agradable después de cocinado. El peso de los tubérculos está entre 300 g y 400 g cada uno. (Pilco y Sifuentes 2014)

FIGURA 2.3

SACHAPAPA MORADA



Fuente: Pilco y Sifuentes (2014)

La composición de 100 g de Sachapapa morada se presenta en la

Tabla N° 2.3

TABLA 2.3

VALOR NUTRICIONAL DE LA SACHAPAPA MORADA

Por 100 gramos:

Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad
Energía	112	Fibra (g)	0.40	Vitamina C (mg)	3.10
Proteína	1.80	Calcio (mg)	3	Vitamina D (µg)	-
Grasa Total (g)	1.50	Hierro (mg)	0.70	Vitamina E (mg)	-
Colesterol (mg)	-	Yodo (µg)	-	Vitam. B12 (µg)	-
Glúcidos	23.50	Vitamina A (mg)	7	Folato (µg)	-

Fuente: <http://www.composicionnutricional.com/alimentos/SACHAPAPA-4>

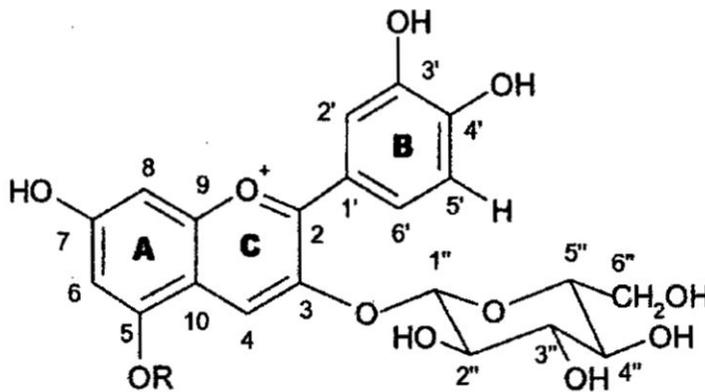
2.3.3 Antocianinas

La palabra antocianinas deriva del griego anthos (flor) y kyanos (azul oscuro). Las antocianinas son las responsables de los colores rojos, azulados o violetas de la mayoría de las grutas y flores. Es el pigmento más importante, después de la clorofila, que es visible al ojo humano.

Las antocianinas son derivados del catión 2-fenilbenzopirilio y debido a la poca solubilidad de estas en agua, no se encuentran de manera libre en la naturaleza, sino en su forma glucosilada siendo una de las más abundantes la cianidina-3-glucosido (walford, 1980)

FIGURA 2.4

ESTRUCTURA MÁS COMÚN DE LA ANTOCIANINA GLUCOSILADA



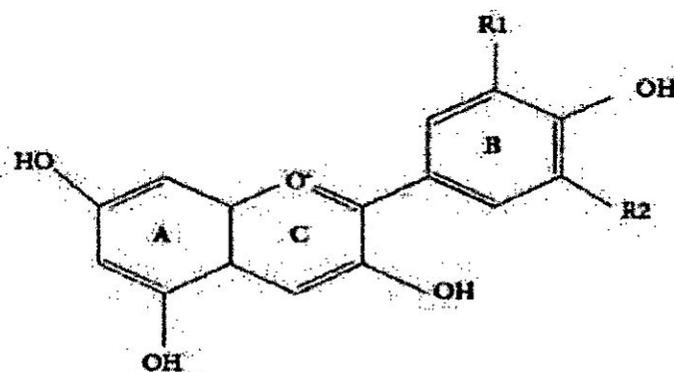
Cianidina 3-glucósido, R=H
Cianidina 3,5-diglucósido, R=glucosa

Fuente: (Walford, 1980)

La función más importante de las antocianinas es la percepción visible para la atracción de animales para propósitos de polinización y dispersión de semillas. Además se encargan de la filtración de la luz o pueden acumularse como resultado de estrés. 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 (Lewis y Wlaker, 1995)

FIGURA 2.5

**ESTRUCTURAS DE LAS ANTOCIANINAS EN FRUTOS Y VEGETALES
(DE PASCUAL – TERESA YSANCHEZ – BALLESTAS, 2008)**



Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000400005&script=sci_arttext

El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo "B" de la molécula determina el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina. Aunque se han descrito doce diferentes antocianidinas, las más comunes

en plantas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina.

En algunos casos, los azúcares están acilados con grupos derivados del ácido acético o alguno de los cuatro ácidos cinámicos (p-cumárico, caféico, ferúlico o sináptico). Se ha observado que la presencia de estos grupos acilo en la molécula de antocianidina le confiere estabilidad ante condiciones extremas de pH y temperatura. Cuando en la molécula de antocianina se encuentran únicamente azúcares, se denominan no aciladas; si además de los azúcares están presentes uno o varios radicales acilo, se catalogan como aciladas (Salinas et al., 2010)

2.3.4 Estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas son compuestos lábiles y su estabilidad es muy variable en función de su estructura y la composición de la matriz en la que se encuentra (Delgado y Paredes, 2003)

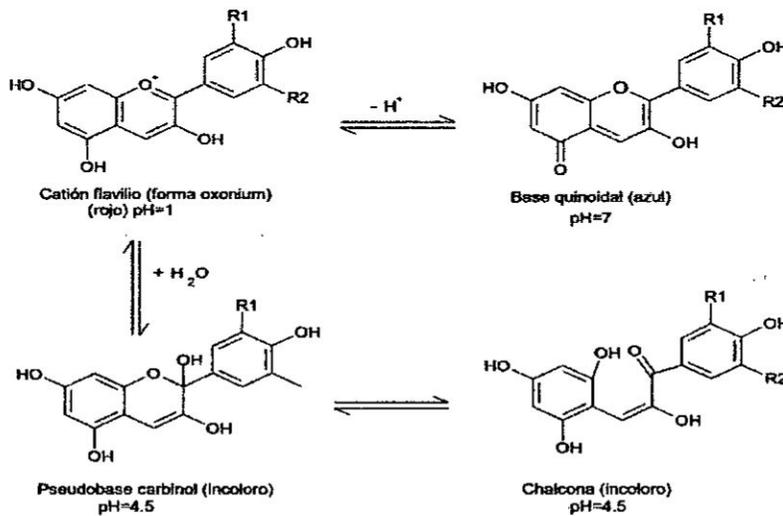
Su estabilidad se ve afectada por el pH, temperatura de almacenamiento, presencia de enzimas, luz, oxígeno, estructura y concentración de las antocianinas, y la presencia de otros compuestos tales como los flavonoides, proteínas y minerales.

Uno de los principales factores del medio que afecta 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 acidas ($\text{pH} < 0,5$) el catión flavilio rojo es la única estructura. Con incrementos de OH la concentración del catión decrece al mismo tiempo que la hidratación da lugar a la base de carbinol incolora. Entre pH 4 y 5,5 habrá poco color, debido a que las dos formas coloreadas estarán en bajas concentraciones y el equilibrio se desplazara a las formas incoloras. Por lo tanto la forma chalcona es la más susceptible a la degradación, y la forma iónica flavilio es la más estable (Wesche y Montgomery, 1990)

FIGURA 2.6

ESTRUCTURA DE ANTOCIANINAS A DIFERENTES pHs



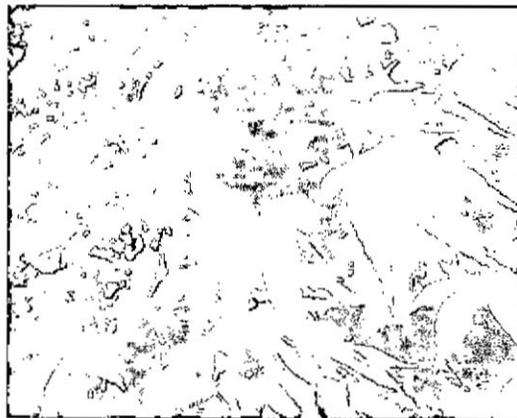
Fuente: (Giustin y Wrolstad, 2001)

2.3.5 Propiedades funcionales de la Antocianina

El interés en los pigmentos antociánicos se ha intensificado recientemente debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas (Astrid, 2008)

FIGURA 2.7

HOJAS DE ACER PALMATUM EN EL OTOÑO



Fuente: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina>

Durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, las antocianinas permanecen intactas (Miyazawa et al., 1999) y ejercen efectos terapéuticos conocidos que incluyen la reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y antidiabéticos; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo. Los efectos terapéuticos de las antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante. Estudios con fracciones de antocianinas provenientes del vino han demostrado que

estas son efectivas en atrapar especies reactivas del oxígeno, además de inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas (Ghiselli et al., 1998)

TABLA 2.4
CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE OCHO VINOS

Marca (variedad)	Ácido gálico (mg/L)	Quercetina (mg/L)	Antocianinas totales (mg/L)	Concentración efectiva media (% v/v) de actividad antioxidante
Tabernero (M/M)	3117,66 ±0.84	3039,73±0,33	180,03±4,79	1,83±4,80
Santiago Queirolo (Borgoña)	2556,91±0,75	1869,19±0,94	102,64±2,09	7,40±0,72
La Casona del Valle (Borgoña)	3610,43±1,04	2692,42±0,42	173,36±4,80	2,72±1,33
La Casona del Valle (Quebranta)	3257,85±0,89	2848,88±0,37	179,09±6,11	2,53±1,67
Santiago Queirolo (Tannat)	3572,20±1,03	3087,24±0,32	219,66±2,31	4,35±0,58
Santiago Queirolo (Shiraz)	2990,22±0,79	2823,48±0,38	115,73±1,32	9,25±1,93
E. Copello (RR/G/M)	2374,25±0,83	2154,25±0,70	213,69±4,33	2,83±0,07
Tacama (M/T/S)	3321,57±0,92	3138,85±0,31	317,50±1,16	4,70±0,02

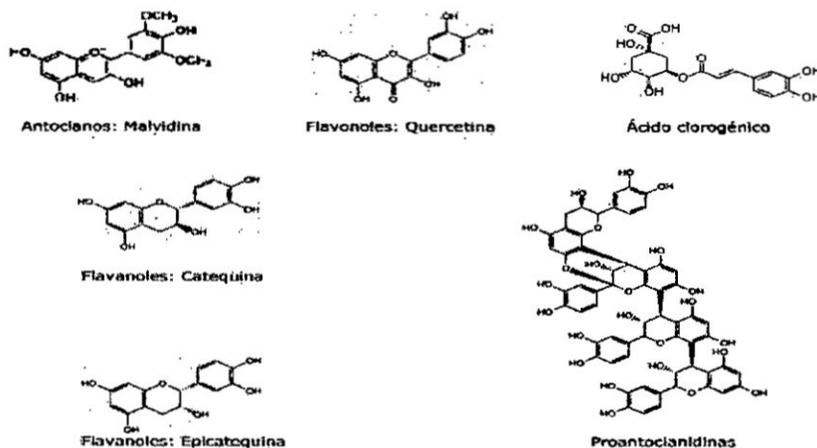
Fuente: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2011000200006&script=sci_arttext

A las antocianinas también se les atribuye actividad antitumoral y anticancerígena. Otros investigadores (Koide et al., 1997) reportan efectos antitumorales al usar extractos de frijoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa. De igual manera, Hagiwara et al. (2002) demostraron que el suministro de papas púrpuras dulces y repollo morado a ratas de laboratorio, causan supresión de tumores. En cuanto a la actividad anticancerígena, Tristan et al. (2005) realizaron bioensayos que

demuestran que los arándanos inhiben las etapas de iniciación, promoción y progresión de la carcinogénesis. Referente a la actividad antiinflamatoria.

FIGURA 2.8

**ESTRUCTURA DE LAS AGLICONAS MAYORITARIAS
CORRESPONDIENTES A CADA UNA DE LAS FAMILIAS DE
COMPUESTOS FENÓLICOS PRESENTES EN LOS FRUTOS DE
ARANDANO**



Fuente: <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>

Con respecto a la actividad antidiabética de las antocianinas, la cual fue reportada por Perossini et al. (1987), estudios clínicos realizados en Italia revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas (160 mg dos veces al día durante un mes) mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética. Finalmente, el mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo como resultado del consumo de antocianinas ha sido reportado por Joseph et al. (1999) y Shukitt-Hale et al. (2005) donde han demostrado que el

comportamiento cognitivo y las funciones neuronales de ratas de laboratorio pueden ser mejorados a través de suplementación nutricional con extractos de arándanos y fresas.

Hoy en día se ha acumulado gran cantidad de información concerniente a la actividad biológica de las antocianinas, sin embargo, debemos profundizar sobre esta funcionalidad. De Pascual – Teresa y Sánchez – Ballesta (2008) concluyen que la literatura existente sobre actividades biológicas provee suficiente evidencia para pensar que los productos ricos en antocianinas, tales como bayas o vino tinto, pueden tener un efecto protector sobre la salud humana, especialmente para la prevención de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer las implicaciones reales de antocianinas en estas propiedades promotoras de la salud, donde muchos estudios han sido hechos usando extractos de frutas o vino y así, otras sustancias pueden ser totalmente o parcialmente responsables de las actividades biológicas mencionadas.

2.4 Definiciones

- a) **Antioxidante.**- Es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.
- b) **Antocianinas.**- Son pigmentos encargados de dar colores llamativos a flores, frutas y hojas, que van desde el rojo al violeta o azul que poseen

propiedades antioxidantes y son empleados para tratar enfermedades cardiovasculares y prevenir el cáncer.

