

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA



OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE ANTOCIANINAS DE
ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.), CULTIVADO EN EL
VALLE CENTRAL DE TARIJA

Por:

ENILCE JESSICA CRUZ HUMACATA

Proyecto de grado, modalidad (investigación aplicada) presentado a consideración de la “UNIVERSIDAD AUTÓNOMA JUAN MISAEL SARACHO”, como requisito para optar el grado académico de Licenciatura en Ingeniería Química.

Octubre de 2019

TARIJA-BOLIVIA

V°B°

M.Sc. Ing. Ernesto R. Álvarez Gozalvez

DECANO

Facultad de Ciencias y Tecnología

M.Sc. Lic. Elizabeth Castro Figueroa

VICEDECANA

Facultad de Ciencias y Tecnología

APROBADA POR:

TRIBUNAL:

Ing. Patricia Castillo

Ing. María Luz Cáceres Martínez

Ing. Gustavo Moreno López

El tribunal calificador del presente trabajo, no se solidariza con la forma, términos, modos y expresiones vertidas en el mismo, siendo éstas responsabilidad de la autora.

Dedicatorias

El presente “Trabajo de Grado” va dedicado a Dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas sin desfallecer.

A mi madre Juana Humacata y padre Agustín Cruz, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más.

Dedicado con mucho cariño a mi compañero y amigo Ing. Ronal Velásquez quien hoy se encuentra en el cielo.

A los docentes y compañeros de la Carrera Ing. Química de la UAJMS, quienes me apoyaron en todo momento que necesite de ellos.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por bendecir mi vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Me faltaran páginas para agradecer a las personas que se han involucrado en la realización de este trabajo, sin embargo merecen reconocimiento especial mi madre Juana Humacata y mi padre Agustín Cruz que con su esfuerzo y dedicación me ayudaron a culminar mi carrera universitaria.

A mis hermanos y amigos que me dieron el apoyo suficiente para no decaer cuando todo parecía complicado e imposible.

A todos los docentes de la Carrera de Ing. Química de la UAJMS, que me han visto crecer como persona, y gracias a sus conocimientos hoy puedo sentirme dichosa y contenta.

Al Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés de la ciudad de La Paz, en especial al Doctor Mauricio Penarrieta.

Pensamiento

Comienza haciendo lo necesario, después lo que es posible y de repente estarás haciendo lo imposible.

San Francisco de Asís

ÍNDICE

Página

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes	1
1.1.1. Mercado: Aspectos Generales	3
1.1.1.1. Demanda de Antocianinas	3
1.1.1.2. Oferta de Antocianinas	4
1.1.1.3. Precios de Antocianinas	5
1.2. Objetivos	7
1.2.1. Objetivo General	7
1.2.2. Objetivos Específicos	7
1.3. Justificación	8

CAPÍTULO II CONSIDERACIONES DE LA MATERIA PRIMA Y EL PRODUCTO EXTRACTO DE ANTOCIANINAS

2.1. Materia Prima: Arándano	11
2.1.1. Caracterización Fisicoquímica de la Materia Prima: Arándano	12
2.1.2. Propiedades del Arándano	15
2.1.3. Clasificación del Arándano	17
2.1.3.1. Arándano Alto (Highbush)	17
2.1.3.2. Arándano “Ojo de Conejo” (Rabbiteye)	18
2.1.3.3. Arándano Bajo (Lowbush)	19
2.1.3.4. Vaccinium Macrocarpon o Cranberry	19
2.1.3.5. Arándano Europeo (Bilberry)	20

2.1.4. Producción de Arándano.....	20
2.1.4.1. Arándanos en el Valle Central de Tarija.....	22
2.2. Extracto de Antocianinas de Arándano	24
2.2.1. Caracterización Fisicoquímica del Producto: Extracto de Antocianinas de Arándano.....	25

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. Definición de Antocianinas	27
3.1.1. Estructura Química de las Antocianinas:.....	27
3.1.2. Biosíntesis de las Antocianinas	29
3.1.3. Síntesis Química de Antocianidinas	31
3.1.4. Principales Factores que Afectan la Estabilidad de las Antocianinas	32
3.1.4.1. El pH.....	32
3.1.4.2. La Temperatura.....	33
3.1.4.3. Agua.....	34
3.1.4.4. Luz.....	34
3.1.4.5. Oxígeno.....	35
3.1.4.6. Copigmentación.....	35
3.1.5. Beneficios de las Antocianinas.....	36
3.1.5.1. Propiedades Anticancerígenas de las Antocianinas.....	36
3.1.5.2. Propiedades Antimicrobiana y Antiviral de las Antocianinas	37
3.1.5.3. Propiedades Neuronales de las Antocianinas	37
3.1.5.4. Propiedades Oculares de las Antocianinas	37
3.1.5.5. Propiedades en la Diabetes y Obesidad de las Antocianinas.....	37

3.1.6. Propiedades Antioxidantes de las Antocianinas	38
3.2. Definición de Extracción.....	39
3.2.1. Métodos de Extracción Aplicables a la Investigación	39
3.2.1.1. Extracción por Fermentación	40
3.2.1.2. Extracción Sólido - Líquido	40
3.2.1.2.1. Extracción por Maceración	42
3.2.1.2.2. Extracción por Cocciones	43
3.2.1.2.3. Extracción por Lixiviación.....	44
3.2.1.2.4. Extracción con Equipo Soxhlet.....	46
3.3. Antecedentes Investigativos respecto a Extracción de Antocianinas	47
3.3.1. Extracción de Antocianinas por Fermentación	47
3.3.2. Extracción de Antocianinas Sólido-Líquido	47
3.4. Factores que Influyen en la Extracción de Antocianinas.....	49
3.4.1. Temperatura	49
3.4.2. Tamaño de Partícula.....	50
3.4.3. Agitación del Solvente	50
3.4.4. Equilibrio entre el Solvente y el Sóluto	50
3.4.5. Número de Lavados de la Materia Prima.....	51
3.4.6. Calidad del Solvente	51
3.5. Conservación del Extracto Antocianinas de Arándano.....	52
3.5.1. Microencapsulación	52
3.5.2. Conservación de las Antocianinas en Estado Líquido	52

CAPÍTULO IV
PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Metodología del Estudio para la Extracción de Antocianinas	53
4.1.1. Descripción Esquemática de la “Metodología del Estudio”	53
4.2. Selección del Método de Extracción de Antocianinas de Arándano	54
4.3. Selección del Solvente para la Extracción de Antocianinas	56
4.4. Selección de Variables del Proceso de Extracción de Antocianinas de Arándano	57
4.4.1. pH	58
4.4.2. Estado de la Materia Prima Arándano	58
4.4.3. Relación de Materia Prima / Solvente de Extracción	59
4.5. Diseño Experimental para la Obtención de Extracto de Antocianinas	59
4.5.1. Planteamiento de la Hipótesis	59
4.5.2. Modelo del Diseño Factorial	60
4.6. Diseño del Proceso Tecnológico Experimental Seleccionado de Extracción de Antocianinas	62
4.6.1. Recepción de la Materia Prima: Arándano	63
4.6.2. Selección y Lavado del Arándano	63
4.6.3. Pesado de la Materia Prima: Arándano	64
4.6.4. Triturado de la Materia Prima: Arándano	65
4.6.5. Extracción Mediante Agitación	65
4.6.6. Filtrado del Extracto de Antocianinas	66
4.6.7. Concentración del Extracto de Antocianinas	67
4.6.8. Almacenamiento del Extracto Concentrado de Antocianinas de Arándano	67

4.6.9. Análisis Cuantitativo de Antocianinas	68
4.6.10. Análisis de Color en el Extracto de Antocianinas de Arándano	69
4.6.11. Balance de Materia y Energía	69
4.6.11.1. Balance de Materia.....	73
4.6.11.1.1. Balance de Materia en la Etapa de Lavado	73
4.6.11.1.2. Balance de Materia en la Etapa de Triturado	74
4.6.11.1.3. Balance de Materia de la Etapa de Extracción-Filtración.....	78
4.6.11.1.4. Balance de Materia de la Etapa de Concentración.....	81
4.6.11.2. Balance de Energía.....	87
4.6.11.2.1. Balance de Energía en el Agitador Magnético.....	87
4.6.11.2.2. Balance de Energía en el Rota-Evaporador	87
4.6.11.2.3. Balance de Energía en el Condensador	88

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Análisis de la Materia: Arándano.....	90
5.1.1. Antocianinas en Arándano	91
5.1.2. Análisis de Color en el Arándano	91
5.1.3. Análisis de Antocianinas por HPLC para la Materia Prima: Arándano.....	93
5.2. Análisis del Producto: Extracto de Antocianinas de Arándano	94
5.3. Análisis de la Concentración de Antocianinas en los Extractos	95
5.3.1. Método de pH Diferencial.....	95
5.3.1.1. Procedimiento	95
5.4. Rendimiento de Antocianinas	98
5.5. Análisis de Color de los Extractos de Antocianinas de Arándano.....	100

5.6. Análisis de Antocianinas por HPLC para el Producto: Extracto de Antocianinas.....	103
5.6.1. Método de HPLC	104
5.6.1.1. Procedimiento	104
5.7. Resultados del Balance del Materia y Energía.....	106
5.7.1. Resultados del Balance de Materia	106
5.7.2. Resultados del Balance de Energía	109
5.8. Rendimiento del Proceso Tecnológico.....	109
5.9. Rendimiento de Antocianinas	109
5.10. Análisis Estadístico del Diseño Experimental	110
5.10.1. Análisis de Varianza Univariante.....	110
5.10.2. Determinación del Modelo Matemático.....	111
5.11. Análisis de Costos	117
5.11.1. Costo del Estudio	117
5.11.2. Costo de Producción	121

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones	123
6.2. Recomendaciones.....	125

Índice de Cuadros y/o Tablas

	Página
Tabla I- 1: Contenido de Antocianinas en Fuentes Naturales.....	2
Tabla I- 2: Empresas y Precios que Ofertan Colorantes de Antocianinas	5
Tabla II- 1: Parámetros Importantes del Arándano.....	13
Tabla II- 2: Composición del Arándano.....	14
Tabla II- 3: Características Químicas en % del Arándano.....	15
Tabla II- 4: Propiedades Asociadas a los Principios Activos del Arándano	16
Tabla II- 5: Especies de Arándano Pertenecientes al Género <i>Vaccinium</i>	17
Tabla II- 6: Producción Mundial de Arándano	21
Tabla II- 7: Superficie de Arándanos Cultivada en Tarija	22
Tabla II- 8 Contenido Porcentual de las Distintas Antocianinas que posee el Extracto	25
Tabla II- 9: Resultado de Análisis en el Extracto de Antocianinas de Arándano	26
Tabla II- 10: Composición mineral en el Extracto de Antocianinas de Arándano	26
Tabla III- 1 Principales Sustituyentes de las Antocianina	28
Tabla IV- 1: Escala de Calificación por Puntuación del 1 al 10.....	54
Tabla IV- 2: Matriz de Decisión para la Selección del Método de Extracción de Antocianinas.....	55
Tabla IV- 3: Ventajas y Desventajas de los Posibles Solventes para la Extracción de Antocianinas.....	56
Tabla IV- 4: Niveles de Variación de los Factores	60
Tabla IV- 5: Codificación de Variables	60
Tabla IV- 6: Matriz de Diseño	61

Tabla IV- 7: Datos de Proceso de Obtención de Extracto de Antocianinas.....	70
Tabla IV- 8: Nomenclatura Utilizada en el Balance de Materia	71
Tabla IV- 9: Corrientes del Proceso.....	72
Tabla V-1: Características de la Materia Prima: Arándano	90
Tabla V-2: Análisis de Antocianinas en la Materia Prima: Arándano.....	91
Tabla V-3: Análisis de Color en la Materia Prima: Arándano.....	92
Tabla V-4: Resultado de Análisis por HPLC.....	94
Tabla V-5: Características del Extracto de Antocianinas de Arándano.....	94
Tabla V-6: Resultados de Análisis de Antocianinas en los Extractos	97
Tabla V-7: Rendimiento de Antocianinas en los Extractos	99
Tabla V-8: Resultados de Análisis de Color en los Extractos	102
Tabla V-9: Método de análisis, HPLC.....	104
Tabla V-10: Resultado de Análisis por HPLC, para los Extractos de Antocianinas.....	106
Tabla V-11: Resultados de Corrientes en el Balance de Materia.....	106
Tabla V-12: Resultado de Fracciones en cada Corriente del Balance de Materia	107
Tabla V-13: Resultados del Balance de Energía.....	109
Tabla V-14: Variables para la Regresión.....	112
Tabla V-15: Resultado de Rendimientos de Extracto de Antocianinas	116
Tabla V-16: Detalle de costos de Materia Prima, Solventes y Reactivos.....	117
Tabla V-17: Detalle de Costos de Materiales.	118
Tabla V-18: Detalle de Costos de Análisis.	119
Tabla V-19: Detalle de Costos Material de Apoyo.....	120
Tabla V-20: Detalle de Costos Totales.	120

Tabla V-21: Costo de Funcionamiento de los Equipos.....	121
Tabla V-22: Costo de Material.....	122

Índice de Figuras

	Página
Figura 1- 1: Países que Demandan Antocianinas	4
Figura 1- 2: Países que Ofertan Antocianinas	4
Figura 1-3: Antocianinas Expendidas en el Mercado Nacional	6
Figura 2- 1: Frutos de Arándano.....	11
Figura 2- 2: Anatomía de la Baya de Arándano	13
Figura 2- 3: Arbusto de Arándano Highbush	18
Figura 2- 4: Arbusto de Arándano Rabbiteye.....	18
Figura 2- 5: Arbusto de Arándano Lowbush.....	19
Figura 2- 6: Arbusto de Arándano Cranberry.....	19
Figura 2- 7: Arbusto de Arándano Bilberry.....	20
Figura 2- 8: Cultivo de Arándano en el Valle Central de Tarija-Turumayo	23
Figura 2- 9: Arándanos Envasados para su Respectiva Venta	24
Figura 3- 1: Estructura Básica de las Antocianinas	28
Figura 3- 2: Ruta General de Biosíntesis de las Antocianinas.....	30
Figura 3- 3: Síntesis de Robinson de Antocianidinas	31
Figura 3- 4: Estructura de las Antocianinas a Diferentes Valores de pH.....	33
Figura 3- 5: Formación de Chalconas por Pérdida Azúcar Glicosilante	34
Figura 3- 6: Interacciones de Copigmentación de las Antocianinas.....	36
Figura 3- 7: Diagrama del Proceso de Fermentación	40
Figura 3- 8: Extracción Sólido-Líquido.....	41
Figura 3- 9: Extracción por Maceración.....	43
Figura 3- 10: Diagrama del Proceso de Extracción por Cocimiento	44

Figura 3- 11: Diagrama del Proceso de Extracción por Lixiviación	45
Figura 3- 12: Extracción con Equipo Soxhlet.....	46
Figura 4- 1: Metodología del Estudio.....	53
Figura 4- 2: Esquema del Proceso de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano.....	62
Figura 4- 3: Ubicación Geográfica de la Procedencia de la Materia Prima	63
Figura 4- 4: Selección y Lavado del Arándano	64
Figura 4- 5: Pesado de la Materia Prima	64
Figura 4- 6: Triturado de la Materia Prima.....	65
Figura 4- 7: Extracción Mediante Agitación Magnética	66
Figura 4- 8: Filtración al Vacío	66
Figura 4- 9: Concentración del Extracto.....	67
Figura 4- 10: Muestras de Extracto Concentrado.....	68
Figura 4- 11: Análisis Cuantitativo de Antocianinas.....	68
Figura 4- 12: Análisis de Color del Extracto	69
Figura 4- 13: Diagrama de Bloques del Proceso	72
Figura 4- 14: Balance de Materia para la Extracción de Antocianinas de Arándano. 86	
Figura 5-1: Color Característico de la Materia Prima: Arándano.....	92
Figura 5-2: Cromatograma de la Materia Prima: Arándano.....	93
Figura 5-3: Diagrama de Cromaticidad del Espacio de Color.....	101
Figura 5-4: Color Característico del Mejor Extracto	103
Figura 5-5: Resultado de Análisis de Antocianinas. Muestra # 8.....	105
Figura 5-6: Espectro UV-Visible de Cianidina	105
Figura 5-7: Factores Inter-Sujetos	110

Figura 5-8: Pruebas Inter-Sujeto.....	111
Figura 5-9: Resumen del Modelo Matemático	113
Figura 5-10: Resultados del Análisis Anova	113
Figura 5-11: Coeficientes del Modelo Matemático	114
Figura 5-12: Modelo Lineal.....	115
Figura 5-13: Rendimientos Observado, Calculado y Error	117

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano, dirigido al aprovechamiento de la baya de Arándano como fuente potencial de Antocianinas naturales Antioxidantes.

El proceso de Extracción de Antocianinas de Arándano se realiza mediante agitación mecánica con etanol acidulado con ácido cítrico como solvente y filtración al vacío, con papel Whatman # 42, para después realizar el concentrado al vacío del Extracto de Antocianinas en un Evaporador Rotativo.

Los factores que se evalúan para analizar el rendimiento de la extracción son: pH; 3,5 y 4, estado de la materia prima; fresco y congelado, relación soluto-solvente; 1:2 y 1:3 g/ml.

El análisis estadístico de los resultados se realiza mediante el programa SPSS 18,0, a través de un diseño factorial de 2^3 . Como variable respuesta se toma el rendimiento porcentual de Antocianinas obtenidas en el proceso de extracción.

El mejor rendimiento se obtiene trabajando con pH 4, con Arándano fresco y una relación soluto-solvente 1:3 g/ml, la concentración del extracto es: 103,2/100 mg de Antocianina en ml de extracto.

Definido el mejor experimento se realiza el balance de materia y energía. Con los datos respectivos, se obtiene 19,96 g de extracto a partir de 50,503 g de Arándano.

La caracterización de la materia prima Arándano Fresco y el producto Extracto de Antocianinas de Arándano, se realiza mediante análisis fisicoquímico.

Las concentraciones de Antocianinas Monoméricas presentes se evalúan mediante Espectrofotometría UV-Vis, método de pH diferencial. Las concentraciones de Cianidina se evalúan mediante el método HPLC.

Donde los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Resultados de análisis en la Materia Prima y Producto

Parámetros	Arándano Fresco.	Extracto de Antocianinas de Arándano.
Humedad (%)	83,04	75,71
Fibra	No detectado	No detectado
Ceniza (%)	0,97	0,28
Proteína (%)	0,98	1,14
Grasa (%)	0,10	No detectado
Azúcares (%)	11,84	28,58
Acidez (%)	0,006	0,28
pH	3,33	2,95
Densidad	1,0058	1,032
Antocianinas Monoméricas	97,73 mg/100 g	103mg/100 ml
Cianidina	1,4 mg/100 g	7,503 mg/100ml

Fuente: Elaboración propia, 2019.

El color del Arándano y el Extracto de Antocianinas de Arándano se analiza con un medidor de colorimetría CR-400, mediante lectura directa de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$,

Que ubican a los colores en las siguientes coordenadas con su respectiva tonalidad:

Arándano: $L^* = 19,205$; $a^* = -0,15$; $b^* = -1,27$, tonalidad azul.

Extracto de Antocianinas: $L^* = 21,22$; $a^* = 6,21$; $b^* = 2,11$, tonalidad rojiza.

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN

I. CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Las Antocianinas fueron conocidas durante siglos como el color de la savia de las células, en 1835 Ludwig Marquart propuso el término Antocianina derivado de las palabras griegas: Antho que significa flor y Kyanos que significa azul oscuro (Xiaonan Sui, 2017)

En 1927 el farmacéutico alemán Adolf T. Lewandoski utiliza el término Antocianina para describir el pigmento azul de la col lombarda (*Brassica oleracea*).

En 1970 se inició la producción a escala industrial de Antocianinas. EL pionero fue Chr. Hansen, en su centro situado a las afueras de Montpellier, en medio de la zona de viñedos del sur de Francia. Las primeras Antocianinas se extrajeron de la piel de la uva, la grosella negra y de la baya de Sauco (Laurentis, 2014).

En los últimos años el interés por los pigmentos antociánicos, y su investigación científica, se ha incrementado debido al color que confieren a los productos que los contienen, sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. En el paso del sistema digestivo al sistema circulatorio, las Antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos que influyen en la prevención de enfermedades coronarias, cancerígenas, neurológicas, circulatorias, inflamatorias y diabéticas; además de mejorar la agudeza visual y el comportamiento cognitivo. Estos efectos terapéuticos de las Antocianinas están relacionados con su actividad antioxidante (Aguilera Ortíz, 2011).

En Bolivia, no existen industrias ni empresas dedicadas a la producción y comercialización de Extracto de Antocianinas.

En el Instituto de Investigaciones Químicas de la Facultad de Ciencias Puras y Naturales de la Universidad Mayor de San Andrés de Bolivia, se realizaron

investigaciones para caracterizar las Antocianinas en diferentes frutos y vegetales. Por ejemplo: Antocianinas en oca, papa y maíz morado.

Entre estos estudios no existen antecedentes de investigaciones relacionadas a Antocianinas de Arándano.

Las fuentes naturales de Antocianinas se encuentran ampliamente distribuidas en vegetales, frutas, cereales de color rojo hasta azul morado, como es el caso de los pigmentos rojos en rábanos, cebollas rojas, cerezas, frambuesas, Arándanos, uvas entre otros. (Castañeda & Beltrán, 2015).

Tabla I- 1: Contenido de Antocianinas en Fuentes Naturales

Fuente de antocianinas	Contenido de antocianinas (mg/100 g)
Cebolla roja	23,3 - 48,5
Fresas	19 – 55
Arándano rojo	67 – 140
Mora	82,5 - 325,9
Arándano (<i>Vaccinium myrtillus</i> L.)	300-1017
Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.)	61,8 – 438
Maíz rojo	1642
Baya de sauco	664-1816

Fuente: Pascual Teresa, 2010.

“El Arándano es una fuente potencial de Antocianinas Naturales Antioxidantes”.
Deineka, Sorokopudov, Deineka, Shaposhnik y Koltsov (2005) reportaron 29 mg y

Moldovan, David, Chisbora y Cim- poi (2012) encontraron 35.6 mg de Antocianinas por 100 g de Arándanos.

Los resultados varían porque los Arándanos provienen de diferentes regiones de Europa, por lo tanto su composición puede variar debido a las diferentes condiciones como la humedad, tipo de suelo, clima, etc. (Castañeda & Beltrán, 2015).

El proceso tecnológico más utilizado para la extracción de Antocianinas es la extracción sólido-líquido. Sin embargo, es de destacar la existencia de otros procesos.

Científicos japoneses desarrollaron un proceso alternativo que consiste en extraer las Antocianinas mediante la fermentación de las matrices que las contienen a nivel comercial (Fennema, 2000).

En relación a la extracción, Rodríguez y Wolstrad (2001) señalan que el carácter polar de la molécula de Antocianina permite su solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Su estabilidad es afectada fácilmente por modificaciones estructurales con grupos hidroxilo, metoxilo, glucósidos y, especialmente, grupos acilos y factores como la temperatura, pH, la luz (Francis y Markakis, 1989; Wrolstad, 2000).

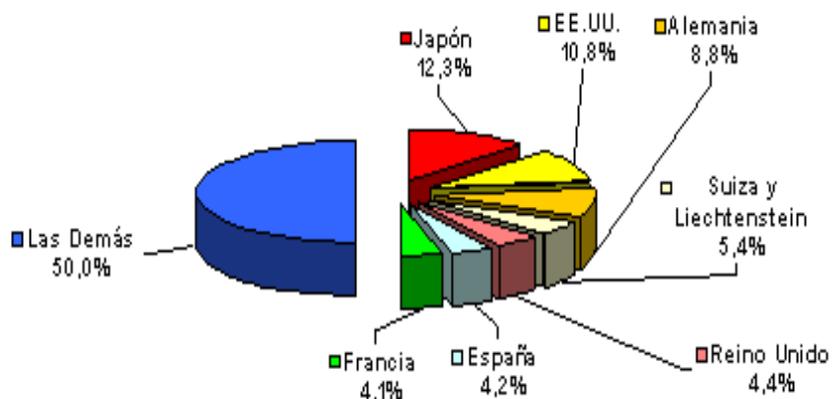
1.1.1. Mercado: Aspectos Generales

1.1.1.1. Demanda de Antocianinas

Las Antocianinas pueden ser demandadas como colorante para la pigmentación de alimentos o por sus propiedades antioxidantes. Como colorante se puede encontrar una demanda extensa de los siguientes países, que se muestran en la figura 1-1.

El mercado de los productos orgánicos, y en específico de los colorantes naturales, está en crecimiento ofreciendo oportunidades de exportación y progreso para los países en vía de desarrollo. Según un informe difundido por: Leather Food Research, a mediados de la próxima década, el valor del mercado mundial de este producto, tendrá un aumento del 10%.