- c) **Cianidina.**- Es un compuesto orgánico natural que ha sido clasificado como un flavonoide al igual que una antocianina.
- d) **Compuestos orgánicos.**- Compuestos químicos que contienen C, formando enlaces C–C y C–H. En muchos casos contienen O, N, S, P, B, halógenos y otros elementos, su característica principal es que son compuestos combustibles.
- e) **Dioscórea trifida L.**- Es un tubérculo del género Dioscórea originario del Caribe, Centroamérica tropical y América del Sur. Se le conoce por una variedad de nombres comunes, entre ellos la Sachapapa.
- f) **Energía electromagnética.**- Cantidad de energía almacenada en una región del espacio o tiempo que se atribuye a la presencia de un campo electromagnético, y que se expresará en función de las intensidades del campo magnético y campo eléctrico.
- g) **Espectrofotometría.**- Es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda; es el método de análisis óptico más usado en las investigaciones bioquímicas y síntesis químicas.
- h) **Espectrofotómetro.**- Es un instrumento que cuantifica la cantidad de energía absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

- i) **Extracción.**- Es la técnica empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales.
- j) **Fenoles.**- En su forma pura es un sólido cristalino de color blanco-incoloro a temperatura ambiente. Su fórmula química es C_6H_5OH . Puede sintetizarse mediante la oxidación parcial del benceno.
- k) **Fermentación.**- Es un proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico. Estos productos finales son los que caracterizan los diversos tipos de fermentaciones.
- l) **Flavonoides.**- Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ($C_6-C_3-C_6$), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico).
- m) **Glucósido.**- Son moléculas compuestas por un glúcido (generalmente monosacáridos) y un compuesto no glucídico. Los glucósidos pueden generar azúcares importantes en el metabolismo de la planta.
- n) **Grupos acilos.**- Es un grupo derivado de un oxácido, normalmente un ácido carboxílico, por eliminación de al menos un grupo hidroxilo. Los derivados de ácido carboxílico, ésteres, anhídridos de ácido, haluros de ácido y amidas.

- o) **Grupo hidroxilo.**- Es un grupo funcional formado por un átomo de oxígeno y otro de hidrógeno, característico de los alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos entre otros compuestos orgánicos.
- p) **Solvente.**- Son sustancias orgánicas en estado líquido, utilizadas para disolver sólidos o gases u otros líquidos. La mayoría de ellos son derivados del petróleo o sintéticos.
- q) **Solubilidad.**- Es la máxima cantidad de soluto que se puede disolver en una cantidad determinada de disolvente, a determinadas condiciones de temperatura, e incluso presión (en caso de un soluto gaseoso).
- r) **Soluto.**- Es la sustancia que, por lo general, se encuentra en menor cantidad y que se disuelve en la mezcla.
- s) **Soxhlet.**- Es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza.
- t) **Transferencia de masa.**- Cambia la composición de soluciones y mezclas. Cuando se ponen en contacto dos fases que tienen diferente composición, la sustancia que se difunde pasa de un lugar de alta concentración, a un lugar de baja concentración.

III. VARIABLES E HIPÓTESIS

3.1 Definición de variables

a) **Variable dependiente :**

Y = Obtención de Cantidad de Antocianinas.

b) **Variable independiente :**

X₁ = Características fisicoquímicas de la sachapapa morada.

X₂ = Condiciones favorables en el proceso de extracción.

X₃ = Rendimiento de la antocianina extraída

3.2 Operación de variables

CUADRO N° 3.1

OPERACIÓN DE VARIABLES

VARIABLEDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	METODO
Y= Obtención de Cantidad de Antocianinas.	Parámetros físicos y químicos	<ul style="list-style-type: none">• Medición de pH.• Temperatura.• Número de etapas.	Procedimiento Experimental
VARIABLEINDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	METODO
X ₁ =Características fisicoquímicas de la sachapapa morada.	Parámetros químicos y biológicos	<ul style="list-style-type: none">• Temperatura de secado.• Humedad.• Análisis fitoquímico.	Análisis de laboratorio.
X ₂ = Condiciones favorables en el proceso de extracción.	Parámetros físicos y químicos	<ul style="list-style-type: none">• Cantidad de etapas de extracción• Tiempo de extracción.	Revisión teórica o análisis de laboratorio
X ₃ = Rendimiento de la antocianina extraída	Parámetro físico-químico.	<ul style="list-style-type: none">• Contenido de antocianinas	Análisis de laboratorio

3.3 Hipótesis general e hipótesis específica

3.3.1 Hipótesis General

Las condiciones favorables de extracción de antocianinas de la sachapapa morada que se obtiene con el equipo Soxhlet es realizando la extracción en medio ácido, a una temperatura de operación entre 50°C y 70°C con tres etapas ideales de extracción.

3.3.2 Hipótesis Específicas

- 1) Las características físicas y químicas de la sachapapa morada son: humedad y temperatura de secado de la muestra, así como el contenido de antocianinas en la materia prima.
- 2) Las condiciones favorables en el proceso de extracción es utilizando 10 g de muestra, tamaño de partícula menor a malla 40 (TAMIZ USP) y como solvente alcohol etílico al 75%
- 3) El mayor rendimiento de la antocianina obtenida debe ser de 50 mg de

$$\frac{\text{antocianina}}{100\text{g}} \text{ MP}$$

IV. METODOLOGÍA

4.1 Tipo de investigación

Los tipos de investigación que se han realizado en el presente trabajo de tesis son:

- a) **Por su finalidad.**- Es de tipo exploratorio puesto que se busca identificar nuevos rumbos aplicados a la práctica y de tipo básica ya que los resultados obtenidos servirán como punto de partida para otros tipos de investigaciones que buscan la aplicación práctica de los resultados obtenidos.
- b) **Por su diseño interpretativo.**- La presente investigación es de tipo experimental puesto que se realiza en el laboratorio, bajo condiciones de ensayos o corridas experimentales, se registran y analizan de las variables que intervienen.

4.2 Diseño de investigación

- a) **Definición del escenario de la investigación.**- La investigación se realizó en el laboratorio de Investigación y Desarrollo y en el Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Callao.

b) Elección del método de diseño.- Dado los fundamentos de diseño para la extracción sólido – líquido, se trabajó con un equipo Soxhlet, el cual nos ofrece una diversidad de ventajas que nos facilitan encontrar las condiciones favorables para la óptima extracción de antocianinas de la sachapapa morada y una alta eficiencia de extracción.

Para la determinación de las características fisicoquímicas se realizó un análisis fitoquímico y fisicoquímico a la muestra de sachapapa morada.

Para la cuantificación de las antocianinas se utilizó el método de pH diferencial con el equipo espectrofotómetro.

c) Determinación de las variables del diseño.- Se han considerado variables cualitativas y cuantitativas para controlar, las cuales detallamos a continuación :

1) Variables independientes y controlables :

- Cantidad de muestra seca y molida y tamizada.
- Tipo de solvente.
- Tamaño de partícula.

* Hay otros parámetros que se van a fijar y controlar como la temperatura de operación, la temperatura de calentamiento, la cantidad de materia prima.

2) Variables dependientes :

- Rendimiento de extracción.
- Numero de etapas.
- Tiempo de extracción.

Para obtener el número de experiencias y la combinación de variables utilizamos el método estadístico Box Behnken, en el consideramos cinco puntos centrales, dándonos un total de 17 corridas experimentales.

Las variables independientes a controlar son :

- a) Tamaño de partícula [malla 25, malla 35, malla 50]
- b) Peso de la materia prima [5, 7,5 y 10] g
- c) Porcentaje de etanol [50%, 75%, 100%]

Total de experiencias : 17 experiencias

- d) **Recolección de información necesaria para el objeto de este estudio.**- Se ha recolectado información de fuentes primarias como libros, papper y tesis anteriores, e investigaciones previas relacionadas con nuestro objetivo de investigación.

La investigación consistió en tres etapas fundamentales para el desarrollo de las experiencias, de acuerdo a los objetivos de nuestra investigación.

TABLA 4.1
DISEÑO FACTORIAL (BOX – BENHKEN) = 17 CORRIDAS

N° EXPERIENCIAS	VARIABLES			NIVELES		
	A	B	C	NIVELES		
1	35	7,5	75	0	0	0
2	35	7,5	75	0	0	0
3	35	5,0	50	0	-1	-1
4	25	7,5	100	-1	0	1
5	35	5,0	100	0	-1	1
6	50	10,0	75	1	1	0
7	35	7,5	75	0	0	0
8	35	10,0	100	0	1	1
9	35	7,5	75	0	0	0
10	50	7,5	50	1	0	-1
11	35	10,0	50	0	1	-1
12	25	5,0	75	-1	-1	0
13	25	7,5	50	-1	0	-1
14	25	10,0	75	-1	1	0
15	35	7,5	75	0	0	0
16	50	5,0	75	1	-1	0
17	50	7,5	100	1	0	1

Fuente: Elaboración propia

En la primera etapa en base a la recolección de información se determinaron las características fisicoquímicas de la sachapapa morada, mediante un análisis fitoquímico y fisicoquímico a la muestra.

En la segunda etapa se recolectó información para realizar el diseño experimental, el diseño del equipo de laboratorio, donde se

determinaron las variables a controlar como el peso de la muestra, el tipo de solvente y el tamaño de partículas, mediante el cual se desarrollaron las pruebas experimentales.

En la tercera etapa se recolecto información para determinar la técnica a utilizar en la cuantificación de la antocianina obtenida, elegimos el análisis por pH diferencial con equipo espectrofotómetro ultravioleta Visible (UV-VIS)

4.3 Población y muestra

4.3.1 Población

La población en esta investigación es la sachapapa morada cultivada en la ciudad de Iquitos en el departamento de Loreto.

4.3.2 Muestra

La muestra en esta investigación es la recolección adecuada de sachapapa morada, basándonos en diferentes bibliografías, recolectamos los frutos con mayor madurez, los cuales tienen mayor concentración de antocianina.

4.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Las técnicas y los instrumentos de recolección de datos que se han realizado en el diseño de investigación son las siguientes:

- a) **Análisis Químico.**- Se realizó un análisis fitoquímico para la determinación e identificación cualitativa de antocianinas, fenoles, flavonoides, taninos y otros compuestos que puedan estar presentes en la muestra de sachapapa morada. Esta prueba se realizó en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- b) **Análisis fisicoquímico.**- Se realizaron análisis fisicoquímicos como:
- 1) Determinación de humedad a la muestra inicial de la sachapapa morada.
 - 2) Secado de la sachapapa morada con ayuda de una estufa.
 - 3) Molido de la sachapapa morada.
 - 4) Tamizado de la sachapapa morada a malla 40 (Tamiz USP)
 - 5) Extracción de la antocianina mediante el equipo Soxhlet.
 - 6) Concentración de antocianina con ayuda de un rotavapor.
 - 7) Cuantificación de la antocianina por análisis de pH diferencial con ayuda del equipo espectrofotométrico Ultravioleta Visible (UV-VIS)
- c) **Análisis estadístico.**- Se realizó el análisis estadístico con la ayuda del Software Minitab 17 para determinar las variables que me

garanticen la optimización de la extracción de antocianinas de la sachapapa morada.

4.5 Plan de análisis estadísticos de datos

Después de hacer el diseño experimental y realizar los análisis en laboratorio, nos arroja un número importante de datos y vectores de respuesta.

Estos datos se analizan mediante el software Minitab 17, el cual nos ayuda a identificar si los resultados obtenidos cumplen con la hipótesis planteada, identifica si se cumplieron los objetivos, si los resultados obtenidos son significativos, nos brinda gráficos y tablas que nos ayudan a resumir los datos e interpretar los resultados estadísticos.

La optimización del proceso de extracción se direccionó a encontrar una ecuación que rija el comportamiento de la Concentración de la antocianina mediante el equipo Soxhlet versus el porcentaje de etanol, tamaño de partícula, de tal manera que maximice el rendimiento de extracción.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Equipos, materiales, insumos y reactivos

TABLA 5.1

CUADRO DE INSUMOS Y REACTIVOS

INSUMOS Y REACTIVOS	CANTIDAD
Sachapapa Morada	405 g
Alcohol absoluto	3,938 L
Agua	1,313 L

Fuente: Elaboración propia

TABLA 5.2

CUADRO DE EQUIPOS

EQUIPOS	CANTIDAD
Balanza	1
Estufa	1
Plancha de Calentamiento	1
pHmetro	1
Espectrofotómetro	1
Cronometro	1

Fuente: Elaboración propia

TABLA 5.3

CUADRO DE MATERIALES

MATERIALES	CANTIDAD
Cuchillo	2
Bagueta	5
Vasos precipitados 50 ml	5
Vasos precipitados 100 ml	5
Termómetro	1
Tabla de picar	2
Cartucho	4
Tubo refrigerante	1
Tubo Soxhlet	1
Probeta	1
Espátula	1
Pipeta	1
Balón	1

Fuente: Elaboración propia

5.2 Tratamiento de materia prima

Para el tratamiento de la materia prima para la extracción Soxhlet se recogió de la siguiente manera:

- a) Se recolecto la Sachapapa morada en un estado idóneo caso contrario estas deberán ser desechadas, la materia prima se colocó en un lugar seco, libre de humedad y sin exposición directa a rayos solares.
- b) Como paso posterior se disminuyó el tamaño de la muestra lo más pequeño posible, teniendo en cuenta la ley de Fick que dice que mientras mayor es el grado de división de la muestra, mayor será la superficie entre las fases de extracción y por tanto mayor será la

difusión a través de la membrana porosa, es decir para que durante la extracción entre en íntimo contacto con el tejido de la planta, se procede al secado de 1 Kg de materia prima con ayuda de la estufa marca Venticell del Laboratorio a temperatura 73°C durante un tiempo de 8 horas, posteriormente se trituro manual en un mortero de laboratorio, se realizó el tamizado en mallas de 25, 35 y 50