Figura 1- 1: Países que Demandan Antocianinas



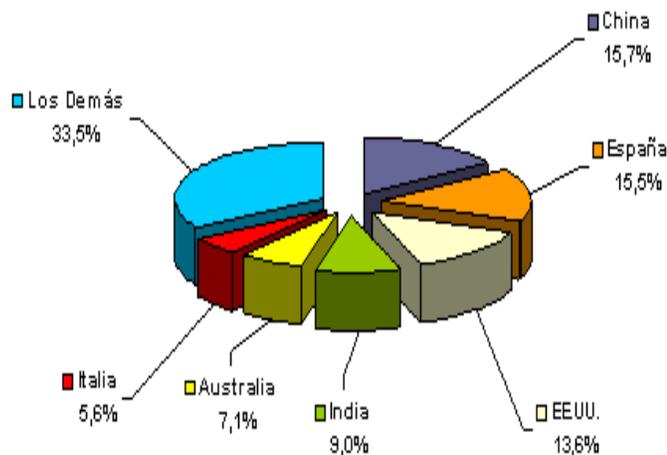
Fuente: Prochile, 2004.

La demanda de colorantes naturales a nivel mundial es alrededor de 40.000 a 50.000 toneladas (Leather Food Research, 2010). Siendo los mayores consumidores Japón y Estados Unidos.

1.1.1.2. Oferta de Antocianinas

La oferta de Antocianinas como colorante natural se realiza por los países mostrados en la figura 1-2, de los que resalta China, España y E.E.U.U como mayores ofertantes.

Figura 1- 2: Países que Ofertan Antocianinas



Fuente: Prochile, 2004.

En Europa existe mayor oferta de antocianinas, la empresa que lidera la oferta de Antocianinas es Chr. Hansen, cuenta con una extensa red de aprovisionamiento de colorantes naturales en Francia, Italia y España y ofrece productos acabados según las normas de alta calidad de la industria alimentaria. (Laurentis, R. 2014).

1.1.1.3. Precios de Antocianinas

Europa es reconocida como el mayor ofertante de Antocianinas. Para realizar un análisis de precios se toma en cuenta las empresas, mencionadas en la tabla I- 2, las que muestran el precio en Euros de la cantidad respectiva de Antocianinas.

Tabla I- 2: Empresas y Precios que Ofertan Colorantes de Antocianinas

Empresa	Procedencia	Cantidad Polvo (Kg)	Precio (Euros)
Andicol	España	1	2500
Astek S.A.	Colombia	1	2600
Colsabor S.A.S.	Colombia	0,25	600
Concentrados la delicia S.A.S.	Colombia	0,5	1100
Totalquímicos SM Ltda	Perú	1	3800
Productos el arriero Cia-Ltda	Colombia	0,25	1100

Fuente: Gaviria Mejía, 2012.

Respecto al Mercado Nacional, se expende extracto de Antocianinas de Arándanos, en las farmacias con un precio de 155 Bs (bolivianos) las 100 capsulas, que contiene cada una 60 mg de extracto al 15% de pureza respecto a Antocianinas.

Figura 1-3: Antocianinas Expendidas en el Mercado Nacional



Fuente: Elaboración propia, 2018

La marca GNC “General Nutrition Coporation” procedente de Estados Unidos es quien suministra Extracto de Antocianinas al Mercado Nacional.

El precio es de 155 Bs por 6 g de Extracto de Antocianinas de Arándano, que equivale 26 Bs cada 1gr de Extracto de Antocianinas de Arándano en estado sólido para el mercado nacional de Bolivia.

Según la pureza del extracto expendido cada 1 gr de Antocianinas equivale a 173 Bs.

1.2. Objetivos

Los objetivos que se persiguen durante la realización de la investigación son:

1.2.1. Objetivo General

Obtener Extracto de Antocianinas de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivado en el Valle Central de Tarija.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar la materia prima Arándano cultivado en el Valle Central de Tarija para la Obtención de Extracto de Antocianinas (pH, solidos solubles, Antocianinas Monoméricas, Color.)
- Seleccionar el método y diseñar el proceso tecnológico de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.)
- Ejecutar la fase experimental del proceso tecnológico de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano.
- Realizar Balance de Materia y Energía en el proceso tecnológico de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano.
- Determinar el rendimiento del proceso tecnológico experimental utilizado para la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano, cultivado en el Valle Central de Tarija
- Caracterizar el producto obtenido de Extracto de Antocianinas de Arándano, cultivado en el Valle Central de Tarija (pH, solidos solubles, Antocianinas Monoméricas, Color).
- Presentar, analizar y valorar los resultados del proceso tecnológico experimental de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano, cultivado en el Valle Central de Tarija

1.3. Justificación

Gracias a la tendencia mundial del consumo hacia lo natural y orgánico, empresas, grupos de investigación y los mismos gobiernos, se han esforzado en el desarrollo de nuevos aditivos naturales de acuerdo con la diversidad de cada zona, se pueden extraer de frutos, hojas, tallos y flores. Todo con el fin de innovar en los procedimientos que reduzcan el impacto ambiental y los daños en la salud humana que se presentan debido a la cantidad de productos químicos contenidos en los productos consumidos diariamente por el hombre. (Gaviria Mejía & Mejía, 2012)

Aprovechando la gran importancia a nivel mundial de Arándano, la incursión del cultivo en Tarija, la demanda por su elevado contenido de Antocianinas y sus propiedades Antioxidantes, se toma en cuenta esta valiosa fruta para la obtención de un producto alto en contenido de las mismas, como es el “Extracto de Antocianinas de Arándano”.

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 (WordPress, 2018), por lo que es necesario desarrollar una técnica para la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano.

Con el presente trabajo de investigación: “Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano” se pretende:

- Presentar al mercado nacional “Colorante Natural de Arándano” como un producto novedoso, que puede remplazar a los colorantes artificiales. Un colorante natural enriquecido de Antioxidantes, Antocianinas y otros compuestos que son beneficiosos para la salud humana.

- Entregar a la industria farmacéutica de Bolivia, un método para la Obtención de Extracto de Antocianinas que actuara como principio activo para el desarrollo de distintos fármacos, que puedan coadyuvar a contrarrestar la cistitis, la diabetes, la

obesidad, el envejecimiento, el cáncer, reducir riesgos cardiovasculares, oculares y neuronales.

- Fortalecer un área productiva de importancia estratégica para la producción agrícola boliviana, presentando otras aplicaciones y potenciales mercados para extractos que se obtienen a partir de materias primas que se cultivan en el país como es el caso de los Arándanos.

- Incentivar la realización de Estudio de Pre-factibilidad y Factibilidad para instalar una “Planta de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano y productos afines en la ciudad de Tarija”.

Es posible obtener extracto de Antocianinas de distintas fuentes naturales, sin embargo, el Extracto de Antocianinas de Arándano a diferencia de otros. Presenta grandes propiedades para la salud humana, debido a los otros componentes polifenoles que contiene el extracto, como principio activo para fármacos y cosméticos.

El extracto contiene ácidos, como el ácido arbutósido que posee un gran poder para combatir las infecciones en el organismo humano, en especial las urinarias. También podemos mencionar el ácido elágico (derivado de la familia de los taninos), sirve para prevenir el daño causado por los rayos UV, lo que reduce la aparición de arruga (Ravazzani, 2014).

Sí hacemos referencia al extracto de Antocianinas de Arándano para utilizarlo como colorante, podemos destacar el aroma y el sabor agradable, además de sus propiedades beneficiosas para la salud, utilizando este colorante para alimentos y bebidas, remplazando a los colorantes artificiales y sintéticos que son nocivos para la salud. (Martínez, 2018).

El Arándano conocido como la súper fruta, es difícil de cultivar porque necesita de tierra, amplitud térmica y otras condiciones específicas. El departamento de Tarija es un lugar óptimo para el cultivo de Arándano, produce entre 200 y 300 toneladas/año de Arándano.

Con el presente proyecto se quiere incentivar a la agroindustria, a crear mayores fuentes de trabajo en cuanto a cultivos y cosechas, además de una mayor producción dada por una mayor demanda de materia prima (Marcal, 2018).

Por lo mencionado, el presente proyecto de investigación, plantea expectativas a una factibilidad aceptable, para la “Obtención Extracto de Antocianinas de Arándano”

CAPÍTULO II

**CONSIDERACIONES DE LA MATERIA
PRIMA Y EL PRODUCTO EXTRACTO DE
ANTOCIANINAS**

II. CAPÍTULO

CONSIDERACIONES DE LA MATERIA PRIMA Y EL PRODUCTO EXTRACTO DE ANTOCIANINAS

2.1. Materia Prima: Arándano

Desde la antigüedad, especialmente en las tribus indígenas americanas, se conoce la existencia de Arándanos como frutos silvestres del bosque, los que eran utilizados para tratar distintas enfermedades (Agrogojar , 2018).

El Arándano es el fruto de una planta arbustiva perteneciente a la familia botánica de las Ericáceas, que crece, de manera silvestre en las regiones frías de Norteamérica y Europa (Muñoz, 1988).

Es un arbusto que, dependiendo de la especie, puede alcanzar alturas dentro de un intervalo de 0,5 a 7 metros. Los menores a un metro, tienen la habilidad de formar colonias extensas, debido a que las raíces rizotomasas emiten brotes vegetativos. Las especies que alcanzan alturas mayores a 1,5 m. Por el contrario, no tienen rizomas, pero la raíz tiene la capacidad de emitir brotes adventicios, por lo que generalmente están desprovistas de un tronco único y forman coronas de brotes múltiples (Muñoz, 1988).

Figura 2- 1: Frutos de Arándano



Fuente: Zapata, 2014

Para el óptimo desarrollo del fruto, el suelo debe contener las condiciones de pH entre 4 -5, requieren de un tiempo frío que oscila entre 800 y 1200 horas. Pudiendo resistir temperaturas extremas de hasta -30 °C en el invierno. Es auto fértil y presenta un período variable de flor a fruto de 30 a 90 días (Muñoz, 1988).

La epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva, lo que tiene gran importancia a la hora de su comercialización. Tiene un sabor dulce y a la vez ligeramente ácido (Muñoz, 1988).

Los frutos verdes tienen aproximadamente un 7% de azúcares y los maduros un 15%. Durante la maduración, se producen cambios en la pared celular que provocan un ablandamiento de los frutos. Esto mejora su sabor, pero los vuelve más vulnerables a los daños físicos y microbiológicos (Muñoz, 1988).

Los Arándanos maduros tienen una vida postcosecha muy corta. Para prolongarla se requiere controlar la temperatura y la humedad de almacenamiento. Así, para la comercialización en fresco no deben ser expuestos a temperaturas superiores a 10 °C y, preferiblemente, deben almacenarse entre -0,5 y 0 °C con una humedad relativa de 90-95%. En estas condiciones tienen una vida útil de aproximadamente 1 mes (Muñoz, 1988).

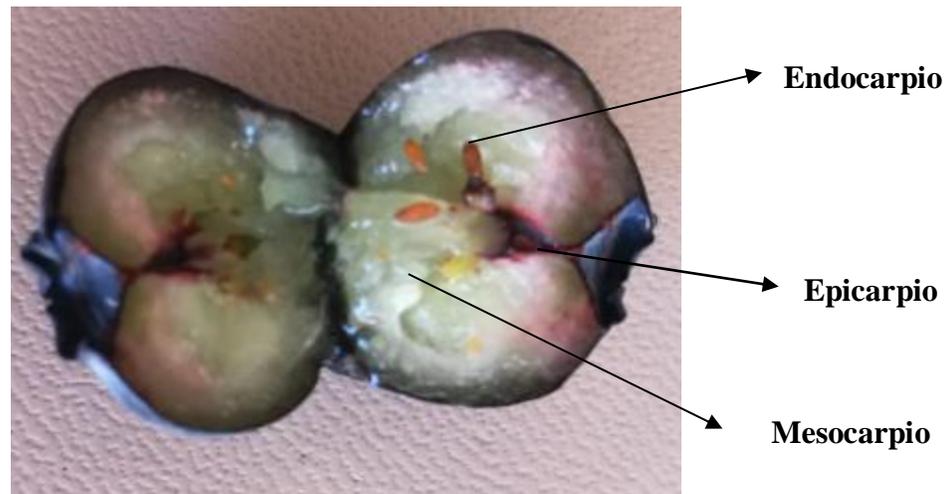
2.1.1. Caracterización Físicoquímica de la Materia Prima: Arándano

El Arándano es una baya esférica con un tamaño aproximado 0.7 cm, llegando a alcanzar tamaños de 1,5 cm de diámetro, presenta un color desde azul claro hasta negro (Muñoz, 1988).

La baya es un fruto carnoso, que suele tener pericarpio grueso y jugoso, en el que generalmente se distinguen tres estratos: epicarpio, mesocarpio y endocarpio. El epicarpio que posee grosor variable y suele contener los pigmentos, el mesocarpio es relativamente grueso, se ubica por debajo del epicarpio y funcionan como mecanismo de soporte en el fruto y el endocarpio que es un estrato interno de naturaleza variable. En términos generales la mayoría de los frutos carnosos se desarrollan a partir de los tejidos del ovario. En las primeras etapas del desarrollo se produce proliferación de

células del pericarpio y almacenamiento de ácidos orgánicos mientras que durante la maduración se acumulan azúcares (Fava, 2012).

Figura 2- 2: Anatomía de la Baya de Arándano



Fuente: Elaboración propia,2018.

En la tabla II-1 se muestran parámetros importantes del Arándano: pH, °Bx, acidez y cantidad de Antocianinas.

Tabla II- 1: Parámetros Importantes del Arándano

Parámetro	Unidad
pH	2.85 – 3.49
Acidez titulable (%) expresado como ácido cítrico	0.40 – 1.31
Sólidos solubles (°Bx)	11.20 – 14.30
Total Antocianinas (mg/100g Arándano)	84.00 – 270.00

Fuente: Angladn, 1994, Sapers, 1984.

En la tabla II-2 se exponen los datos de los componentes principales del Arándano.

Tabla II- 2: Composición del Arándano

Componente	Contenido del componente en las bayas de Arándano (mg/100g)	Componente	Contenido del componente en las bayas de Arándano (mg/100g)
Proteínas	700	Zinc	0,11
Grasas	370	Cobre	0,06
Carbohidratos	14000	Magnesio	0,27
Fibras	1300	Tiamina	13
Calcio	6	Rivoflamina	0,05
Hierro	0,16	Niacina	0,05
Magnesio	4,7	Ácido pantoténico	0,35
Fósforo	10	Vitamina B	0,09
Potasio	86	Ácido fólico	6,2
Sodio	6	Vitamina A	0,029

Fuente: Nunes, 2008; Pritts y Hancock, 1992.

A continuación se da a conocer las características químicas del Arándano:

Tabla II- 3: Características Químicas en % del Arándano

Componentes	Cantidad % (en peso)
Humedad	84.6
Proteína	0.6
Grasa	0.6
Ceniza	0.3
Azúcares	6.0
Fibra dietética total	4.9
Ácidos orgánicos	1.4
Otros	1.6

Fuente: Senser y Scherz, 1999.

2.1.2. Propiedades del Arándano

Según estudios realizados, el Arándano es considerado una fruta con alto valor nutricional, dado que contiene una variedad de principios activos de los que podemos mencionar: Taninos, azúcares, vitaminas B1 y C, Antocianinas, ácidos orgánicos, ácido ursólico y oleanólico, arbutósido y alcaloides, como la mirtilina, en las hojas.; que tienen propiedades como; antiséptico urinario, antidiarreico antihemorrágico, astringente, hipoglucemiante, antiinflamatorio, diurético, antifungicida y vasoprotector. (Rosa Elena Dueñas. S.A. De C.V.)

Por la acción del arbutósido, el Arándano resulta muy eficaz como desinfectante urinario, como tratar la cistitis y otras infecciones de las vías urinarias. Produce acidez

en la orina, previniendo así la formación de piedras de fosfato cálcico, de las que favorece su expulsión. Facilita la pérdida de toxinas, por lo que tiene un efecto depurativo sobre el organismo. Se ha demostrado así mismo su capacidad para reducir los niveles de azúcar en sangre y orina, lo que explica su uso en el tratamiento de la diabetes. Algunos investigadores consideran que la mirtilina, componente extraído de las hojas, tienen alguna de las ventajas de la insulina y no inconvenientes por lo que puede usarse como insulina vegetal. (Rosa Elena Dueñas. S.A. De C.V.)

En el siguiente cuadro se pueden observar algunos de los beneficios de los componentes de este fruto.

Tabla II- 4: Propiedades Asociadas a los Principios Activos del Arándano

Principio Activo	Propiedades Asociadas
Antocianinas	Antioxidante, reductor de riesgos cardiovasculares, envejecimiento y cáncer
Vitaminas B1 y C	Potencia el sistema inmunológico y reducir cuadros de anemia
Glucósidos (mirtilinas)	Optimiza sobre la salud visual, ayuda a prevenir el avance de cataratas.
Taninos	Astringentes (coagulan el protoplasma celular), vasoconstrictora, hemostática, antibiótica, antiviral y antifúngica, antiinflamatoria intestinal y antidiarreico, antisépticas y tonificantes.
Ácido ursólico, oleanólico, arbutósido.	Impiden la reproducción de bacterias (Bacteriostáticos) previniendo infecciones urinarias, inflamaciones gastrointestinales, gastroenteritis y enfermedades en las encías, la cistitis.

Fuente: Elaboración propia a partir de Jijena, 2017.

2.1.3. Clasificación del Arándano

El Arándano pertenece al género *Vaccinium* de la familia de las Ericáceas. Existen más de 30 especies que constituyen el género *Vaccinium*, entre las más importantes se encuentran:

Tabla II- 5: Especies de Arándano Pertenecientes al Género *Vaccinium*

Nombre común	Nombre científico	Tipo de cultivo
Arándano alto (Highbush)	<i>Vaccinium corymbosum</i> L.	Cultivado
Arándano ojo de conejo (Rabbiteye)	<i>Vaccinium aashei</i> Reade	Cultivado
Arándano bajo (Lowbush)	<i>Vaccinium angustifolium</i>	Silvestre
Arándana (Cranberry)	<i>Vaccinium Macrocarpon</i>	Silvestre
Arándano europeo (Bilberry)	<i>Vaccinium myrtillus</i>	Silvestre

Fuente: Muñoz, 1999

Las especies mencionadas en la tabla II-5, son las de más importancia comercial del género *Vaccinium*.

2.1.3.1. Arándano Alto (Highbush)

Fue la primera especie que se introdujo en el cultivo, originario de la costa este de América del Norte, puede alcanzar alturas de hasta 2.5 m. Este tipo de Arándano fue sometido a varios procesos de mejoramiento genético, obteniendo así 50 variedades

diferentes, siendo así el tipo de Arándano de mejor calidad en cuanto a tamaño y sabor (Muñoz, 1999).

Figura 2- 3: Arbusto de Arándano Highbush



Fuente: Clarín, 2017.

2.1.3.2. Arándano “Ojo de Conejo” (Rabbiteye)

Es el tipo de Arándano con la domesticación más reciente, originaria del Sur de América, puede alcanzar alturas de hasta 4 m. Se puede destacar que esta clase tiene una tolerancia a un pH de suelo más alto, mayor resistencia a la sequía y una mayor producción y mejor conserva del fruto luego de la cosecha. (Muñoz, 1999).

Figura 2- 4: Arbusto de Arándano Rabbiteye



Fuente: González, 2009.

2.1.3.3. Arándano Bajo (Lowbush)

Es una especie silvestre originaria del norte de Europa y del sur de Canadá, su fruto es recolectado de los lugares en los que crece de manera natural. El fruto es pequeño, pero es requerido en la industria por conservar su sabor y aroma (Muñoz, 1999).

Figura 2- 5: Arbusto de Arándano Lowbush



Fuente: González, 2009.

2.1.3.4. Vaccinium Macrocarpon o Cranberry

También conocido como Arándano rojo, es un arbusto que su altura ronda entre los 10 y 20 cm, nativo de Estados Unidos donde es utilizado en la elaboración de jugos, jaleas y mermeladas (Muñoz, 1999).

Figura 2- 6: Arbusto de Arándano Cranberry



Fuente: Acosta, 2015.

2.1.3.5. Arándano Europeo (Bilberry)

Especie perteneciente del este y norte de Europa asociado principalmente a bosques de coníferas. Mide aproximadamente hasta 1 m de altura, la baya es de color negro azulado profundo. (Ebay, 2018)

Figura 2- 7: Arbusto de Arándano Bilberry



Fuente: Ebay, 2018

2.1.4. Producción de Arándano

A nivel mundial, Canadá y Estados Unidos son los principales productores de Arándano ocupando un 95% de la producción mundial entre ambos países, datos que se ven reflejados en la siguiente tabla publicada por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO).

Tabla II- 6: Producción Mundial de Arándano

Países	Producción (toneladas)
Estados Unidos	239.071
Canadá	109.007
Polonia	12.731
Alemania	10.277
México	10.160
Francia	9.011
Países Bajos	5.498
España	5.000
Suecia	2.888
Nueva Zelanda	2.718

Fuente: FAO, 2013

El Arándano es cultivado en Sudamérica con mayor predominación en Chile, Argentina y Uruguay, donde está ganando gran importancia por el extraordinario nivel de compuestos antioxidantes y su potencial beneficio para la salud que, según estudios pueden ser mejores que los norteamericanos (AméricaEconomía.com, 2010)

En Bolivia no era conocida la producción de Arándanos, dado que es un fruto de zonas frías; a partir del año 2010 se inicia con una producción en la zona de Entre Ríos, municipio de O'Connor, perteneciente al departamento de Tarija, con el tipo de Arándano "Ojo de conejo" (Rabbiteye). (Jijena, 2017).

El Arándano gana campo en el mercado nacional, especialmente en los departamentos de La Paz, Cochabamba y Santa Cruz. El mismo se cultiva en distintas zonas del departamento de Tarija como muestra la siguiente tabla:

Tabla II- 7: Superficie de Arándanos Cultivada en Tarija

Zona	Localidad	Superficie de Cultivo(ha)
Valle Central de Tarija	Canasmoro, Tomatas Grande, Tolomosa, La Victoria, Coimata, San Lorenzo, Turumayo, Valle de La Concepción	3.6
Provincia O'Connor	Entre Ríos	14
Total		17,6

Fuente: Sergio Martínez, 2017

La producción que se obtiene por hectárea cultivada de Arándano es de 6 a 8 toneladas.

La cosecha del arándano en estas regiones se realiza dos veces al año, entre los meses de octubre a diciembre y de abril a mayo (Rocha, 2017).

2.1.4.1. Arándanos en el Valle Central de Tarija

En el Valle Central de Tarija, se cultiva distintas variedades de Arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.) también, conocido por su nombre común como Highbush (Martínez, 2018).

La altitud en la que se encuentran el Valle Central de Tarija, es 2000 msnm, provoca una mejor atracción solar y óptima amplitud térmica que se encuentra en el intervalo de -9 a 35 °C, estas variables consienten deducir que el Arándano del Valle Central de Tarija es de mayor calidad y posee mayores propiedades que otros (Marcal, 2018)

Entre las variedades más cultivadas se encuentran:

- **O'Neal:** Que requiere de 200 a 300 h de frío/año y se ha adaptado bien a las condiciones de los valles; la fruta es grande, azul claro y de excelente calidad. La planta es vigorosa y de hábito de crecimiento erecto, crece hasta 1,8 m. (Muñoz, 1999).
- **Misty:** Tiene un requerimiento de 150 a 300 h de frío/año, su fruto es pequeño azul claro, firme y de excelente sabor. Produce fruta muy temprano y puede tener una segunda cosecha de menor cantidad durante el otoño. La planta tiene un hábito de crecimiento arbustivo y requiere un manejo de poda para evitar sobreproducción. (Muñoz, 1999).

Para efectuar la cosecha del Arándano se requiere una mano de obra considerable, la misma se realiza manualmente, pues la fruta una vez madura es muy delicada. A la hora de la cosecha se debe tener especial cuidado al desprender la fruta de la planta para evitar producirle daño al epicarpio (piel) del fruto. La fruta madura presenta una serosidad (pruina) lo cual es una característica de calidad y por ende debe evitarse ser removida, lo que implica cierto cuidado en la recolección (Gordó, 2011).

Figura 2- 8: Cultivo de Arándano en el Valle Central de Tarija-Turumayo



Fuente: Elaboración propia, 2018.

El precio de Arándano en el Valle Central de Tarija oscila entre 80 – 90 Bs por cada 1Kg de Arándano, es vendido en envases de polietilentereftalato (clamshells), fácil de encontrar en el mercado local.

Figura 2- 9: Arándanos Envasados para su Respectiva Venta



Fuente: Elaboración propia, 2018.