FIGURA 5.1

SACHAPAPA MORADA PELADA PARA PROCEDER A LA DISMINUCIÓN DE TAMAÑO



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.2

MUESTRA CORTADA EN TROZOS PEQUEÑOS PARA MAYOR COBERTURA DEL SECADO EN LA ESTUFA



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.3

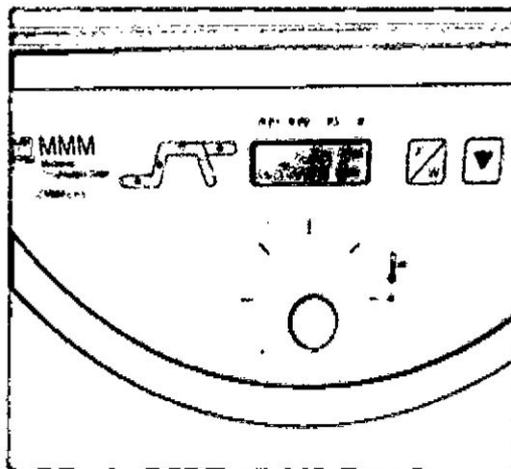
MUESTRA EN LA ESTUFA



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.4

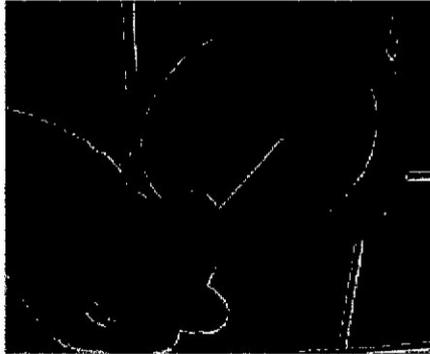
SECADO A UNA TEMPERATURA DE 73°C EN LA ESTUFA DE MARCA VENTICELL



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.5

TRITURACIÓN MANUAL DE LA MUESTRA



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.6

SE TAMIZÓ EN MALLAS DE 25, 35 Y 50



Fuente: Elaboración propia

Con los datos Obtenidos después del secado de la muestra se determinó la cantidad de agua eliminada:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100\%$$

Donde:

m_1 = Masa de la sachapapa morada antes del secado

m_2 = Masa de la sachapapa morada luego del secado

TABLA 5.4

CALCULO DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

N°	MASA DE LA MUESTRA ANTES DEL SECADO (m_1)	MASA DE LA MUESTRA DESPUES DEL SECADO (m_2)	HUMEDAD
1	103,993 g	11,683 g	88,76 %
2	147,948 g	16,660 g	88,73 %
3	160,698 g	18,372 g	88,56 %

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo a la **Tabla N° 5.4**, el promedio de la humedad es: 88,68%

5.3 Preparación del Solvente

Los Solventes utilizados son los siguientes:

a) Alcohol Absoluto (100%)

Se utilizó 350 ml de alcohol absoluto para cuatro corridas.

Total de Alcohol absoluto : 1 400 ml

FIGURA 5.7

ALCOHOL ABSOLUTO AL 100%



Fuente: Elaboración propia

b) Alcohol y agua (75%)

Se utilizó 262,5 ml de alcohol absoluto y 87,5 ml de agua para siete corridas.

Total de Alcohol absoluto : 1 837,5 ml

Total de Agua : 612,5 ml

FIGURA 5.8

PREPARACIÓN DE ALCOHOL AL 75%



Fuente: Elaboración propia

c) Alcohol y agua (50%)

Se utilizó 175 ml de alcohol absoluto y 175 ml de agua para 4 corridas.

Total de Alcohol absoluto : 700 ml

Total de Agua : 700 ml

FIGURA 5.9

PREPARACIÓN DE ALCOHOL AL 50%



Fuente: Elaboración propia

5.4 Obtención del producto final

Para obtener los extractos se empleó el equipo Soxhlet, el cual consta de una manta de calentamiento, balón redondo de fondo aplanado, un refrigerante, cuerpo extractor, mangueras y un cartucho. El mismo que se encuentra instalado en el laboratorio de Investigación de la facultad de Ingeniería Química de la Universidad del Callao.

Los pasos que se siguieron para obtener el extracto son :

- a) Se lava el equipo con abundante agua y detergente para eliminar posibles contaminantes.
- b) Se realizó las conexiones requeridas del equipo Soxhlet con los cartuchos que contienen las muestras (5 g, 7,5 g y 10 g) previamente pulverizadas.
- c) Se colocó el balón con 350 ml de solución de alcohol al 100%, 75% y 50% sobre la placa de calentamiento.
- d) Se ajustó el montaje de todo el sistema.
- e) Se realizó las conexiones de las mangueras desde la fuente de ingreso de agua y el sistema Soxhlet, se abre la llave de agua para que circule por el refrigerante
- f) Se encendió el calentador para que el solvente empiece a evaporarse y por tanto extraer las antocianinas de la muestra, cabe recalcar que este calentador tiene niveles de temperatura por lo que nuestro primer objetivo será encontrar la temperatura adecuada de tal forma que no se produzca una fuente explosión del solvente sino únicamente alcance la temperatura de ebullición del mismo para de esta forma provocar la evaporación de este, y así la extracción.
- g) Se procedió a la extracción en etapas a través de una llave en la parte inferior del cuerpo extractor, se determinó el volumen de 50 ml de una etapa, donde existe mayor concentración de antocianinas.

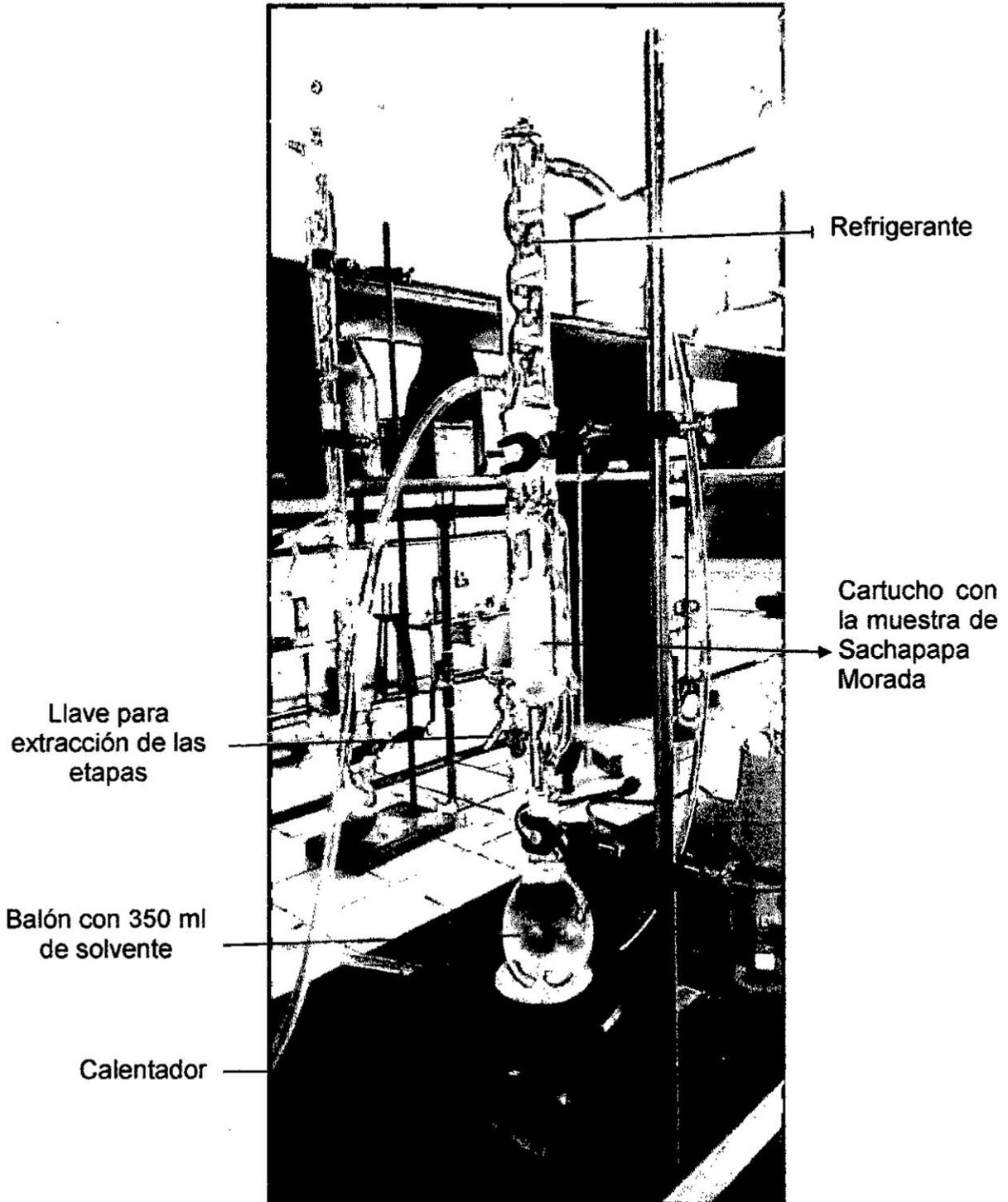
- h) Cada extracción tuvo una duración de 3 a 5 horas aproximadamente con un promedio de 2 a 4 etapas dependiendo de las condiciones de operación.
- i) Se apagó el calentador y se deja enfriar. La llave de entrada de agua se cierra.
- j) Se desconectó la plancha calentadora de la fuente eléctrica y se procede a desmontar el sistema extractor.
- k) Cuando se tiene el extracto listo, se procedió colocar el extracto en botellas de plástico lavadas perfectamente, se etiquetó y guardó en un lugar oscuro para evitar incidencia de la luz.
- l) Se concentró los extractos en un rotavapor a 63°C a vacío, en un rotavaporador Heidolph. Luego se almacenó el extracto obtenido a 4°C hasta los siguientes estudios.

5.5 Cuantificación de antocianinas

Se determinó el contenido de antocianinas por el método de pH diferencial. Se prepararon dos diluciones diferentes de las muestras, una con buffer de cloruro de potasio, pH 1,0 y otra con el buffer de acetato de sodio, pH 4,5, llevándolas a un volumen final de 3 ml, se esperó 15 minutos a que las diluciones se equilibraran y se realizó barrido en el espectrofotómetro de 700 a 400 nm, esperando una absorbancia de las muestras entre 0,2 y 1,2

FIGURA N° 5.10

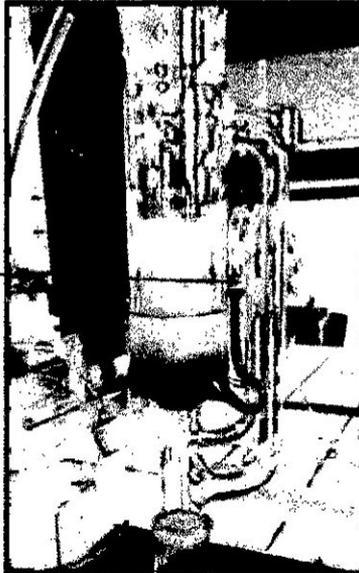
MONTAJE DEL EQUIPO SOXHLET



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.11

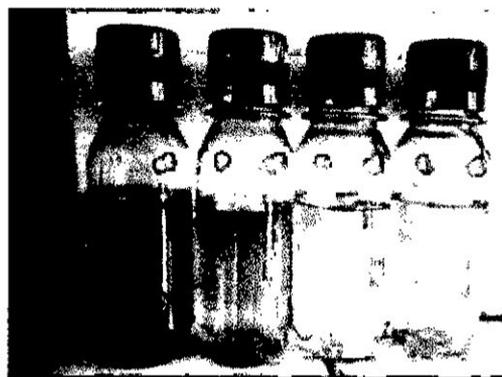
SE DEFINE LÍMITE DE UNA ETAPA DE VOLUMEN 50 ml



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.12

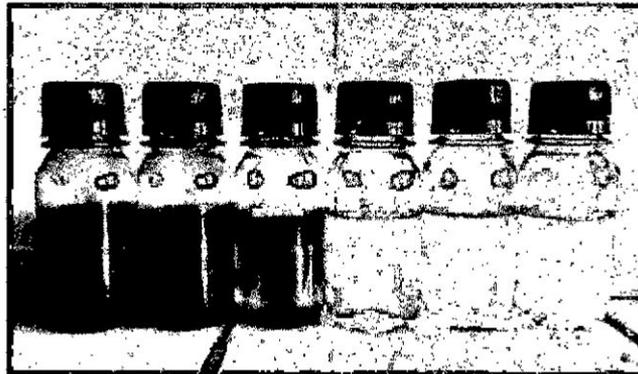
**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 5 g DE SACHAPAPA MORADA,
CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 25
OBTENIENDO DOS ETAPAS ÓPTIMAS**



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.13

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 10 g DE SACHAPAPA MORADA, CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 25 OBTENIENDO CUATRO ETAPAS ÓPTIMAS



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.14

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE 5 g DE SACHAPAPA MORADA, CON UN TAMAÑO DE PARTÍCULA DE MALLA 35 OBTENIENDO DOS ETAPAS ÓPTIMAS



Fuente: Elaboración propia

Para calcular la concentración de Antocianinas monoméricas:

$$\text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{A * PM * FD * 1000}{(\varepsilon * 1)}$$

Donde:

- A** : Absorbancia
- PM** : Peso molecular de la sustancia de referencia
- FD** : Factos de dilución
- ε** : Coeficiente de extinción molar

$$A = (A_{\lambda \text{ max}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH=1} - (A_{\lambda \text{ max}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH=4,5}$$

Donde:

- $A_{\lambda \text{ max}}$** : Absorbancia máxima
- $A_{700 \text{ nm}}$** : Absorbancia a 700 nm

Para calcular la concentración de Antocianinas Totales:

$$\text{Antocianinas total} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{A' * PM * FD * 1000}{(\varepsilon * 1)}$$

$$A' = (A_{\lambda \text{ max}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH=1}$$

El contenido de la antocianina en cada extracción realizada en el laboratorio de investigación de la Universidad del Callao se analizó con el espectrofotómetro de marca Varian.