2.2. Extracto de Antocianinas de Arándano

El “Extracto de Antocianinas de Arándano” (*Vaccinium corymbosum* L.), es una sustancia concentrada en Antocianinas, con olor y sabor característico, que se obtiene del Arándano, de acuerdo a su obtención es llamado por distintos nombres. Extracto etanólico, si es obtenido por maceración o lixiviación en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar componentes no deseados y así mejorar notablemente la calidad del producto. (Gonzalez Villa, 2004).

El Extracto de Antocianinas de Arándano es colorante potencial para poder remplazar a los colorantes artificiales y sintéticos, siendo posible su aplicación en la industria de alimentos y bebidas.

El extracto posee principios biológicos que pueden ser utilizados como base de fármacos y cosméticos.

2.2.1. Caracterización Físicoquímica del Producto: Extracto de Antocianinas de Arándano

Las Antocianinas según Reglamento Europeo no 1129/2011, son identificadas como E 163 colorante y aditivo alimentario, de gran poder antioxidante. Sin embargo, no cuenta con parámetros que puedan caracterizarlas, por este motivo se toma en cuenta datos bibliográficos de estudio anteriores, para la caracterización del producto. (Diario Oficial de la Unión Europea, 2011).

Estudios realizados en la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano (Zapata Luz, 2014) muestran en cada 100 mL de extracto tiene un contenido de $137,2 \pm 7.5$ mg de Antocianinas, las que son identificadas en la siguiente tabla:

Tabla II- 8 Contenido Porcentual de las Distintas Antocianinas que posee el Extracto

Identificación de antocianina	Porcentaje de Antocianinas (%)
Delfinidina-3-galactósido	2,7
Delfinidina-3-glucósido	6,8
Cianidina-3-galactósido	22
Cianidina-3-glucósido	1,0
Cianidina-3-arabinósido	0,3
Peonidina-3-galactósido	21
Malvinidina-3-glucósido	6,4
Peonidina-3-galactósido	1
Otras	38,8

Fuente: Zapata, 2014

Tabla II- 9: Resultado de Análisis en el Extracto de Antocianinas de Arándano

Análisis	Concentración (mg/100g)
Fenoles Totales	1424 ± 67
Actividad antioxidante	4872 ± 124

Fuente: Zapata, 2014

En la tabla II-9 se muestran los resultados de análisis realizados en el Extracto de Arándanos, donde la mediación de la actividad antioxidante se realiza a través del método DPPH.

Tabla II- 10: Composición mineral en el Extracto de Antocianinas de Arándano

Mineral	Concentración (mg/100 mL)
Calcio	3,86±0,11
Hierro	0,29±0
Magnesio	0,69±0,01
Potasio	47,25±2,33
Sodio	2,22±0,11
Zinc	0,15±0,01

Fuente: Zapata, 2014

En la tabla II-10 se muestran los principales minerales y sus respectivas concentraciones en el Extracto de Antocianinas de Arándano.

CAPÍTULO III
MARCO TEÓRICO

III. CAPÍTULO

MARCO TEÓRICO

3.1. Definición de Antocianinas

Las Antocianinas son flavonoides que forman parte de los compuestos fenólicos, sales de benzopirilio (o flavilio) oxhidriladas. Son glucósidos que, por hidrólisis, producen azúcares y aglucones coloreados que se denominan antocianidinas (Fieser F. y Mary, 1966).

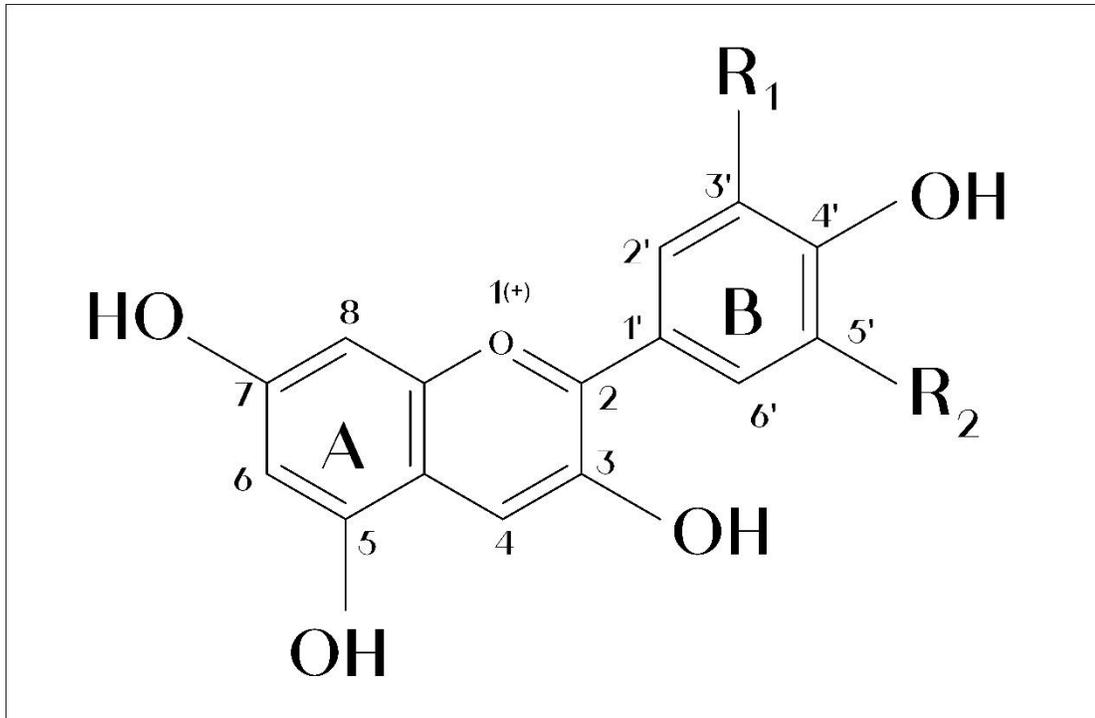
3.1.1. Estructura Química de las Antocianinas:

Como miembro de la familia de los flavonoides posee un esqueleto básico C₆-C₃-C₆. En la naturaleza, es casi imposible encontrar antocianidinas debido a su baja estabilidad, sin embargo, predominan las Antocianinas formando heterósidos, cuyo aglicón, derivado del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio, está hidroxilado en las posiciones 3, 5 y 7 y metoxilado en diferentes posiciones. (Prior RL and Wu X, 2006).

El aglicón está unido a una o varias moléculas de azúcar, las cuales pueden estar aciladas con diferentes ácidos orgánicos. Los hidroxilos y azúcares presentes en la molécula le confieren la propiedad de ser solubles en agua, alcoholes y acetona. Los azúcares más habituales unidos a las antocianidinas son la glucosa, galactosa, ramnosa, arabinosa, xilosa y fructosa. Además, son frecuentes los disacáridos como rutinosa, soforosa y sambubiosa o los trisacáridos como 2-xilosilrutinosa y glucurosilrutinosa (Brouillard, 1982). Los ácidos que pueden unirse a la molécula son los hidroxicinámicos, hidroxibenzoicos, acético y algunos acilados alifáticos dicarboxílicos, como el málico, malónico, oxálico y succínico. La antocianina es un híbrido de resonancia, donde la carga positiva está deslocalizada por todo el heterociclo aromático, dando lugar a un catión oxonio heteroaromático, en el que la mayor densidad relativa de carga positiva se localiza en los carbonos C₂ y C₄. Hay unas 17 antocianidinas identificadas en la naturaleza, de las cuales seis, pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina están ampliamente distribuidas en los alimentos (Hidalgo Jerez, 2012).

El color de las Antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Incrementos en la hidroxilación producen desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que incrementos en las metoxilaciones producen coloraciones rojas (Hidalgo Jerez, 2012).

Figura 3- 1: Estructura Básica de las Antocianinas



Fuente: Garzón, 2008

Variaciones estructurales del anillo B (Figura 3-1.) producen las seis antocianidinas mostradas en la tabla III-1:

Tabla III- 1 Principales Sustituyentes de las Antocianina

Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) Espectro visible
	R ₁	R ₂	
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	H	506(naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508(azul-rojo)

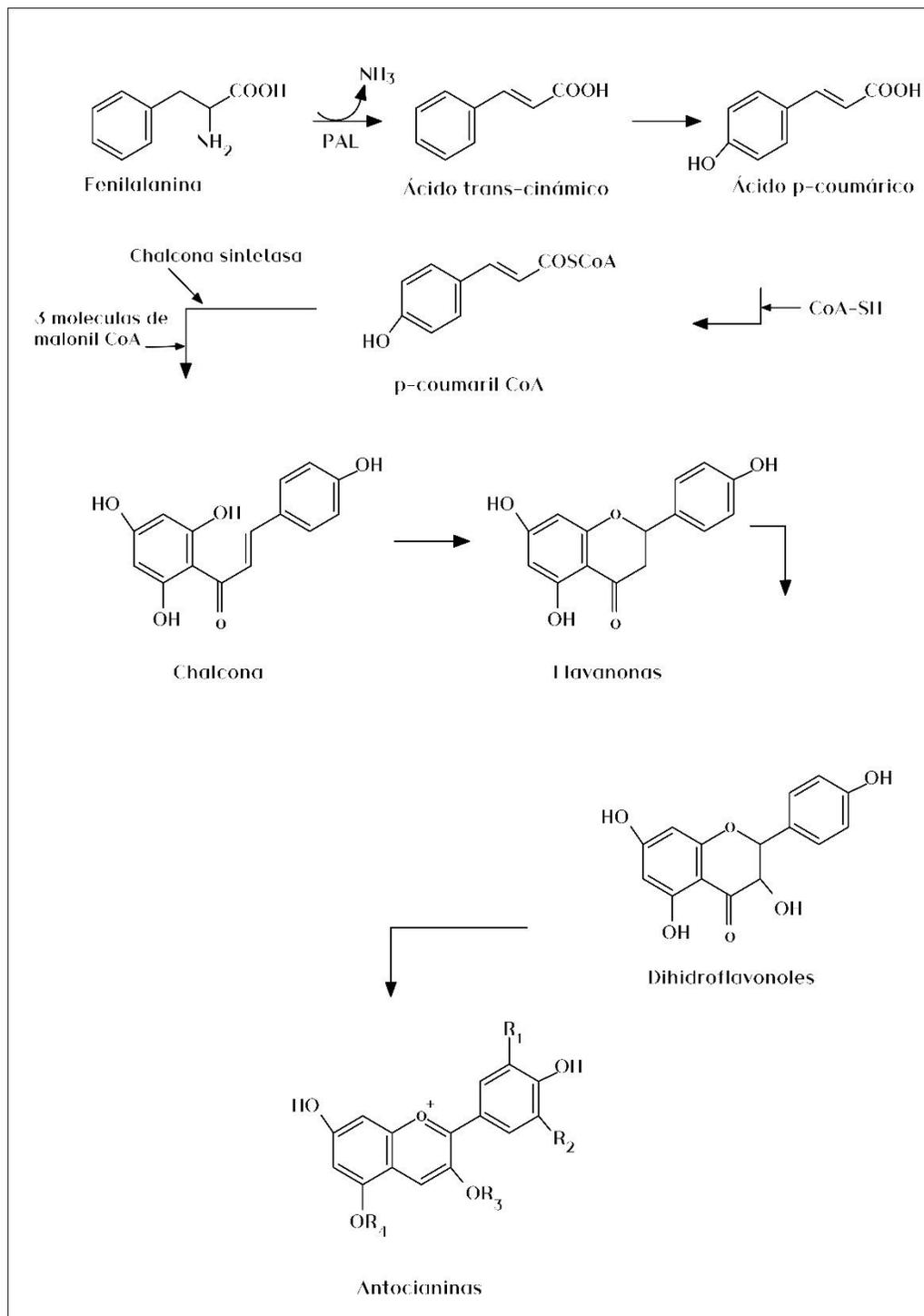
Aglicona	Substitución		$\lambda_{\text{máx}}$ (nm) Espectro visible
	R ₁	R ₂	
Peonidina	OCH ₃	H	506(naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508(azul-rojo)
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	510(azul-rojo)

Fuente: Garzón, 2008.

3.1.2. Biosíntesis de las Antocianinas

Se ha establecido experimentalmente que al anillo A de las Antocianinas se sintetiza por la ruta del ácido malónico con la condensación de tres moléculas de malonil-CoA, mientras que el anillo B se sintetiza por la ruta de ácido shikímico (Garzón G. A., 2008). El ácido shikímico da paso a la fenilalanina que por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de NH₃ se convierte en ácido p-coumárico. El p-coumaril-CoA luego participa en una reacción de condensación con las tres moléculas de malonil-CoA para formar una chalcona de 15 C, reacción propiciada por una chalcona sintetasa (Garzón G. A., 2008). Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona en una reacción catalizada por una chalcona isomerasa. Finalmente, la flavanona es transformada en la correspondiente antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación (Fig. 3-2). La molécula de antocianidina se estabiliza por glicosilación del heterociclo; reacción en la que interviene una glicosil transferasa y posterior posibles reacciones de metilación de los hidroxilos seguidas de acilaciones. (Garzón G. A., 2008).