5.6 Operación y control de prueba

Durante la operación del desarrollo experimental se ha controlado lo siguiente:

- a) Periódicamente se ha controlado la extracción de una muestra de 5, 7,5 y 10 g de sachapapa morada (sólido), durante (3 a 5) horas aproximadamente dependiendo de las condiciones de operación
- b) Se controló el número total de las etapas extraídas de 50 ml por corrida realizada (solvente)

FIGURA 5.15

EQUIPO ESPECTROFOTÓMETRO



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.16

MUESTRAS ANALIZADAS EN EL ESPECTOFOMETRO



Fuente: Elaboración propia

FIGURA 5.17

BUFFER A pH 1,0 Y pH 4,5



Fuente: Elaboración propia

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron los siguientes:

- a) Se realizó la extracción de antocianinas de 10 g de sachapapa morada, con un tamaño de partícula de malla 25, obteniendo cuatro etapas óptimas de 50 ml cada etapa.

$$10 \text{ g} \longrightarrow 200 \text{ ml}$$

$$5 \text{ g} \longrightarrow X$$

$$X = 5 \text{ g} * \frac{200 \text{ ml}}{10 \text{ g}}$$

$$X = 100 \text{ ml}$$

Ahora para 7,5 g de muestra inicial :

$$10 \text{ g} \longrightarrow 200 \text{ ml}$$

$$7,5 \text{ g} \longrightarrow Y$$

$$X = 7,5 \text{ g} * \frac{200 \text{ ml}}{10 \text{ g}}$$

$$X = 150 \text{ ml}$$

TABLA 6.1

RESUMEN DE ETAPAS ÓPTIMAS

Cantidad de muestra	Volumen de solvente	Relación L/S	Etapas
5 g	100 ml	20	2
7,5 g	150 ml	20	3
10 g	200 ml	20	4

Fuente: Elaboración propia

- b) En la **Tabla N° 6.2** se muestra los resultados obtenidos tras realizar la lectura de la absorbancia, tanto para pH 1,0 como para pH 4,5. Para la muestra de 1 g de sachapapa morada previamente secada en la estufa.

TABLA 6.2

LECTURA DE LAS ABSORBANCIAS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y TOTAL DE LA MUESTRA DE SACHAPAPA

W	BUFFER A pH 1,0			BUFFER A pH 4,5			A	A'	Antocianinas Monoméricas	Antocianinas Total
	A_{700}	λ_{max} (nm)	$A_{\lambda_{max}}$	A_{700}	λ_{max} (nm)	$A_{\lambda_{max}}$				
1g	0,212	524	1,523	0,113	524	0,432	0,992	1,311	223,803	295,772

Fuente: Elaboración propia

- c) Se aplica el mismo procedimiento para el extracto que se obtuvo en la extracción con el equipo Soxhlet a diferentes condiciones de operación.

TABLA 6.3

LECTURA DE LAS ABSORBANCIAS Y CONTENIDO DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y TOTAL DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN EL EQUIPO SOXHLET

N°	Malla	W (g)	% Etanol	BUFFER A PH 1.0			BUFFER A PH 4.5			A	A'	Antocianinas Monoméricas	Antocianinas Total
				A ₇₀₀	λ _{max} (nm)	A _{λmax}	A ₇₀₀	λ _{max} (nm)	A _{λmax}				
1	35	7,5	75	0,405	524	1,207	0,417	524	0,932	0,287	0,802	64,828	180,938
2	35	7,5	75	0,409	524	1,213	0,420	524	0,934	0,290	0,804	65,483	181,389
3	35	5	50	0,336	507	0,838	0,353	512	0,710	0,145	0,502	32,713	113,255
4	25	7,5	100	0,241	524	1,150	0,061	524	0,459	0,512	0,909	115,489	205,168
5	35	5	100	0,203	524	1,070	0,026	524	0,475	0,418	0,867	94,304	195,602
6	50	10	75	0,293	524	1,120	0,293	524	0,816	0,305	0,827	68,698	186,578
7	35	7,5	75	0,417	524	1,205	0,418	524	0,931	0,275	0,788	62,146	177,779
8	35	10	100	0,404	524	1,528	0,170	524	0,772	0,522	1,124	117,767	253,584
9	35	7,5	75	0,405	524	1,207	0,417	524	0,932	0,287	0,802	64,828	180,938
10	50	7,5	50	0,300	524	0,972	0,255	524	0,713	0,214	0,672	48,280	151,609
11	35	10	50	0,325	524	1,046	0,272	524	0,735	0,259	0,721	58,320	162,663
12	25	5	75	0,405	528	1,080	0,343	528	0,798	0,220	0,675	49,600	152,285
13	25	7,5	50	0,238	524	0,784	0,187	524	0,563	0,170	0,546	38,353	123,182
14	25	10	75	0,402	524	1,240	0,405	524	0,910	0,333	0,838	75,173	189,060
15	35	7,5	75	0,410	524	1,215	0,413	524	0,926	0,292	0,805	65,866	181,615
16	50	5	75	0,361	524	1,015	0,412	524	0,874	0,192	0,654	43,283	147,548
17	50	7,5	100	0,223	524	1,100	0,024	524	0,470	0,431	0,877	97,237	197,858

Fuente: Elaboración propia

A continuación se presenta una muestra de los cálculos para determinar el contenido de antocianinas monoméricas y totales de extracto obtenido.

$$A = (1,528 - 0,404) - (0,772 - 0,170)$$

$$A = 0,522 \text{ nm}$$

$$\text{Antocianinas Monoméricas} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{0,522 * 449,2 * 15 * 1\ 000}{(26\ 900 * W)}$$

$$\begin{aligned} \text{Antocianinas Monoméricas} & \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) \\ & = 117,767 \frac{\text{mg cianidina} - 3 - \text{glucosido}}{100 \text{ g fruta fresca}} \end{aligned}$$

Para conocer el contenido de Antocianinas Totales:

$$A' = (1,528 - 0,404)$$

$$A' = 1,124$$

$$\text{Antocianinas Total} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = \frac{1,124 * 449,2 * 15 * 1\ 000}{(26\ 900 * W)}$$

$$\text{Antocianinas Total} \left(\frac{\text{mg}}{100 \text{ g}} \right) = 253,584 \frac{\text{mg cianidina} - 3 - \text{glucosido}}{100 \text{ g fruta fresca}}$$

- d) A continuación se muestra los cálculos de rendimiento de las antocianinas obtenidas.

$$\% \text{ Extraccion} = \frac{E_1 \text{ antocianinas}}{F_0}$$

Donde:

E_1 antocianinas = Flujo de salida del proceso de extracción de antocianinas

F_0 =Flujo de entrada en el proceso de extracción

$$\% \text{ Extraccion} = \frac{117,767}{223,803} * 100\%$$

$$\% \text{ Extracción} = 52,6\%$$

TABLA 6.4

RESULTADOS DE LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS EN EL EQUIPO SOXHLET

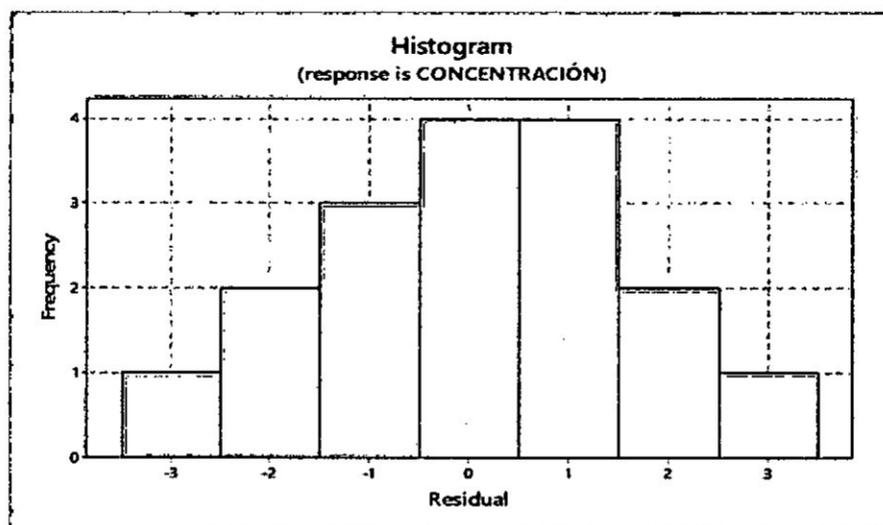
Nº	NIVELES			MALLA	W(g)	% ETANOL	ANTOCIANINAS MANOMÉRICAS	ANTOCIANINAS TOTAL	TIEMPO DE EXTRACCIÓN	# DE ETAPAS
1	0	0	0	35	7,5	75	64,828	180,938	3 H	3
2	0	0	0	35	7,5	75	65,483	181,389	3 H	3
3	0	-1	-1	35	5	50	32,713	113,255	2,5 H	2
4	-1	0	1	25	7,5	100	115,489	205,168	3,5 H	3
5	0	-1	1	35	5	100	94,304	195,602	2,5 H	2
6	1	1	0	50	10	75	68,698	186,578	4,5 H	4
7	0	0	0	35	7,5	75	62,146	177,779	3,5 H	3
8	0	1	1	35	10	100	117,767	253,584	4 H	4
9	0	0	0	35	7,5	75	64,828	180,938	3 H	3
10	1	0	-1	50	7,5	50	48,280	151,609	3,5 H	3
11	0	1	-1	35	10	50	58,320	162,663	4,5 H	4
12	-1	-1	0	25	5	75	49,600	152,285	2 H	2
13	-1	0	-1	25	7,5	50	38,353	123,182	3,5 H	3
14	-1	1	0	25	10	75	75,173	189,060	4,5 H	4
15	0	0	0	35	7,5	75	65,866	181,615	3 H	3
16	1	-1	0	50	5	75	43,283	147,548	2,5 H	2
17	1	0	1	50	7,5	100	97,237	197,858	3,5 H	3

Fuente: Elaboración propia

e) Análisis de Anova con programa Minitab

GRÁFICO 6.1

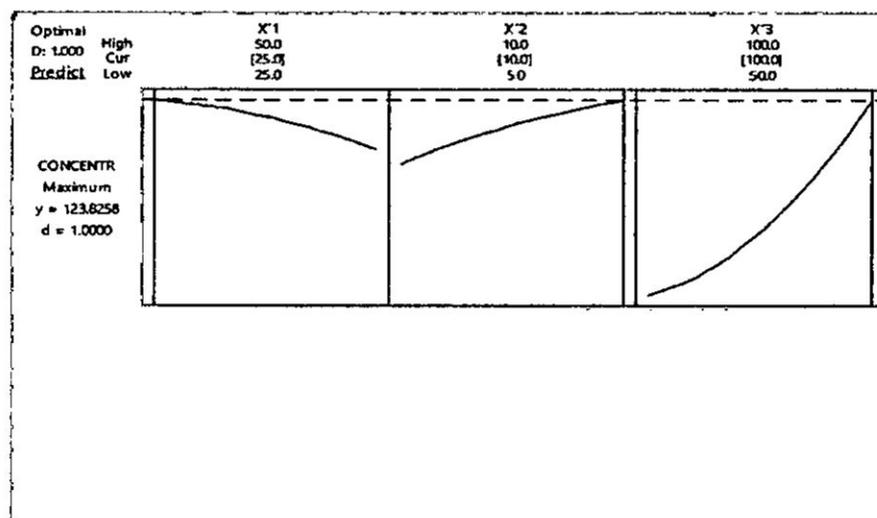
PLOTEO EN MINITAB MEDIANTE EL MODEO BOX - BEHNKEN



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO 6.2

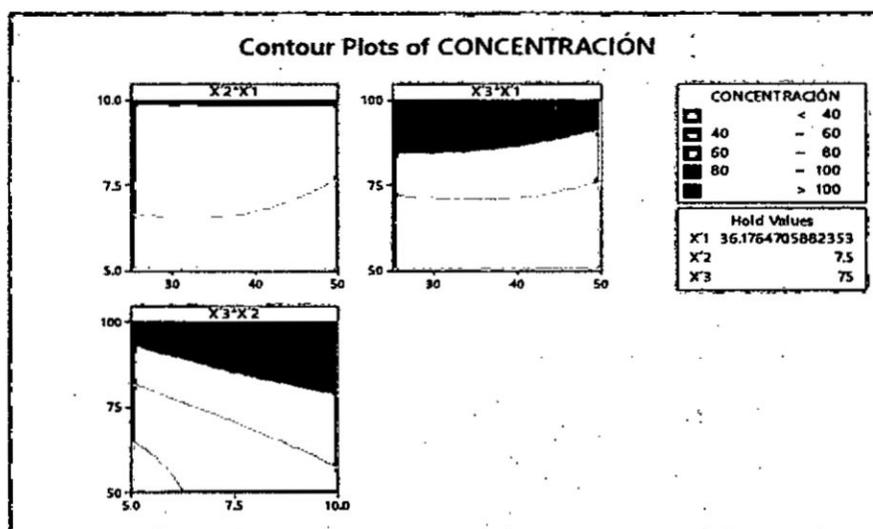
OPTIMIZADOR DE RESPUESTA EN MINITAB MEDIANTE EL MODEO BOX - BEHNKEN



Fuente: Elaboración propia

GRÁFICO 6.3

GRAFICO DE CONTORNO DE CONCENTRACIÓN MEDIANTE EL MODEO BOX – BEHNKEN



Fuente: Elaboración propia

El Gráfico N° 6.3 nos arroja los la combinación óptima de variables para obtener la máxima concentración de antocianinas, en cual arroja valores de:

TABLA N° 6.5

VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS

MALLA (TAMIZ USP)	W(g)	% ETANOL	ANTOCIANINAS MANOMÉRICAS
25	10	100	123,8258

Fuente: Elaboración propia

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- a) En el diseño experimental se definió que las variables a controlar serían el peso de la muestra, el tamaño de partículas y el porcentaje de etanol (solvente). Los datos experimentales obtenidos para las distintas combinaciones se muestran en la **Tabla N° 6.3 (Véase en la pag N° 66)** A partir de los mismos el software Minitab calculó una superficie de respuesta que se muestra a continuación:

$$A = 0,02086E^2 - 0,418W^2 - 0,02015M^2 + 0,0003M*W - 0,02171M*E - 0,0086W*E + 2,925M + 11,91W - 1,042E - 55,6$$

Donde:

$$A = \text{Antocianinas monoméricas} \left(\frac{\text{mg cianidina - 3 glucósido}}{100 \text{ g de fruto fresco}} \right)$$

W = Peso de la muestra alimentada al equipo Soxhlet

M = Tamaño de partícula expresado en número de malla (USP)

E = Porcentaje de etanol

- b) Del resultado obtenido por el optimizador de respuestas en Minitab mediante el Modelo Box – Behnken, el que nos arroja una concentración máxima de antocianinas de 123,8258 mg cianidina – 3 *glucósido* / 100g.