Figura 3- 2: Ruta General de Biosíntesis de las Antocianinas

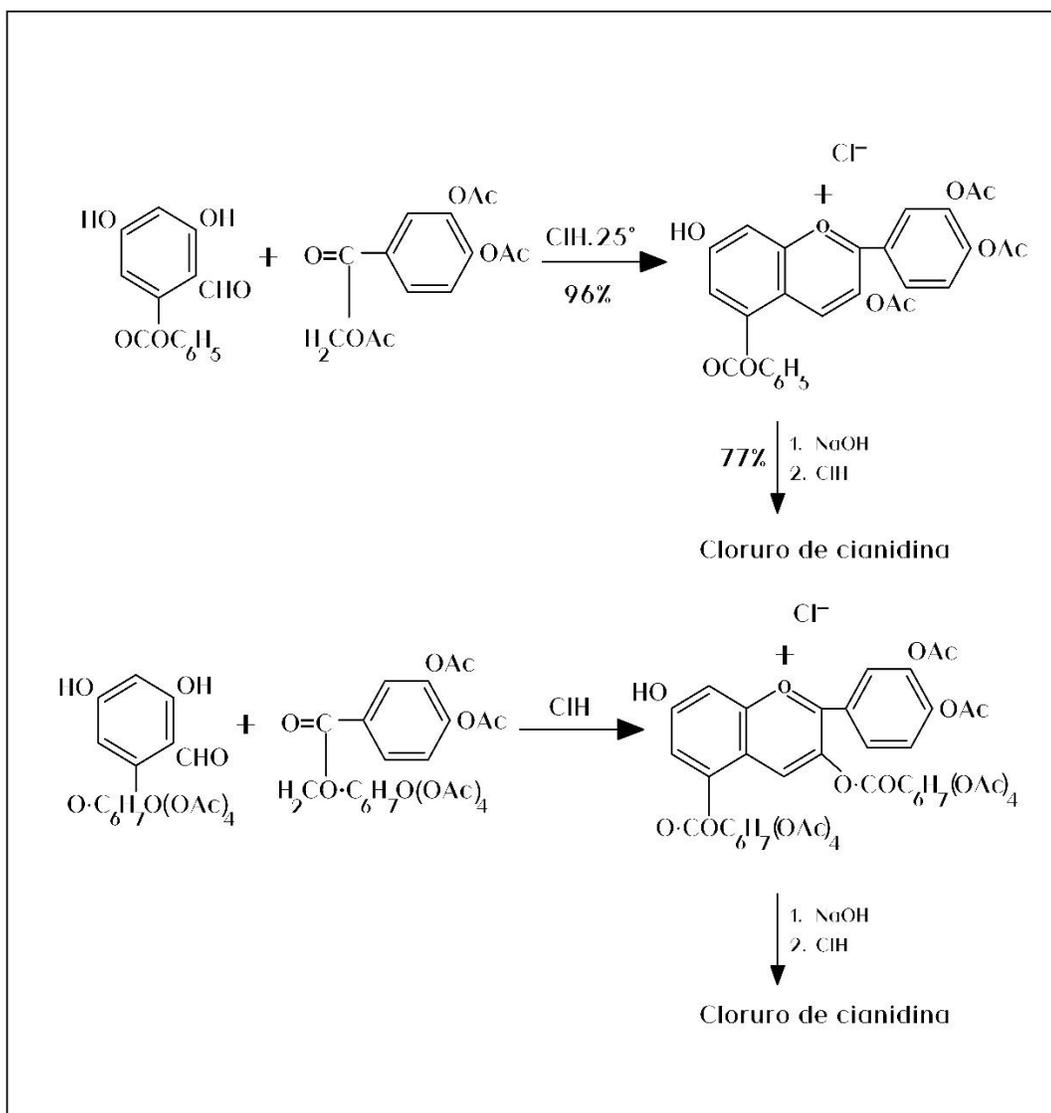


Fuente: Delgado-Vargas, 2000.

3.1.3. Síntesis Química de Antocianidinas

Robinson desarrolló la síntesis de varios tipos de antocianidinas y glucósidos naturales. El método consiste en condensar un o-oxibenzaldehído sustituido con un derivado de la ω-oxiacetofenona, según lo que se describe en la figura 3-3. (Fieser F. & Mary, 1966).

Figura 3- 3: Síntesis de Robinson de Antocianidinas



Fuente: Fieser F. y Mary, 1966

3.1.4. Principales Factores que Afectan la Estabilidad de las Antocianinas

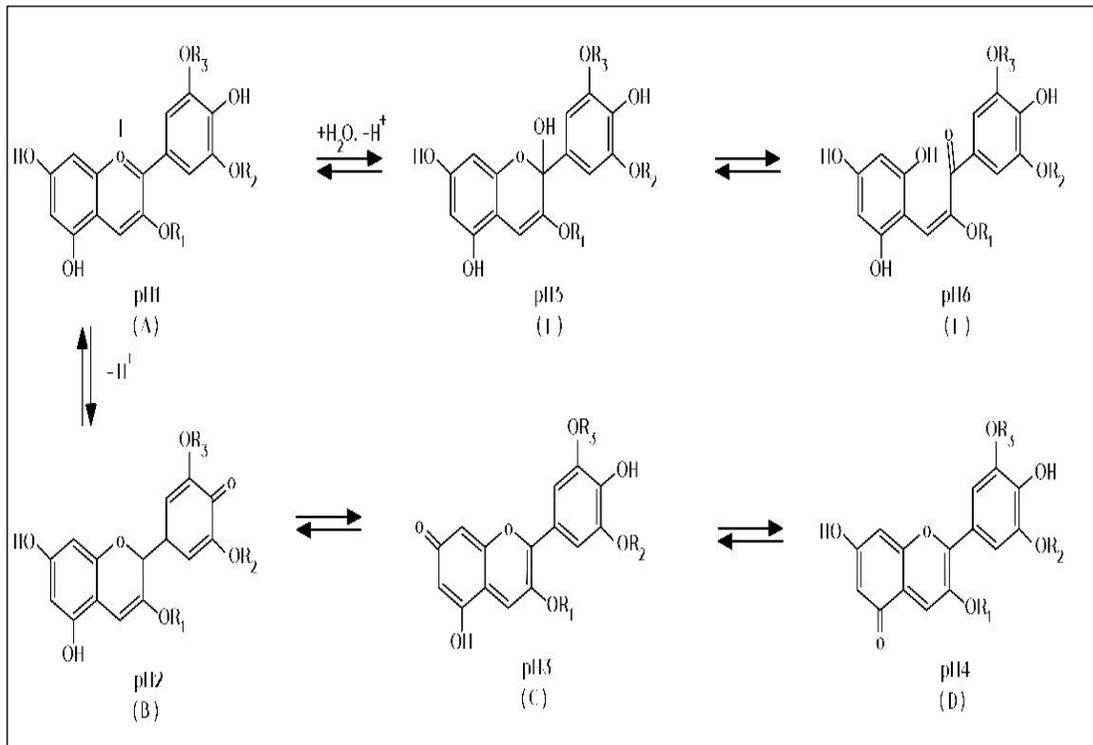
Existen diversos factores que influyen en la estabilidad de las Antocianinas. La estructura de éstas puede verse afectada en cualquier etapa de un proceso tecnológico, como por ejemplo un proceso de extracción de Antocianinas de un material vegetal, como así también durante un tratamiento térmico o durante el almacenamiento de un producto que las contiene (Moldovan et al., 2012; Castañeda-Ovando et al., 2009a; Garzón, 2008). Los factores más relevantes que afectan a la estabilidad de las Antocianinas son:

3.1.4.1. El pH

Las Antocianinas pueden encontrarse en diferentes formas químicas dependiendo del pH, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad (Figura 3-4). A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las Antocianinas (Figura 3-4 A). A valores de pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las Antocianinas preferentemente bajo las formas quinodales (Figura 3-4 B, C y D) de color azul.

A pH entre 5 y 6 se observan las especies pseudobase carbinol, que es incolora (Figura 3-4. E), y chalcona, de color amarillo (Figura 3-4.F), ambas bastante inestables. A pH superiores a 7 se produce la degradación rápida de las Antocianinas por oxidación con el aire. Esta reacción se ve afectada, además del pH, por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B (Moldovan et al., 2012; Castañeda-Ovando et al., 2009a; Garzón, 2008).

Figura 3- 4: Estructura de las Antocianinas a Diferentes Valores de pH



Fuente: Castañeda-Ovando, 2009

En la figura 3-4, R₁=H o glúcido, R₂ y R₃=H o metilo.

3.1.4.2. La Temperatura

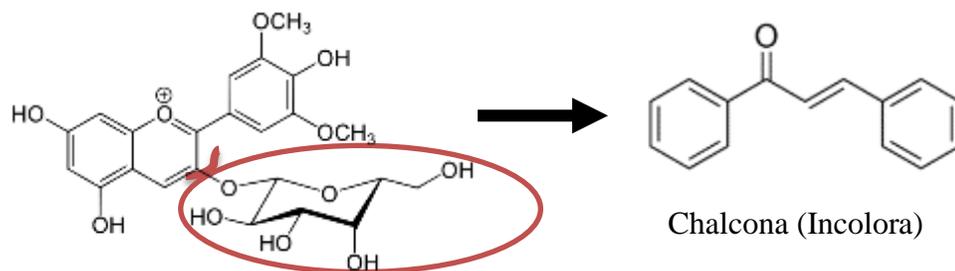
La temperatura es uno de los factores críticos que influyen en la degradación de Antocianinas. Las conversiones estructurales de las Antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien procesos térmicos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo.

Por efecto del calor, a temperaturas por encima de los 60°C, se degradan según una cinética de primer orden.

En general las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica.

Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo (Figura 3-5), con la consecuente producción de chalconas incoloras (Zapata, 2014).

Figura 3- 5: Formación de Chalconas por Pérdida Azúcar Glicosilante



Fuente: Elaboración Propia, 2018.

En la figura 3-5, Malvidina 3-galactosida pierde su azúcar glicosilante, provocando que se abra el anillo formando chalconas.

3.1.4.3. Agua

El agua puede actuar como nucleófilo y atacar el catión flavilio en el C-2 formando la base carbinol incolora. Sin embargo, esta degradación puede variar, dependiendo de la concentración de azúcares o con el fenómeno denominado copigmentación. Cuando los azúcares se encuentran a altas concentraciones, la actividad de agua es baja, por lo que las moléculas de agua tienen menores posibilidades de atacar el catión flavilio para formar la base carbinol. Sin embargo, cuando los azúcares están en bajas concentraciones la actividad de agua no se ve afectada, por lo que sus productos de degradación (hidroximetilfurfural y furfural) aceleran la degradación de las Antocianinas (Kopjar y Piližota, 2009; Lewis y Walker, 1995).

Dado que la molécula de agua interviene en reacciones que deterioran las antocianinas, resulta conveniente su eliminación para disminuir las probabilidades de ataque nucleofílico al catión flavilio (Zapata, 2014).

3.1.4.4. Luz

La luz es un factor que acelera la degradación de las Antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en el C-5 hace que la Antocianina sea más susceptible

a la fotodegradación cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiadas, isoflavonas y auronas sulfonadas (Delgado-Vargas et al., 2000).