Se realizó una corrida experimental en laboratorio con las combinaciones de variables dadas por Minitab para comprobar la eficacia del programa, obteniendo estos resultados

TABLA N° 7.1

RESULTADO DE CORRIDA EXPERIMENTAL CON LAS VARIABLES DADAS POR MINITAB

Malla	W(g)	%Etanol	BUFFER A pH 1,0			BUFFER A pH 4,5			A	A'	Antocianinas Monoméricas	Antocianinas Total
			A ₇₀₀	λ _{max} (n m)	A _{λmax}	A ₇₀₀	λ _{max} (n m)	A _{λmax}				
25	10	100	0,409	524	1,544	0,206	524	0,797	0,544	1,135	122,73	256,065

Fuente: Elaboración propia

De esta manera podemos comprobar que las condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada mediante un equipo Soxhlet se obtienen teniendo en cuenta la siguiente combinación de variables:

TABLA N° 7.2

VARIABLES ÓPTIMAS PARA LA MÁXIMA CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANINAS

MALLA (TAMIZ USP)	W(g)	% ETANOL	ANTOCIANINAS MANOMÉRICAS
25	10	100	122,73

Fuente: Elaboración propia

- c) De acuerdo a estudios realizados por Fernando R. y Ana María M. (2010), sobre el análisis del contenido de antocianinas en la sachapapa morada obtuvieron como resultado 21,59 mg cianidina – 3 $\frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$ con el método pH diferencial, otras fuentes de antocianinas como el

arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) presenta alrededor de $720 \frac{mg}{100g}$, la zarzamora (*Rubus fruticosus*) $497,4 \frac{mg}{100g}$, la frambuesa negra (*Rubus occidentalis* L) $952,4 \frac{mg}{100g}$, frambuesa roja (*Rubus idaeus* L) $391,8 \frac{mg}{100g}$ y fresa (*Fragaria ananassa* D) $315,2 \frac{mg}{100g}$. En comparación con nuestro resultado obtenidos $122,73 \frac{mg \text{ cianidina-3 glucósido}}{100g}$ se obtuvo una mayor concentración de antocianinas en la sachapapa morada que el estudio realizado debido a las mejores condiciones de operación y el método de extracción con el equipo Soxhlet.

VII. CONCLUSIONES

- 1) Todas las variables del proceso estudiadas tuvieron una influencia significativa en la extracción de antocianinas de la sachapapa morada. La extracción se operó a condiciones de pH ácido y a una temperatura de operación entre (50°C – 70°C), con una relación $\frac{L}{S}$ de $\frac{20}{1}$. El número de etapas óptimas varía de acuerdo al peso de la muestra, para 5 g; 7,5 g y 10 g se obtuvieron 2, 3 y 4 etapas óptimas.
- 2) Se demostró la existencia de antocianinas en la sachapapa morada con un análisis fitoquímico. Se determinaron las características fisicoquímicas de la sachapapa morada, definiendo como temperatura de secado 73°C, porcentaje de humedad 88,68% y concentración de antocianinas monoméricas en la muestra es $223,803 \text{ mg cianidina} - 3 \frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$
- 3) Se determinó las condiciones favorables de extracción que proporciona el mayor contenido de antocianinas monoméricas $122,73 \text{ mg de cianidina} - 3 - \frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$, siendo el solvente etanol 100%, cantidad de muestra inicial 10 g y tamaño de partícula malla 25. Durante una extracción de 4 h se obtuvo cuatro etapas óptimas.

- 4) Se Identificó la concentración de antocianinas en la muestra inicial (223,803 mg cianidina - 3 $\frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$), así como la mayor concentración de antocianinas en el extracto (122,73 mg de cianidina - 3 - $\frac{\text{glucósido}}{100\text{g}}$) después del proceso de extracción, resultando el porcentaje de extracción en el equipo Soxhlet 54,83%

VIII. RECOMENDACIONES

- 1) Incentivar a continuar con la investigación de extracción de antocianinas de la sachapapa morada, por su gran aporte en la industria alimentaria y en la salud humana debido a sus propiedades antioxidantes.
- 2) Acoplar al equipo Soxhlet un sistema de medición de temperatura de operación y de calentamiento para tener un mejor control de estas variables que son importantes para una adecuada extracción.
- 3) Para el almacenamiento de los extractos se deben emplear recipientes de color ámbar de vidrio, mantenerlo a temperaturas bajas aproximadamente a 4°C y un pH ácido para evitar la degradación de los extractos.

IX. REFERENCIALES BIBLIOGRAFICAS

- 1) WALFORD J. **Developments in Food Colors**. Applied Science Publishers, Ed. London 116 – 142, 1980
- 2) LEWIS, C., y WALKER, J. **Effect of Polysaccharides on the Colour of Anthocyanins**, en *Food Chemistry*, vol. 54: 325 – 319. Noviembre 1995
- 3) DELGADO – VARGAS, F. y PAREDES – LÓPEZ, O. (2003), **Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses**, CRC Press, Boca Raton, Florida
- 4) WESCHE – EBELING P. y MONTGOMERY M.W., **Strawberry Polyphenol Oxidase : its Role in Anthocyanin Degradation**, en *Journal of Food Science*, vol. 55: 731 – 734, 745, enero 1990
- 5) AGUILERA ORTÍZ M. **Propiedades Funcionales de las Antocianinas**, en *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, vol. 13: 16 – 22, abril 2011
- 6) BLANCO Natalia y TROYA, Rafaella, **Evaluación de Métodos no Térmicos Sobre la Estabilidad de las Antocianinas del Maíz Morado (Zea Mays L.) Frente a Temperatura de Pasteurización**, Tesis de grado, Quito, Universidad San Francisco de Quito, 2014
- 7) BRESSAN, E., VEASEY, E., PERONI, N., FELIPIIM, A. y SANTOS, K. **Collecting Yam (Dioscorea Spp.) And Sweet Potato (Ipomoea Batatas) Germplasm In Traditional Agriculture Small – Holdings In The Vale Do Ribeira, São Paulo, Brazil**, en *Plant Genetic Resources Newsletter (Rome, Italy)*, vol. 144: 8 – 13, marzo 2005
- 8) CARMO, 2002, **Inhame E Taro : Sistemas De Produção Familiar**, Vitória: Incaper, pag. 289
- 9) CASTAÑEDA A. PACHECO M. RODRIGUEZ J. y GALAN A, **Chemical Studies of Anthocyanins, A Review**, en *Food Chemistry*, vol. 1: 869 – 871, año 2009
- 10) ESCRIBANO – BAILON M., BEULGA – SANTOS C. y RIVAS – GONZALO J. **Anthocyanins In Cereals**, en *Journal Chromatography*, vol 1: 129 – 130, año 2004

- 11) GARCÍA, L.; ROJO, D.; SÁNCHEZ, E. (2001). **Plantas Con Propiedades Antioxidantes**, *en Revista Cubana De Investigación Biomédica*, vol. 20: (3): 231 – 235, año 2001
- 12) Garzón, G. **Las Antocianinas Como Colorantes Naturales Y Compuestos Bioactivos**, *en Acta Biológica Colombiana*, vol. 1: 27–30, año 2008
- 13) KONG J. **Análisis y actividades biológicas de Antocianinas**, *en fitoquímico*, vol 1:923 – 930, año 2003
- 14) LEBOT, V., 2009, **Tropical Root And Tuber Crops: Cassava, Sweet Potato, Yams And Aroids**. Wallingford: Cabi. 413 P, Crop Production Science In Horticulture Series, pag. 17
- 15) LEWIS C, WALKER J. (1995), **Effect Of Polysaccharide Son The Colour Of Anthocyanins**, *Food Chemistry*, pag. 315 – 320
- 16) PEDRALLI, G., 1988. **O Inhame, Esse Desconhecido**. *Ciência Hoje*, vol. 8, Nº 46, pag. 58 – 62
- 17) RAMOS – ESCUDERO, F., SANTOS – BUELGA, C., PÉREZALONSO, J., YÁÑEZ, J. y DUEÑAS, M. **Hplcdad – Esi/Ms Identification Of Anthocyanins In Dioscorea Trifida L. Yam Tuber (Purple Sachapapa)**, *en European Food Research And Technology*, vol. 5: 745 – 750, año 2010
- 18) DIANA ELIZABETH LEYVA DANIEL, Tesis **“Determinación de Antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y frutos de mora”**, Tesis de grado, México, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Facultad de Ingeniería de Alimentos, 2009.
- 19) JENNY FERNANDA ALMEIDA GUDIÑO, Tesis **“Extracción y caracterización del colorante natural del maíz negro (Zea mays L.) y determinación de su actividad antioxidante”**, Tesis de grado, Quito, Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, 2012.
- 20) HERAS Et, al. **Optimización del proceso de extracción de Antocianinas y evaluación de la capacidad antioxidante de berenjena (Solana melonera L.)**, *en Alimentos y Biotecnología*, vol. 24, mayo 2013
- 21) HERRERA QUIÑOÑEZ y RODRÍGUEZ CASTILLO, **Evaluación del extracto de flavonoides y antocianinas contenidos en el Agraz (Vaccinium meridionale swartz) obtenidos a nivel laboratorio por**

- medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas, Tesis de grado, Bogotá, Universidad de América, Facultad de Ingeniería Química., 2016
- 22) ORDOÑEZ ZHAGUI y SAAVEDRA RODRIGUEZ, **Extracción y uso del colorante natural de la flor de Jamaica (hibiscus sabdariffa) como alternativa para la elaboración de salchicha y yogurt**, Tesis de grado, Cuenca, Universidad de Cuenca, 2016
- 23) ZAPATA, Luz Marina, **Obtención del extracto de antocianinas a partir de Arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria**, Tesis doctoral, Valencia, Universidad Politécnica de Valencia, 2014
- 24) SABOGAL, Juan José y ALZATE, Marcela, **Pulverización de colorantes naturales a escala industrial**, en Proyecto de grado de Ingeniería de Procesos, abril 2005
- 25) GISBERT, C. Et, al. **Efectos del injerto sobre el rendimiento de la berenjena y la calidad y composición aparente de la fruta**, en Parientes de la berenjena como fuentes de variación para el desarrollo de nuevos portainjertos, vol 128, marzo, 2011
- 26) AVALOS LLANO, Sgroppo y AVANZA. **Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en vinos de origen nacional**, en Facena, vol. 19: 11 – 19, mayo 2003
- 27) WROLSTAD, R y GIUSTI, M. **Characterization and Measurement With UV-Visible Spectroscopy**, en Current Protocols in Food Analytic Chemistry, vol. 1: 1 – 13, marzo 2001
- 28) FAN G, HAN Y, GU Z. **Composición y estabilidad del color de las antocianinas extraídas del cultivo de la batata púrpura fermentada**, en Ciencia y Tecnología Alimentaria, vol.41:1412 – 1416, febrero 2008
- 29) FENNEMA, Owen, **Química de los Alimentos**, Zaragoza: Editorial Acribia SA, segunda Edición, 2000
- 30) RODRÍGUEZ y HERRERA. **Evaluación del extracto de flavonoides y antocianinas contenidos en el Agraz (Vaccinium meridionale swartz) obtenidos a nivel laboratorio por medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas**, Tesis de grado, Bogotá, Universidad de América, Facultad de Ingeniería Química, 2016

- 31) SALOMÓN, Susleby; BERMELO, Addiss; MÁRQUEZ, Tania; LÓPEZ, Orestes; GONZÁLEZ, María y LLÓPIZ, Julio, **Extracción asistida por microondas de lípidos de las semillas de Cucurbita pepo L. (calabaza)**, en *Plantas medicinales*, Cuba 2013
- 32) ELIAS, José; GAMERO, Dery, **Obtención de colorante a partir de maíz morado**, Tesis de grado, Lima, Universidad Nacional de Ingeniería, 1988
- 33) ROJAS LOBATO, Andres, **Cinética y Extracción de colorantes naturales**, en *Cinética y Extracción de colorantes naturales*, noviembre 2008
- 34) CALDAS AVILA, Adriana. **Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido – líquido**, Tesis de grado, Cuenca, Universidad de Cuenca, 2012
- 35) PILCO CORAL, Mack; SIFUENTES DA SILVA, Jorge, **Valor nutricional de las especies vegetales Calathea allouia (Dale Dale) y Dioscorea Trifida L. (Sachapapa morada)**, Tesis de grado, Amazonas, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, 2014
- 36) SALINAS, Yolanda; SORIA, Jesús y ESPINOZA, Edgar, **Aprovechamiento y Distribución de Maíz Azul en el Estado de México**, Ciencia y Tecnología para el Campo Mexicano, diciembre 2010
- 37) MIYAZAWA, T., NAKAGAWA, K., KUDO, M., MURASHI, K. & SOMEYA, K. **Absorción intestinal directa de antocianinas de frutos rojos, cianurante – 3 – glucósido y cianuro – 3,5 – diglucósido**, tractos y seres humanos, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 47: 1083 – 1091, Abril 1999
- 38) GHISELLI A., NARDINI M., BALDI A. Y SCACCINI C. **Actividad antioxidante de diferentes fracciones fenólicas separadas de un vino tinto italian** *Journal Agricultural and Food Chemistry*, vol. 46: 361 – 367, diciembre 1998
- 39) KOIDE T., KAMEI H., HASHIMOTO Y., KOJIMA T. Y HASEGAWA M. **Efecto antitumoral de las fracciones de antocianinas extraídas de soja roja y frijoles rojos in vitro y en vivo**, *Bioterapia con cáncer Radiopharmaceuticals*, vol. 12: 277 – 280, marzo 1997
- 40) HAGIWARA A., YOSHINO H., ICHIHARAM T., KAWABE M., TAMANOS S. Y AOKI H. **Prevención por antocianinas naturales de alimentos, color de camote púrpura y color de col roja, de**

carcinogénesis colorrectal asociada a 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-B] piridina (pHIp) en ratas, Journal of Toxicology Science, vol. 27: 57 – 68, mayo 2002

- 41) **TRISTAN F., KRAFT B., SCHMIDT B., YOUSEF G., KNIGH C. y CUENDET M. Potencial quimiopreventivo de los frutos silvestres de arándanos bajos en múltiples etapas de carcinogénesis**, Journal of Food Science, vol. 70: 159 – 166, Junio 2005
- 42) **JOSEPH J., SHUKITT-HALE B., DENISOVA N., BIELINSKI D., MARTIN A. y MCEWEN, Reversiones de disminuciones relacionadas con la edad en la transducción de señales neuronales, déficits cognitivos y de comportamiento del motor con suplementos dietéticos de arándanos, espinacas o fresas**, Journal of Neuroscience, vol. 19, setiembre 1999
- 43) **SHUKITT – HALE B., GALLI R., METERKO V., CAREY A., BIELINSKI D. Y MCGHIE T. La suplementación dietética con polifenólicos de la fruta mejora los déficits relacionados con la edad en el comportamiento y los marcadores neuronales de la inflamación y el estrés**, Edad de la Revista de la American Aging Association, vol. 27: 49 – 57, enero 2005
- 44) **Perossini M., Guidi G., Chiellini S. y Siravo D. Studio clinic sull'impeigo degli antocianisidi del mirtillo (Tegens) nel trattamento delle microangiopathi retiniche ditipo diabético ed ipertensivo**, Ottal clinical ocular, febrero 1987
- 45) **Extracción por sumersión del solvente en contacto la M.P.** disponible en: <http://www.tusplantasmedicinales.com/como-se-utilizan-las-plantas-medicinales/>. Artículo web, consultado el 22 de Noviembre del 2016
- 46) **Diagrama del Equipo Soxhlet**, disponible en: <http://procesosbio.wikispaces.com/Extracci%C3%B3n+s%C3%B3lido-l%C3%ADquido>, artículo web, consultado el 22 de noviembre del 2016
- 47) **Estructuras de las antocianinas en frutos y vegetales (de pascual-teresa y sanchez – ballestas, 2008)**, disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2077-99172014000400005&script=sci_arttext, artículo web, consultado el 05 de diciembre de 2016

- 48) **Hojas de Acer Palmatum en el otoño**, disponible en: <https://es.wikipedia.org/wiki/Antocianina>, artículo web, consultado el 05 de diciembre de 2016
- 49) **Estructura de las agliconas mayoritarias correspondientes a cada una de las familias de compuestos fenólicos presentes en los frutos de arándano**, disponible en: <http://www.uclm.es/area/cta/cesia2012/cd/PDFs/4-BIO/BIO-P25T.pdf>. artículo web, consultado el 21 de diciembre de 2016
- 50) **Comparación de la cantidad de antocianinas obtenidas a partir de frijol rojo, mediante ESL y MAE**, disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/50>. artículo web, consultado el 22 de diciembre de 2016
- 51) **Contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de 8 vinos**, disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2011000200006&script=sci_arttext, artículo web, consultado el 22 de diciembre de 2016
- 52) CAUBET, Amparo; ANGURELL, Inmaculada; CASAMITJANA, Nuria; MUÑOZ, Diego; NICOLÁS, Ernesto, **GRUPO GUIDOLQUIM, Técnicas y Operaciones Avanzadas en el Laboratorio Químico (TALQ)**, artículo web, consultado el 24 de noviembre de 2016, disponible en : <http://www.ub.edu/talq/es/node/285>
- 53) SOTOMAYOR, Rosa, **Extracción y cuantificación de antocianinas a partir de los granos de maíz morado (Zea mays L.)**, artículo web, consultado el 10 de Noviembre de 2016, disponible en : http://www.uap.edu.pe/Investigaciones/Esp/Revista_16-1_Esp_06.pdf

ANEXOS

ANEXO N° 1
MATRIZ DE CONSISTENCIA
“CONDICIONES FAVORABLES PARA LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS A PARTIR DE LA SACHAPAPA MORADA MEDIANTE UN EQUIPO SOXHLET”

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
¿Cuáles son las condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada mediante un equipo de soxhlet.	Determinar las condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la sachapapa morada mediante un equipo de extracción Soxhlet.	Las condiciones favorables de extracción de antocianinas de la sachapapa morada que se obtiene con el equipo Soxhlet es realizando la extracción en medio ácido, a una temperatura de operación entre 50 y 70 °C con 3 etapas ideales de extracción.	Y= Obtención de Cantidad de Antocianinas.	Parámetros físicos y químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Medición de pH. • Temperatura • Número de etapas. 	Procedimiento Experimental
PROBLEMA ESPECÍFICO	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICA	VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	MÉTODO
a) ¿Cuáles son las características físicas y químicas de la sachapapa morada?	a) Identificar las características físicas y químicas de la sachapapa.	a) Las características físicas y químicas de la sachapapa morada son: humedad y temperatura de secado de la muestra, así como el contenido de antocianinas en la M.P.	X ₁ = Características fisicoquímicas de la sachapapa morada.	Parámetros fisicoquímicos y biológicos	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura de secado • Humedad • Análisis fitoquímico 	Análisis de laboratorio
b) ¿Cuáles son las condiciones favorables en el proceso de extracción de antocianinas de la sachapapa morada?	b) Determinar las condiciones favorables que se deben cumplir en el proceso de extracción	b) Las condiciones favorables en el proceso de extracción es utilizando 10 g de muestra, tamaño de partícula menor a malla 40 (TAMIZ USP) y como solvente alcohol etílico al 75%.	X ₂ = Condiciones favorables en el proceso de extracción de la sachapapa morada.	Parámetros físicos y químicos	<ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de etapas en la extracción. • Tiempo de extracción. 	Revisión técnica o análisis de laboratorio
c) ¿Cuál es el mayor rendimiento de la antocianina obtenida?	c) Identificar el mayor rendimiento de la antocianina obtenida	c) El mayor rendimiento de la antocianina obtenida debe ser de 50 mg de <u>antocianina</u> / 100 g MP.	X ₃ = Rendimiento de la antocianina obtenida.	Parámetro físico - químico.	<ul style="list-style-type: none"> • Contenido de antocianinas 	Análisis de laboratorio

y : f(X₁, X₂, X₃)

y : Condiciones favorables para la extracción de antocianinas de la sachapapa mediante un equipo Soxhlet modificado

X₁: Características físicas y químicas de la sachapapa morada

X₂: Condiciones favorables en el proceso de extracción de la sachapapa morada

X₃: Rendimiento de la antocianina de la sachapapa morada

ANEXO N° 2

ANÁLISIS FITOQUÍMICO



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA
CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



PROTOCOLO DE ANÁLISIS N.º00042 -CPF-2017

ORDEN DE ANÁLISIS : 004349/2017
SOLICITADO POR : ALEXIS CARRERO TEJEDA
MUESTRA : SACHAPAPA MORADA
NÚMERO DE LOTE : ----
CANTIDAD : 01 bolsa a 20g
FECHA DE RECEPCIÓN : 27 de Enero del 2017

PRUEBAS	ESPECIFICACIONES	MÉTODOS	RESULTADOS
TAMIZAJE FITOQUÍMICO			
AZÚCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	Cualitativo	+
	Reacción de Molish	Cualitativo	+
FENOLES	Reacción con tricloruro férrico	Cualitativo	+
TANINOS	Reacción con tricloruro férrico	Cualitativo	+
	Reacción con solución de gelatina	Cualitativo	+
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativo	+
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	Cualitativo	+
	Reacción de Mayer	Cualitativo	+
	Reacción de Wagner	Cualitativo	+
ANTOCIANINAS	Reacción con Alcohol amílico	Cualitativo	+
LACTONAS	Reacción de Baljet	Cualitativo	+
TRITERPENOS	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	+
SAPONINAS	Reacción de espuma	Cualitativo	+
ESTEROIDES	Reacción de Lieberman - Burchard	Cualitativo	+
CATEQUINAS	Reacción con Carbonato de sodio	Cualitativo	+

Lima, 06 de Febrero del 2017

Q.F. Nelson Bautista Cruz

Q.F. Nelson Bautista Cruz,
Director del Centro de Control Analítico



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú
☎ (511) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



ANEXO N° 3

ESTUDIO DE REFERENCIA DE ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS DE LA SACHAPAPA MORADA

Recibido el 26-11-09

61

ANTOCIANINAS, POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTI-OXIDANTE DE SACHAPAPA MORADA (*Dioscorea trifida* L.) Y EVALUACIÓN DE LIPOPEROXIDACIÓN EN SUERO HUMANO

Fernando Ramos-Escudero^{1*}, Ana María Muñoz¹, Carlos Alvarado-Ortiz Ureta¹,
Jaime A. Yáñez²

RESUMEN

El contenido total de antocianinas y polifenoles fue determinado por espectrofotometría. La actividad anti-oxidante de los pigmentos extraídos de *Dioscorea trifida* L. fue evaluada utilizando diferentes test de anti-oxidantes, incluyendo, secuestro de radical libre (DPPH^{*} y ABTS^{**}), así como secuestro del radical anión superóxido. La actividad anti-oxidante *in vitro* de los extractos de *Dioscorea trifida* L. sobre la peroxidación lipídica en suero humano fue evaluada a diferentes concentraciones. El mayor porcentaje de inhibición (66,7%) de peroxidación de lípidos se obtuvo a la concentración de extracto de *Dioscorea trifida* L. de 2,06 mg/mL. El coeficiente de inhibición al 50% fue de 1,824 mg/mL. Los pigmentos extraídos de la sachapapa morada son colorantes naturales que exhiben excelente actividad anti-oxidante y que ofrecen el potencial de ser beneficiosos para la salud y que pueden ser aplicados en las áreas alimenticias y de salud.

Palabras clave: *Dioscorea trifida* L., antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidante, malondialdehído, suero humano

ANTHOCYANINS, POLYPHENOLS, ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PURPLE SACHAPAPA (*Dioscorea trifida* L.) AND EVALUATION OF LIPID PEROXIDATION IN HUMAN SERUM

ABSTRACT

The total content of anthocyanins, total polyphenols were determined spectrometrically. The anti-oxidant activity of the *Dioscorea trifida* L. extracted pigments was evaluated using different anti-oxidant assays including: free radical scavenging (DPPH^{*}, and ABTS^{**}), as well as superoxide anion radical scavenging. The *in vitro* anti-oxidant activity of *Dioscorea trifida* L. extracts against the lipidic peroxidation in human serum was evaluated at different concentrations.

The largest inhibition percentage (66,37%) was achieved at the extract concentration of *Dioscorea trifida* L. of 2,06 mg/mL. The inhibition coefficient to 50% (IC₅₀) was 1,824 mg/mL. The pigments extracted from purple sachapapa are natural colorants that exhibit excellent anti-oxidant activity and offer the potential to be beneficial for health and that could be applied in the food and health science fields.

* Corresponding author
E-mail address: frescudero4711@yahoo.es (Ramos-Escudero F). Tel.: 0051-1-3652300

¹ Universidad de San Martín de Porres, Facultad de Medicina Humana, Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Av. Alameda del Corregidor 1531, La Molina (Lima, Perú).

² Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Merck & Co., Inc. Merck Research Laboratories, Kenilworth, NJ 07033, USA

Key words: *Dioscorea trifida* L, anthocyanins, polyphenols, anti-oxidant activity, malondialdehyde, human serum.

INTRODUCCIÓN

La región amazónica posee una gran cantidad de recursos; dentro de éstos se encuentra la sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L). Tradicionalmente es usada por los pobladores de la selva, pero también es utilizada para la alimentación de cerdos por su valor nutricional. *Dioscorea trifida* L, conocida como sachapapa morada en la zona del Alto Huallaga, es un tubérculo perteneciente a la familia de las *Dioscoreaceae*. Esta planta nativa de América tropical es muy apreciada por su sabor y fina textura. Los tubérculos son de mediano tamaño y según la variedad son blancos hasta morado intenso. La familia de las *Dioscoreaceae* agrupa seis géneros diferentes: *Stenomeris*, *Avetra*, *Trichopus*, *Rajania*, *Tamus* y *Dioscorea*. Desde el punto de vista de la alimentación humana el más importante es el género *Dioscorea*, el cual comprende más de 600 especies e incluye todas las económicamente importantes. Actualmente, la especie asiática *Dioscorea alata* ocupa la mayor superficie cultivada en los trópicos, y le siguen en importancia *Dioscorea cayenensis*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*¹.