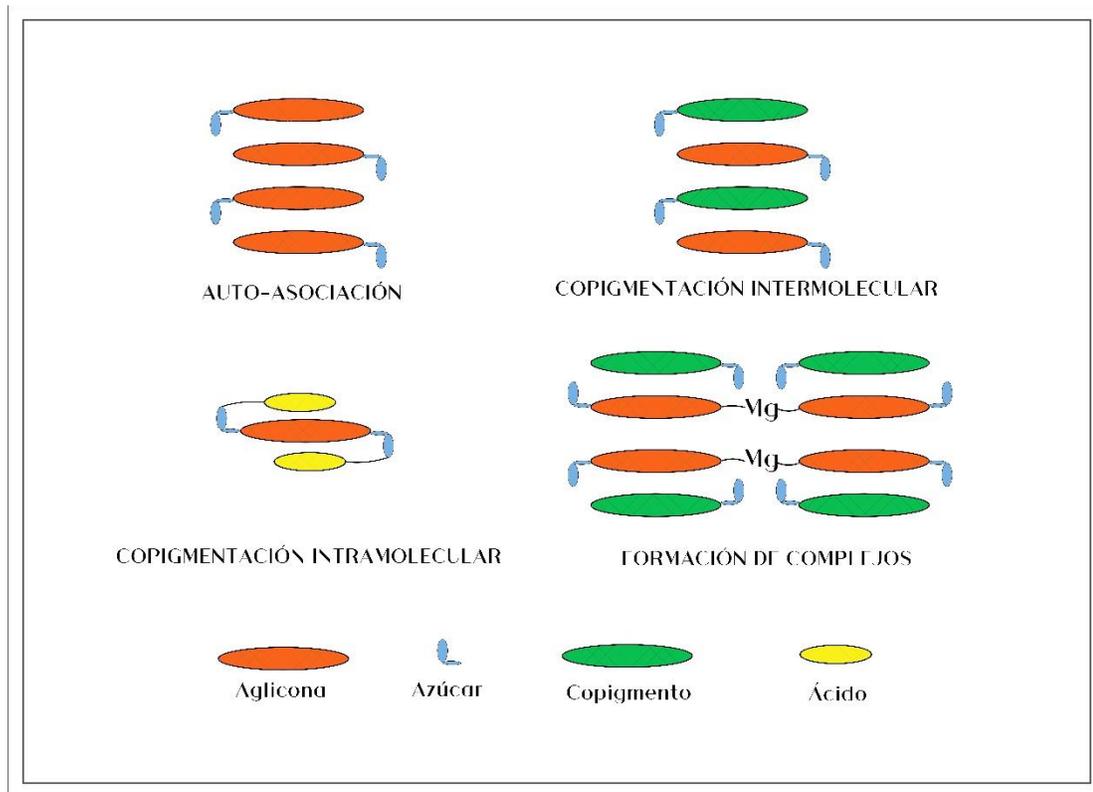
3.1.4.5. Oxígeno

Las Antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta en la que éstas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También, pueden reaccionar con radicales de oxígeno actuando como antioxidantes (Fennema, 2000). Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura. Además se ha observado que en presencia de oxígeno, el ácido ascórbico destruye a las antocianinas, formando peróxido de hidrógeno. Esta reacción se acelera en presencia de cobre y es inhibida en presencia de flavonoles como la quercetina. El peróxido de hidrógeno actúa rompiendo el anillo de pirilio de la antocianina por un ataque nucleofílico en C-2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina. Estos productos de degradación son totalmente destruidos y polimerizados para formar precipitados de color café (Fennema, 2000).

3.1.4.6. Copigmentación

La copigmentación es un fenómeno que se da por la interacción hidrófoba entre los núcleos aromáticos de las Antocianinas agrupadas (Figura 3-6), en donde una de las consecuencias de este estado es la intensificación del color, lo que mejora las perspectivas de la utilización de Antocianinas como colorantes naturales en alimentos. (Santacruz Cifuentes, 2011)

Figura 3- 6: Interacciones de Copigmentación de las Antocianinas



Fuente: Giusti, M. M. 2003

3.1.5. Beneficios de las Antocianinas

Los principales beneficios respecto: a la salud humana de las Antocianinas son atribuidos en su mayoría a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y más recientemente a su papel regulador en vías de señalización celular y de expresión génica (He J and Giusti MM, 2010). Las Antocianinas presentan distintas propiedades mencionadas a continuación:

3.1.5.1. Propiedades Anticancerígenas de las Antocianinas

Estudios in vitro sugieren que la actividad anticancerígena de las Antocianinas se debe a sus propiedades antiproliferativas, prooxidantes y apoptóticas, así como a su capacidad de regular la expresión génica. Se ha demostrado, por ejemplo, inhibición de la proliferación celular con extracto de frambuesas y vino en células hepáticas y en adenocarcinoma humano. Además, el extracto de frambuesa es capaz de inhibir la

iniciación de la angiogénesis evitando la proliferación en el endotelio (Hidalgo Jerez, 2012)

3.1.5.2. Propiedades Antimicrobiana y Antiviral de las Antocianinas

Estudios realizados en patógenos con extractos de Arándanos han mostrado efecto antimicrobiano en algunas de las bacterias más ubicuas en alimentos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (Caillet S, Côté J, Sylvain JF and Lacroix M, 2012)

Otros autores han observado que *Helicobacter pilory* y *Bacillus cereus* son las bacterias más sensibles al efecto de las bayas. Respecto a las propiedades antivirales, la cianidina glicosilada presenta actividad frente al virus del herpes (Hidalgo Jerez, 2012).

3.1.5.3. Propiedades Neuronales de las Antocianinas

Las Antocianinas pueden atravesar la barrera encefálica y distribuirse en el sistema nervioso donde merman el daño oxidativo implicado en enfermedades como el Parkinson o el Alzheimer. El consumo de bayas de Arándano mejora la función cerebral por su implicación en la inhibición neuroinflamatoria y en la modulación de señales neuronales cuyo resultado es la mejora cognitiva y de memoria (Hidalgo Jerez, 2012)

3.1.5.4. Propiedades Oculares de las Antocianinas

Algunos estudios han encontrado altas concentraciones de Antocianinas (700 pg/g) en el tejido ocular mostrando actividad antioxidante en la retina. Las investigaciones llevadas a cabo en animales alimentados con extractos de Arándano o mora han demostrado la disminución de cataratas, así como una mejora en la adaptación nocturna, disminución moderada de miopía, reducción de fatiga ocular y mejora en la presión sanguínea de la retina en ojos con glaucoma (Hidalgo Jerez, 2012).

3.1.5.5. Propiedades en la Diabetes y Obesidad de las Antocianinas

El consumo de extracto de fresa en adultos con sobrepeso se asocia con una reducción inflamatoria postprandial del tejido adiposo, con una mayor sensibilidad de la insulina

(Hidalgo Jerez, 2012). La prevención de la obesidad y la disminución de hiperlipidemia e hiperglucemia se relacionan con el consumo de Antocianinas en ratas. Es bien conocido que las Antocianinas protegen del estrés oxidativo inducido por glucosa en las células β del páncreas. Estudios realizados por Jayaprakasam et al. (2005), observaron que los glucósidos de cianidina, delphinidina y pelargonidina mejoran la secreción de insulina en ratones indicando que los hidroxilos en el anillo B (Figura 4-10) tienen efecto secretagogo (Hidalgo Jerez, 2012)

3.1.6. Propiedades Antioxidantes de las Antocianinas

La actividad antioxidante de las Antocianinas radica en el hecho de que pueden reaccionar con radicales libres. Estos últimos, entre los que se encuentran los radicales OH^- (hidroxilo) y O_2^- (superóxido), son capaces de atacar a proteínas, carbohidratos, grasas y ADN del cuerpo, ejerciendo un efecto oxidativo que daña las células (Zapata, 2014).

Así, cuando un radical reacciona con una molécula, la molécula resultante de esta reacción se convierte en un nuevo radical libre, originándose una reacción en cadena, que provoca un daño en los tejidos, que a su vez, derivan en enfermedades degenerativas disminuyendo la calidad de vida. Esta acción oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias denominadas antioxidantes. Se llama antioxidante a cualquier sustancia que retarda, previene o elimina el daño oxidativo hacia una molécula o bien, a la capacidad que tienen determinados compuestos para neutralizar los radicales libres. Las Antocianinas se caracterizan por tener una deficiencia de electrones, debido a su particular estructura química, que las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo, por consiguiente, pueden ser potentes antioxidantes naturales (Zapata, 2014).

Las propiedades atribuidas a las Antocianinas para mejorar la salud están asociadas a esta capacidad de actuar como antioxidantes y secuestrar radicales libres en sistemas biológicos. Pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Se demostró que los frutos ricos en Antocianinas evidencian una alta actividad antioxidante contra el peróxido de

hidrógeno (H_2O_2) y contra radicales peróxido, (ROO^-), superóxido (O_2^-), hidroxilo (OH^-) y oxígeno singlete (O_2). (Zapata, 2014)

3.2. Definición de Extracción

La extracción es una operación disfuncional que implica la disolución de un soluto en un solvente.

Se considera que el método a emplearse en la extracción está determinado por tres factores:

- Cantidad de constituyentes solubles en el material.
- Naturaleza del sólido que depende del tamaño de partículas.
- Distribución de sólidos solubles en el material.

En un proceso de extracción se toma en consideración tres etapas (Zapata, 1978):

- Cambio de fase del soluto al solvente.
- Difusión del solvente a través del sólido hacia el exterior.
- Contacto del solvente con las partículas del soluto, esto es en la masa de la solución.

La primera etapa ocurre tan rápido por lo que sus efectos son despreciables respecto a la extracción total. En las células vegetales, específicamente los pigmentos, el material soluble se encuentra en el interior de la pared celular en los plastidios, por lo que se hace necesario romper la pared por efecto de una presión mecánica u osmótica que permita al contenido fluir al exterior (Zapata, 1978).

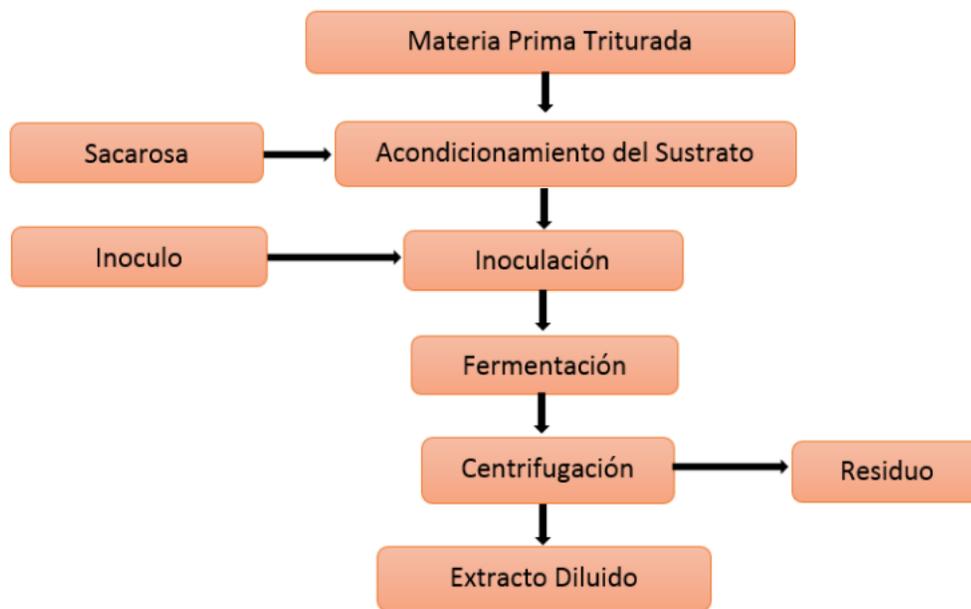
3.2.1. Métodos de Extracción Aplicables a la Investigación

Los métodos de extracción aplicables a la investigación son: Extracción por Fermentación y Extracción Sólido-Líquido. A continuación, se describe cada uno de ellos:

3.2.1.1. Extracción por Fermentación

La fermentación en medio sólido (FMS) se describe como un bioproceso de gran potencial para la producción de compuestos microbianos tales como combustibles, químicos industriales y compuestos fenólicos con amplias aplicaciones en la industria farmacéutica y alimentaria. Las ventajas que ofrece el empleo de la FMS no sólo son técnicas, debido a la alta especificidad de las reacciones que se llevan a cabo en este tipo de sistema, sino también económicas, ya que permite el uso de residuos vegetales como soporte y fuente de nutrientes para los microorganismos que se emplean en los bioprocesos en FMS (Martínez G., et al, 2013)

Figura 3- 7: Diagrama del Proceso de Fermentación



Fuente: Elaboración propia, 2019.