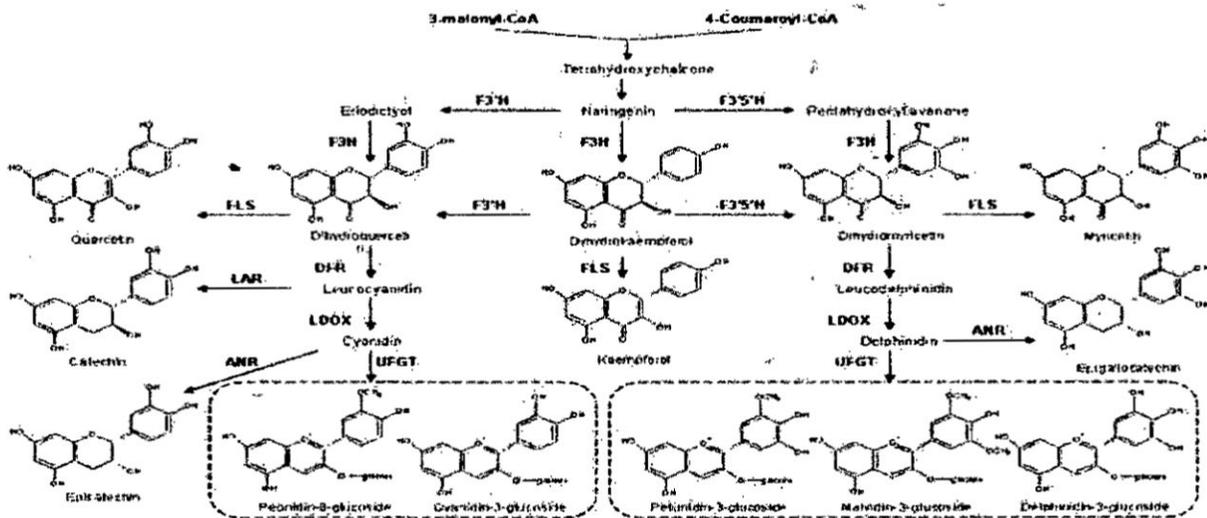
Las plantas sintetizan y acumulan una gran cantidad de metabolitos secundarios tales como los polifenoles en respuesta al estímulo y estrés fisiológico. Ellos son sintetizados a partir de fenilalanina por la vía del shikimato. Estos compuestos fenólicos juegan un rol vital en las plantas y regulan el metabolismo y síntesis de la lignina². Las antocianinas son sintetizadas por la vía de los fenilpropanoides. En la figura 1 se muestra la biosíntesis de las antocianinas a partir de 3-malonil-CoA y 4-coumaroil-CoA³.

Las antocianinas son pigmentos naturales los cuales son responsables del color azul, púrpura, violeta y rojo de las frutas, vegetales, cereales, tubérculos, granos y flores, los cuales son una de clases de flavonoides con mayor actividad anti-oxidante⁴. Además, en la naturaleza, hay más de 200 compuestos que pertenecen a este grupo, usualmente están unidos a residuos de sacáridos: glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa como 3-glicósidos o 3,5-diglicósidos, mientras que raras veces se encuentran como agluconas.

La peroxidación de lípidos expuestos al oxígeno es responsable del daño a los tejidos *in vivo*; los cuales pueden producir cáncer, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis y envejecimiento. Los efectos deletéreos se consideran atribuidos a los radicales libres (ROO^{\cdot} , RO^{\cdot} , OH^{\cdot}), producidos durante la formación de peróxidos a partir de ácidos grasos con enlaces dobles interrumpidos por metileno; es decir, los enlaces presentes en los ácidos grasos poli-insaturados naturales⁵. Como consecuencia del metabolismo celular normal, se producen radicales libres que generalmente son eliminados por los receptores endógenos pero que también pueden interactuar con lípidos séricos y tisulares provocando su peroxidación. Dada la naturaleza inestable de los productos de la peroxidación lipídica resulta dificultoso determinar la magnitud de dicha peroxidación. La peroxidación lipídica juega un papel importante en la patogénesis y gravedad de diversas enfermedades⁶. El malondialdehído (MDA) es el aldehído más significativo obtenido en dicha degradación y también el más estudiado⁶. Malondialdehído (MDA) es un subproducto natural de la peroxidación de lípidos y síntesis de prostaglandinas, y es muy activo al inducir daño al ADN ya que forma aductos de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OH-dG) y 8-Oxo-2'-desoxiadenosina (8-oxodAd) al reaccionar con el ADN⁷. La peroxidación lipídica consiste en una reacción en cadena la cual proporciona un suministro continuo de radicales libres.

FIGURA N° 1

ANTOCIANINAS, POLIFENOLES, ACTIVIDAD ANTI-OXIDANTE DE SACHAPAPA MORADA (*Dioscorea trifida* L)



Ruta de la biosíntesis de flavonoides y antocianinas. El nombre de las enzimas está abreviado como sigue : ANR, antocianidina reductasa; ANI, chalcona isomerasa; CHS chalcona sintasa; DFR dihydroxyflavonol 4-reductasa; F3H flavanon 3-hidroxiyasa; FLS flavonol sintasa; LAR leucoantocianidina rodactasa; LDOX leucoantocianidina dioxygenasa, UFGT, UDP glucosa flavonoide 3-glucosiltransferasa

PARTE EXPERIMENTAL

Muestra

Los tubérculos de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L) fueron obtenidos del valle del Alto Huallaga, Distrito de Rupa-Rupa (Tingo María), Perú, ubicado al margen derecho del río Huallaga sobre los 660 msnm a 9° 09' Latitud Sur y a 75° 53' Longitud Oeste.

Químicos

Ácido gálico, Folin-Ciocalteu's, catequina, quercetina, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2'-azo-bis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), molibdato de amonio, pirogalol, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ácido clorhídrico, metanol grado HPLC, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido tricloroacético obtenidos de Merck KGaA, Alemania).

Tratamiento de la muestra

La deshidratación de la sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L) se realizó según el método descrito por Rincón *et al.*⁸, los tubérculos fueron pelados para eliminar gran parte del mucilago. Posteriormente se cortaron en rodajas finas y se deshidrató en una estufa a 50°C por 24 horas. Las rodajas del tubérculo deshidratados fueron sometidas a una molineta y luego se hizo pasar por un tamiz para homogenizar las partículas con un tamaño máximo de 600 µm.

Polifenoles totales

El contenido de polifenoles totales se realizó acondicionando el método propuesto por Gülçin *et al.*⁹. Se utilizó ácido gálico como estándar de referencia. El extracto (50 mg/mL) se hizo reaccionar con 1,0 mL de Folin - Ciocalteu y luego se mezcló vigorosamente. Tres minutos más tarde se añadió 3 mL de Na₂CO₃ al 2%. Luego se llevó a baño María a 50°C por 1 min. Las absorbancias fueron registradas a 760 nm.

Antocianinas

El contenido total de antocianinas en la sachapapa se determinó usando el método de pH-diferencial descrito por Kirca y Cemeroglu¹⁰. Los espectros del extracto (100 mg/mL) fueron registrados entre 510 y 550 nm, en buffers a pH=1 y pH=4,5. Los cálculos fueron en base a cianidina-3-glucósido con un peso molecular de 445,2; la absorbancia molar fue 29600 mol⁻¹ L cm⁻¹. Se tomaron las máximas absorbancias a 520 nm.

Flavonoides totales

El ensayo se realizó acondicionando el método propuesto por Viswanathan *et al.*¹¹, que consistió en preparar una solución de molibdato de amonio al 0,02 % en metanol al 50% conteniendo 0,1 N de ácido sulfúrico. Se usó quercetina como estándar de referencia. El extracto a una concentración de 1 mg/mL se hizo reaccionar con la solución de molibdato de amonio. La reacción fue 1:1, para llegar a un volumen final de 3 mL. Las absorbancias se registraron a 430 nm.

Taninos

La medición de taninos se realizó por el método propuesto por Price y Butler¹², que consistió en preparar una concentración de 200 mg/mL de sachapapa pulverizada al que se le añadió 3,0 mL de 0,1 M FeCl₃ en 0,1 N HCl. Inmediatamente después se añadió 3,0 mL de 0,008 M K₃Fe(CN)₆. Luego de 10 minutos de reacción se tomó la lectura a 720 nm, teniendo como estándar de referencia ácido gálico.

Actividad anti-oxidante

Ensayo de DPPH

La actividad de secuestro del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), fue determinado espectrofotométricamente; el cambio de color de púrpura a amarillo fue monitoreado a 515 nm. El orden de la reacción fue (extracto - DPPH^{*}) y se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 1, 3, 5, 7, 10 mg/mL. Se utilizó el método propuesto por Brand-Williams *et*

*al.*¹¹ y Yokozawa *et al.*¹⁴ que consistió en hacer reaccionar 50 μ L del extracto con 950 μ L de DPPH a 100 μ M.

Ensayo de ABTS/ABAP

Las mediciones del potencial anti-oxidante por radical-trapping (TRAP) fue desarrollado por el ensayo ABAP/ABTS, usando el método descrito por Overveld *et al.*¹⁵. Los radicales ABTS^{•+} fueron generados por descomposición térmica del compuesto soluble en agua, 2,2'-azobis(2-amidopropano) hidróclorido (ABAP), generando un compuesto de color verde debido a la formación estable del radical catiónico 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico) ABTS^{•+}. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/mL. El producto de oxidación es medido a 414 nm.

Ensayo de anión superóxido

La capacidad del extracto de sachapapa para secuestrar el anión superóxido se evaluó a través del método de inhibición de la auto-oxidación del pirogalol. Se acondicionó los métodos descritos por Bermúdez-Camps *et al.*¹⁶ y Jiao *et al.*¹⁷. El medio de reacción contenía un volumen final de 3 mL de las siguientes concentraciones finales: 1000 μ L Tris-HCl de 50 mM a pH=8,2; 1000 μ L EDTA a 1 mM, 500 μ L de muestra y 500 μ L de pirogalol a 1 mM. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 25, 50 mg/mL. Los valores de absorbancia se registraron a 420 nm a intervalos de 60 segundos durante 30 minutos.

Acción de los antocianos sobre la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos es la oxidación directa en una reacción entre radicales oxigenados y lípidos para formar radicales lipídicos intermediarios. El ensayo de TBARS fue acondicionado basado en los métodos descritos por Sandoval *et al.*¹⁸ y Estepa *et al.*⁶. Las muestras de sangre se extrajeron de voluntarios con buen estado de salud, en general, con edad entre 20 a 40 años (hombres, con una edad promedio de 27 años y una desviación típica de 3,36) y con un rango de peso entre 70 y 86 kg (peso promedio de 80 kg y una desviación típica de 4,49). La sangre de cada voluntario fue extraída en ayunas, se les indicó a los voluntarios que la última comida que realizaran fuera entre la 6 y 9 de la noche del día anterior, y las muestras se tomaron entre las 9 y 10 de la mañana del día siguiente. Paralelamente se distribuyeron alícuotas de sangre en tubos sin anticoagulante. Se trabajó con el suero, induciendo la oxidación y se observó el efecto inhibitorio de las diferentes concentraciones de sachapapa. Se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente y en el suero resultante se realizó el método TBARS. El método consistió en añadir en tubos de borosilicato (resistente al calor) los siguientes volúmenes para llegar a concentraciones finales y volumen final de 3,4 mL en el siguiente orden: suero humano 600 μ L, 700 μ L de 20 mM KH_2PO_4 , 700 μ L FeCl_3 100 μ M, 700 μ L ácido ascórbico 100 μ M y 700 μ L de extracto de sachapapa. Agregar a cada tubo de reacción un volumen de muestra de una concentración 4,85X (concentración final). Para el control usar ddH_2O . Para el blanco agregar 700 μ L de suero humano y 1300 μ L de ddH_2O . Las muestras fueron incubadas a 37°C en baño María por 20 minutos. Posteriormente al tiempo de incubación, la reacción de peroxidación fue neutralizada por la adición de 1000 μ L de 5,5% de ácido tricloroacético (TCA), a 4°C y 1000 μ L de 2% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Las soluciones fueron luego calentadas a 100°C por 20 min. Luego las muestras fueron enfriadas durante 10 minutos en agua fría y centrifugada a 2000 rpm durante 10 min para remover proteínas precipitadas. La prueba se realizó con el extracto a las siguientes concentraciones: 0,2; 0,8; 1,5; 2,0 mg/mL. El color generado por la reacción del aducto MDA - TBA fue monitoreado a un ancho de banda de 540 nm.

Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA), seguido de prueba de Tukey HSD con $\alpha = 0,01$. Este tratamiento se llevó a cabo utilizando el software SAS (Statistical Analysis System).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Contenido de antocianinas, polifenoles y flavonoides totales**

Las estimaciones fueron basadas sobre reacciones con sustratos específicos o ensayos dedicados para mediciones de actividad anti-oxidante de un tipo particular de componentes. Estos resultados incluyen polifenoles totales, antocianinas, flavonoides, y taninos, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Polifenoles totales, flavonoides, taninos y antocianinas en sachapapa morada.

Características	Estándar	% CV	Contenido (mg equivalente/100g dw) *
Polifenoles totales ⁽¹⁾	Ácido gálico	1,59	166,10 ± 1,52
Flavonoides ⁽²⁾	Quercetina	16,88	27,63 ± 2,69
Taninos ⁽³⁾	Ácido gálico	1,52	9,62 ± 0,084
Antocianinas	Cianidina 3-glucósido	11,77	21,59 ± 1,47

* Datos expresados en media ± SEM de n = 3. CV = coeficiente de variabilidad entre repeticiones.

⁽¹⁾ $Y = 0,007X + 0,0263$, $R^2 = 0,9995$; ⁽²⁾ $Y = 0,0151X$, $R^2 = 0,9974$; ⁽³⁾ $Y = 0,0753X - 0,0117$, $R^2 = 0,9992$.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 1, se observa que el contenido de polifenoles totales (analizado por el método de Folin-Ciocalteu) en el extracto metanólico al 50% de sachapapa morada, fue de 166,10 ± 1,52 mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/100 g de muestra seca, con un %CV de 1,59; lo que indica que no existe mucha variabilidad entre repeticiones. El contenido de polifenoles en otros alimentos, como cebolla roja, es de 300 mg/100g, zanahoria 60 mg/100g, avena 30 mg/100g, centeno 130 mg/100g, cebada 40 mg/100g, tomate 200 mg/100g¹⁷.

El contenido de flavonoides fue de 27,63 ± 2,69 mg equivalentes de quercetina (QE)/100 g de muestra seca. Cabe indicar que los flavonoides reaccionan con metales para formar complejos con molibdeno, antimonio y bismuto; esto permite la sustitución del grupo hidroxilo del C-3 en el anillo C del flavonoide (componentes que presentan 15 – carbonos en su estructura con grupos hidroxilo en diferentes posiciones de los 3 anillos), el complejo flavonoide – metal muestra la especificidad que presentan estas moléculas para realizar saltos bacterocrómicos¹⁸.

Los taninos están comúnmente divididos en taninos condensados y principalmente son oligómeros (e.g., monómeros, dímeros y trímeros) y polímeros de flavan-3-ols (derivados de catequinas), también conocidos como proantocianidinas, y los taninos hidrolizables son galotaninos y elagitaninos que poseen un núcleo central de alcohol polihídrico, tal como la glucosa y los grupos hidroxilo, los cuales están esterificados cualquiera de los dos particularmente¹⁹. El contenido de taninos encontrados en la sachapapa morada fue de 9,62 ± 0,084 mg GAE/100g.

Por otro lado, el contenido de antocianinas en la sachapapa morada está en el orden de 21,59 ± 1,47 mg de cianidina 3-glucósido /100 g de muestra seca. Cabe indicar que las antocianinas químicamente son glucósidos de núcleo flavilium polihidroxilados y/o metoxilados. El

núcleo flavilium comprende un anillo A que es derivado del floriglucinol encadenado a un anillo pirilo, el cual está unido a un anillo fenólico B²⁷. Otras fuentes de antocianinas, como el arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) presenta alrededor de 720 mg/100 g²⁷; la zarzamora (*Rubus fruticosus*) 4974 mg/100 g²⁷, la frambuesa negra (*Rubus occidentalis* L.) 952,4 mg/100 g, frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.) 391,8 mg/100 g y fresa (*Fragaria ananassa* D) 315,2 mg/100 g²⁷.

Actividad anti-oxidante

La evaluación de la actividad anti-oxidante se realizó de acuerdo a los siguientes ensayos: Ensayo de secuestro del radical DPPH[•], ensayo de secuestro del radical ABTS^{•+} y ensayo de secuestro del radical superóxido.

Ensayo DPPH

En la figura 2, se muestra los resultados de la capacidad de secuestro de las diferentes concentraciones de sachapapa morada sobre el radical DPPH, durante 30 minutos de reacción, monitoreado a 515 nm de longitud de onda. Se monitorearon cinco concentraciones (1, 3, 5, 7, 10 mg/mL); estadísticamente los valores de DPPH[•] remanente son diferentes a un nivel de significancia de $p < 0,01$ mediante la prueba de Tukey.

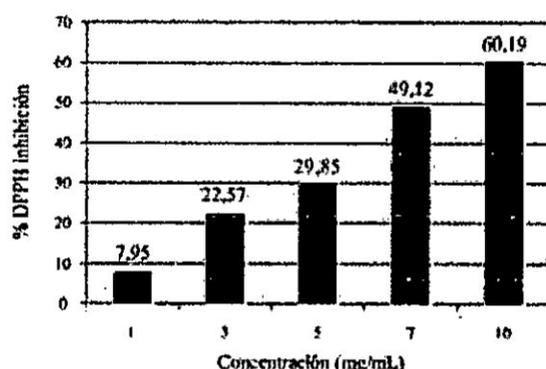


Figura 2. Actividad de secuestro de radical DPPH, por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada.

En la tabla 2 observamos el coeficiente de inhibición IC_{50} , en función al radical DPPH. Otra especie como *Decalepis hamiltonii* Wight y Arn, que es una raíz, presenta un IC_{50} de 0,29 en extracto acuoso y 0,36 en extracto metanólico. Sin embargo, la velocidad de secuestro del extracto de sachapapa morada es 0,029; otros recursos como la vitamina E (α -tocoferol) presenta 1,87, *Aronia melanocarpa* Elliot 0,70, BHA 0,42, *Prunus spinosa* L 0,20, BTH 0,05, *Fragaria X ananassa* Duch 0,03 y *Sambucus nigra* L 0,008 mg/mL²s⁻¹, respectivamente²⁸.

Ensayo ABTS

Las mediciones de la actividad de secuestro del catión ABTS^{•+} por las diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada se observan en la figura 3, y en la tabla 3, observamos que la sachapapa presenta buena habilidad para atrapar a este radical (potencial anti-oxidante radical-trapping - TRAP), y que es mucho mayor que el ácido úrico, hipotaurina y α -tocoferol, pero mucho menos que el ácido ascórbico y la tirosina²⁹. En la tabla 3 se muestra el valor de TEAC determinado mediante el ensayo ABTS^{•+}. El coeficiente de inhibición IC_{50} para este radical se muestra en la tabla 2.

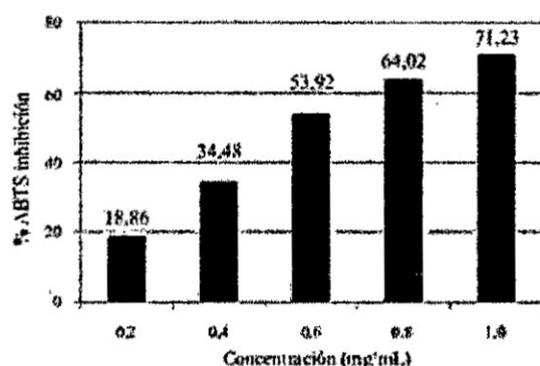


Figura 3. Actividad de secuestro de radical ABTS, por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada

Tabla 2. Valores de IC_{50} , medidos por diferentes métodos

Método/radical	Parámetros cinéticos	
	IC_{50} (mg/mL)	Modelo matemático
DPPH	7,44	$Y = 102,12e^{-0,0988X}$
ABTS	0,54	$Y = 83,87X + 0,9625$
Anión superóxido	13,67	$Y = 99,319e^{-0,0502X}$
TBARS	1,82	$Y = 27,0037 + \exp(-1,0703 + 2,3050 X)$

Tabla 3. Valores de TEAC determinados mediante ABAP/ABTS

Recurso/componentes	Concentración (mg/mL)	TEAC (300 s)
Tirosina **	0,02	1,48
Ácido ascórbico **	0,02	1,34
Extracto de sachapapa *	1,00	1,23
Ácido úrico **	0,02	0,89
á-tocoferol **	0,04	0,80
Hipotaurina **	0,01	0,56

* Dato experimental obtenido de interpolar a la curva ABTS^{•+} vs Trolox ($Y = 49,766X - 1,5722$), $R^2 = 0,9979$.

** Datos obtenidos de Overveld *et al.* (2000).

Ensayo anión superóxido

El anión superóxido es un radical libre inicial que juega un rol importante en la formación de otras especies reactivas del oxígeno (EROS) como peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo u oxígeno singlete en un sistema vivo. Éstos, a su vez, pueden reaccionar con óxido nítrico y formar peroxinitrito, el cual puede generar componentes tóxicos, tales como el radical hidroxilo y el dióxido nítrico¹⁵. En la figura 4, se muestra la capacidad de secuestro por las diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada sobre el radical anión superóxido usando un sistema de autooxidación de pirogalol, respectivamente. El coeficiente de inhibición IC_{50} , se muestra en la tabla 2.

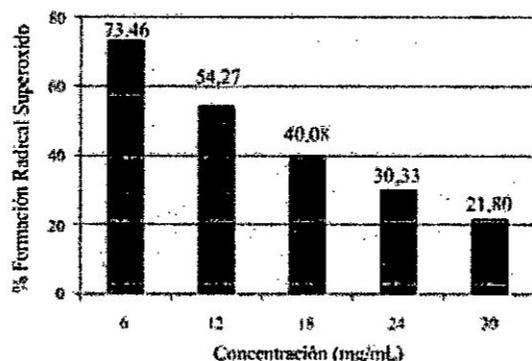


Figura 4. Formación de radical superóxido O₂ por diferentes concentraciones del extracto de sachapapa morada.

Las concentraciones presentaron diferencia estadística a $p < 0,01$, según la prueba de Tukey. Jiao *et al.*⁴³ reporta una capacidad de secuestro de 90,78% para una concentración de 1,25 mg/mL para zarzamora. Sin embargo, la tendencia de la capacidad de secuestro entre los pigmentos de la sachapapa morada y zarzamora son similares, pero los % de secuestro son mayores para este último que para la sachapapa morada; esta variación puede deberse a que el contenido de antocianos es mucho mayor.

Acción de los antocianos sobre la peroxidación de lípidos

En la figura 5, se muestra capacidad de inhibición de las diferentes concentraciones de antocianinas de la sachapapa morada.

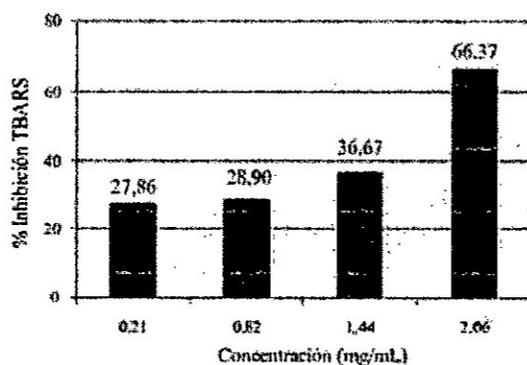


Figura 5. Capacidad de inhibición TBARS de las diferentes concentraciones de antocianinas de sachapapa morada en suero humano.

De los resultados mostrados en la figura 5, observamos que las antocianinas presentan la capacidad de inhibir la formación de lipoperóxidos. La peroxidación del suero humano fue acelerada notablemente cuando no presentó ningún anti-oxidante en la reacción (Datos no mostrados). Sin embargo, la peroxidación fue inhibida después de la adición de diferentes concentraciones de antocianinas. El rango de inhibición para el extracto fue entre 0,2 y 2 mg/mL. La actividad anti-oxidante de los extractos se incrementó, teniendo un máximo de inhibición sobre el suero humano de 66,37%. En la tabla 2 se muestra el coeficiente de inhibición al 50%, que indica la capacidad de secuestro para los radicales peroxilos. Otras fuentes de antocianinas como *Cornus alternifolia* y *Cornus controversa* inhibieron la

peroxidación de lípidos en un 56% y 53%, respectivamente, en una concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$, la inhibición de peroxidación de lípidos por antocianinas aisladas como del finidina-3-O-glucósido y del finidina-3-O-rutinósido, fue de 71% y 68%, respectivamente, para una concentración máxima de 50 $\mu\text{g/mL}$ ²⁴. García-Alonso *et al.*²⁵, reporta que la actividad anti-oxidante de algunos frutos que presentan un alto efecto anti-oxidante medido por IC_{50} provienen de fresa 50 $\mu\text{g/mL}$, frambuesa roja 55 $\mu\text{g/mL}$, cereza 74 $\mu\text{g/mL}$, zarzamora 76 $\mu\text{g/mL}$, uva blanca 78 $\mu\text{g/mL}$, banana 1281 $\mu\text{g/mL}$, kiwi 448.7 $\mu\text{g/mL}$ y palta > 5000 $\mu\text{g/mL}$; lo importante de esto es que los frutos que presentan una mayor actividad anti-oxidante medido por TBARS son ricos en antocianinas, por lo que pueden contribuir a esta capacidad. La sachapapa morada no es ajeno a esta capacidad ya que presenta un IC_{50} de 1824 $\mu\text{g/mL}$; esto permite remarcar que los procesos de peroxidación de lípidos juegan un rol importante en la progresión de muchos desórdenes²⁶, lo que nos permite demostrar que las antocianinas procedentes de la sachapapa morada pueden inhibir *in vitro* el daño producido por radicales libres; estos radicales pueden activar los procesos de peroxidación de lípidos y la cascada del ácido araquidónico, con la producción de eicosanoides y estimulando la proliferación celular⁷. Está demostrado que en animales de experimentación las antocianinas inducidas demostraron una disminución en el contenido de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS); por el contrario, hubo un incremento de los niveles anti-oxidantes y un incremento en la actividad de la glutathione peroxidasa (GPx); las propiedades anti-oxidantes de las antocianinas son usadas en las terapias de enfermedades cardiovasculares, entre otros; las antocianinas disminuyen la cantidad de oxidación de LDL, inhiben la formación de radicales libres en el proceso de repercusión; también protegen los cardiomiocitos después de un proceso isquémico; las antocianinas son capaces de disminuir la actividad del óxido nítrico sintasa y los niveles de óxido nítrico²⁷.

CONCLUSIONES

El contenido de polifenoles totales, flavonoides, taninos y antocianinas están alrededor de 166,10; 27,63; 9,62 y 21,59 $\text{mg}/100\text{g}$ de materia seca, respectivamente. La capacidad de secuestro del radical DPPH, ABTS y anión superóxido, presentan un coeficiente de inhibición IC_{50} de 7,44; 0,537 y 13,67 mg/mL respectivamente. La peroxidación de lípidos en suero humano fue de 1,824 mg/mL , lo que indica que los pigmentos extraídos de sachapapa morada presentan un buen efecto protector *in vitro*.

AGRADECIMIENTO

Publicación financiada con la ayuda de la beca del Programa de Financiamiento para la Innovación, la Ciencia y la Tecnología (FINCyT).

BIBLIOGRAFÍA

1. Silva J, Espinoza A, Acosta L, Gonzáles O, Licca R, Meneses S. Resultados y perspectivas de la conservación *in vitro* de recursos fitogenéticos en la región oriental de Cuba. *Cuadernos de Biodiversidad* 2001; 7: 4-6.
2. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1085-1097.
3. Jeong ST, Goto-Yamamoto N, Hashizume K, Esaka M. Expression of the flavonoid 3',5'-hydroxylase genes and flavonoid composition in grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci* 2006; 170: 61-69.