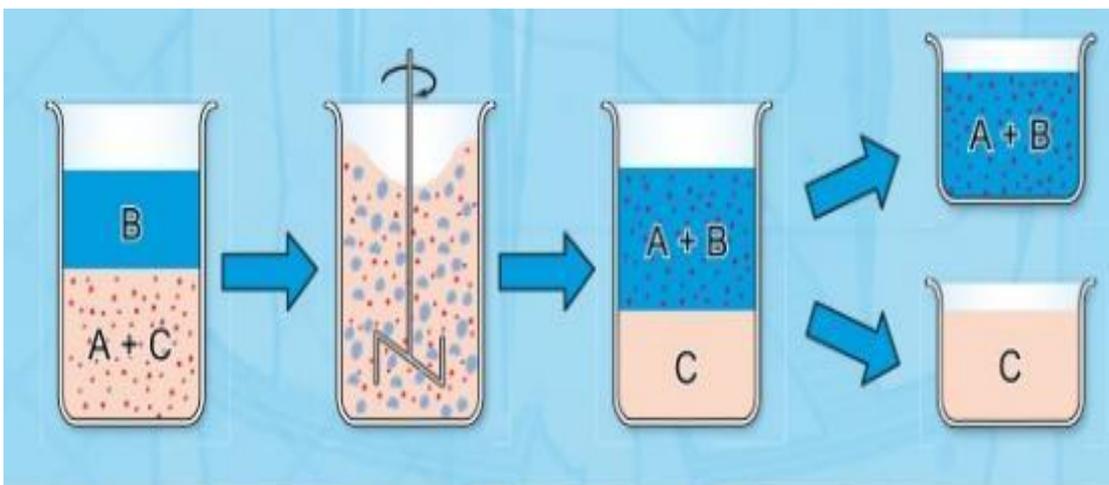
El proceso de Fermentación es resumido en el diagrama de bloques que muestra la figura 3-7.

3.2.1.2. Extracción Sólido - Líquido

La extracción sólida – líquido es una operación básica cuya finalidad es la separación de uno o más componentes contenidos en una fase sólida, mediante la utilización de

una fase líquida o disolvente. El componente o los componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida reciben el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte. La forma en que el soluto esté contenido en el sólido inerte puede ser diversa. Así, puede ser un sólido disperso en el material insoluble o estar recubriendo su superficie. También puede tratarse de un líquido que esté adherido o retenido en el sólido, o bien estar contenido en su estructura molecular. Este tipo de operaciones se lleva a cabo en una sola o múltiples etapas. Una etapa es una unidad de equipo en la que se ponen en contacto las fases durante un tiempo determinado, de forma que se realiza la transferencia de materia entre los componentes de las fases y va aproximándose al equilibrio a medida que transcurre el tiempo. Una vez alcanzado el equilibrio se procede a la separación mecánica de las fases. En realidad es difícil que en una etapa se llegue al equilibrio, por lo que para el cálculo de las etapas reales es preciso definir la eficacia. Para una etapa, es el cociente entre el cambio en la composición que se logra realmente y el que debería haber tenido lugar en una situación de equilibrio bajo las condiciones de trabajo. Las formas de operación utilizadas en los procesos de extracción pueden ser en continuo o en discontinuo. En discontinuo puede utilizarse una etapa simple o bien múltiples etapas con disolvente nuevo en cada etapa o en contracorriente. (Ibarz & Barbosa Cánovas, 2005)

Figura 3- 8: Extracción Sólido-Líquido



Fuente: Química experimental ITESM, 2013

La figura 3-7, representa una extracción ideal sólido-líquido: al mezclar la mezcla de partida (A+B) y el disolvente (B), el soluto (A) pasa por el disolvente.

Tras la decantación se obtienen dos fases: fase extracto (A+B) y el líquido portador (C).

La extracción sólido – líquido recibe distintos nombres según la finalidad del proceso, que se describirán a continuación.

3.2.1.2.1. Extracción por Maceración

Esta extracción es sencilla. Se somete a la disolución del soluto en un solvente, dejando reposar hasta que el solvente penetre en la estructura celular, lo ablande y disuelva las porciones solubles, controlando convenientemente la temperatura y la duración del proceso. Martin et al. (1965), recomienda que la maceración se realice a una temperatura de 15 a 20° C. Si el tiempo de maceración es muy prolongado debe usarse conservadores para evitar alteraciones microbianas (Yúfera, 1979). La ventaja de esta extracción es producir un extracto con una concentración uniforme, sin embargo resulta laboriosa, y para conseguir mejores rendimientos se requiere de mayor tiempo de extracción (Velarde Cárdenas , 2018). En esta etapa se evalúa lo siguiente:

- Influencia del tiempo de maceración.
- Influencia de la relación materia prima/solvente de extracción.
- Influencia del pH.
- Influencia de la concentración del ácido.
- Influencia de la temperatura de maceración.

Figura 3- 9: Extracción por Maceración



Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura 3-9 se observa un diagrama de bloques del método de extracción por maceración, la maceración y purificación de un extracto orgánico.

3.2.1.2.2. Extracción por Cocciones

Los cocimientos son preparados líquidos que se confeccionan hirviendo con agua las sustancias vegetales (Martin et al., 1965). La muestra se coloca en un recipiente de vidrio, se agrega el solvente y se somete a ebullición por diferentes tiempos. La temperatura de extracción debe ser tal que no afecte a la estructura del colorante (Velarde Cárdenas , 2018). En este método de extracción se evalúa:

- Influencia del número de etapas de extracción.
- Influencia del tiempo de cocimiento
- -Temperatura de calentamiento en la extracción.

Figura 3- 10: Diagrama del Proceso de Extracción por Cocimiento



Fuente : Elaboración propia, 2019.

3.2.1.2.3. Extracción por Lixiviación

La lixiviación es la extracción en la que una mezcla o una fase sólida se descomponen en sus componentes o en la que un componente valioso se quita y recupera de una masa sólida mediante el tratamiento por un líquido.

En general las operaciones que comprenden el tratamiento de sólidos por disolventes incluyen cierto número de circunstancias distintas. El sólido suele consistir de una mezcla heterogénea de varios constituyentes, uno o más de los cuales pueden ser líquidos o sólidos en disolución, pero puede ser una mezcla homogénea tal como una solución sólida o una sal doble. Los sólidos que se lixivian se hallan en una diversidad de formas físicas, y a menudo se requiere su desintegración para formar una gran superficie de contacto con el disolvente. Posiblemente, la clase más importante de las operaciones de lixiviación es la eliminación del componente soluble del interior del sólido inerte efectuado por un proceso lento de difusión a través de una membrana vegetal o animal. Son ejemplos, la recuperación del disolvente de aceites de semillas, nueces y sustancias vegetales semejantes; los extractos medicinales; la extracción de taninos, trementina y colofonia a partir de la madera mediante el proceso por disolventes; de la clorofila a partir de la alfalfa; y la extracción del azúcar de remolacha por lixiviación con agua (Perry, 1979). Las fuerzas físicas que tienen efecto importante

en la lixiviación son: gravedad, viscosidad, adherencia, fricción, ósmosis, capilaridad y solución (Velarde Cárdenas , 2018).

Para mejorar la extracción por lixiviación se puede usar un equipo de agitación mecánica o un calentador.

La extracción por agitación mecánica consiste en colocar la muestra con el solvente elegido en un vaso de precipitado y mediante un agitador mecánico se pone en contacto el solvente con la materia prima para obtener el producto deseado (Velarde Cárdenas , 2018).

En este método de extracción se evalúa:

- Tiempo de extracción
- Temperatura de extracción
- Velocidad durante el trabajo de agitación.

Figura 3- 11: Diagrama del Proceso de Extracción por Lixiviación



Fuente: Elaboración propia, 2019.

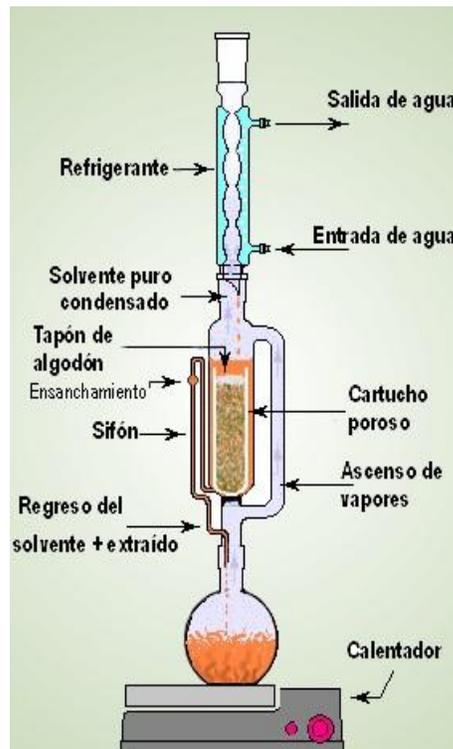
3.2.1.2.4. Extracción con Equipo Soxhlet

El equipo Soxhlet se aplica a analitos que no se pueden separar por volatilización (en fase gas) pero sí son extraíbles empleando un disolvente orgánico adecuado. Inaplicable a analitos termolábiles, que se descompongan con el calor o reaccionen.

La gran ventaja del Soxhlet es la eficacia en el proceso de remojo de la fase sólida. (Nuñez, 2008). El esquema del instrumento es sencillo:

- Un matraz de base redonda que contendrá el disolvente orgánico volátil.
- Un contenedor intermedio de vidrio en el cual se coloca la muestra dentro de un cartucho que está abierto en su parte superior siendo poroso al disolvente y a la posterior disolución del analito.
- Refrigerante.

Figura 3- 12: Extracción con Equipo Soxhlet



Fuente: Carlos Núñez, 2009.

3.3. Antecedentes Investigativos respecto a Extracción de Antocianinas

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, (Zapata, 2014) métodos que se desarrollaran a continuación:

3.3.1. Extracción de Antocianinas por Fermentación

La extracción de Antocianinas por fermentación de un medio sólido, es una técnica relativamente novedosa que no ha sido todavía muy estudiada, los estudios más relevantes fueron:

Kousuke et al. (1990) que estudiaron la obtención de antocianinas a partir de la fermentación de batata morada mezclada con arroz.

Estos autores señalaron que las Antocianinas extraídas de esta forma fueron más puras que las obtenidas por métodos extracción sólido-líquido, sin embargo, no aportaron datos de los componentes de las Antocianinas extraídos y de su estabilidad.

Zapata (2014) realizó el estudio de extracción de Antocianinas de Arándanos por fermentación. El cual, consistió en un proceso fermentativo en el que Arándanos triturados fueron fermentados con cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con el proceso fermentativo se buscó obtener, por acción de las levaduras y a partir de los azúcares presentes en el sustrato a fermentar, una solución alcohólica, donde se solubilizaran las antocianinas, además de metabolitos secundarios, tales como alcoholes superiores, éteres etílico, ácidos grasos y acetatos, que pudieran combinarse con las Antocianinas y formar estructuras más estables (proantocianidinas). (Zapata, 2014).

3.3.2. Extracción de Antocianinas Sólido-Líquido

La extracción sólido-líquido, es la técnica más utilizada para la extracción de Antocianinas.

La extracción en fase sólida se usa para absorber las Antocianinas y otros compuestos orgánicos hidrófobos y extraer los azúcares y ácidos orgánicos a partir del extracto (Whitaker, 2001): Algunos estudios realizados mediante esta técnica fueron:

Gorriti Gutierrez et al (2009), quienes estudiaron las mejores condiciones de extracción de Antocianinas a partir de corontas de maíz morado. Ensayaron extracciones con soluciones etanólicas al 20 % y pH 2 acondicionadas según un diseño factorial con los factores temperatura y tiempo de extracción.

Los resultados se obtienen indicaron que las mejores condiciones de extracción correspondieron a una temperatura de 75°C y un tiempo de extracción de entre 120 y 240 minutos, mientras que las condiciones más desfavorables fueron 25°C y 30 minutos.

También estudiaron la influencia de otras variables de proceso como el solvente, el pH, la temperatura y el tiempo de extracción. Concluyeron que la extracción se vio favorecida por la utilización de un medio etanólico al 20% como agente de extracción y un pH entre 2 y 4.

Cacace y Mazza (2006) publicaron un trabajo que consistió en la optimización de la extracción de Antocianinas y compuestos fenólicos de grosellas negras usando etanol acuoso como solvente de extracción. Las variables independientes seleccionadas por estos investigadores fueron: concentración de etanol, temperatura y relación soluto-solvente. Dos de las respuestas evaluadas fueron la concentración de polifenoles totales y la concentración de Antocianinas. La variable del proceso que tuvo mayor efecto en la extracción fue la relación soluto- solvente a una concentración de etanol de 60%, con una relación 19 L:1Kg de frutos y una temperatura de 30°C. La elevación de la temperatura de extracción no afecta la extracción de fenoles, sin embargo, provoca una disminución en el rendimiento de extracción de Antocianinas debido a la degradación de las mismas.

Se identifica la existencia de una temperatura crítica a partir de la cual la degradación es mayor. Esta temperatura aumenta con la concentración de etanol. Así, para una

concentración de etanol de 20% la temperatura crítica es 25°C, mientras que para una concentración de etanol de 95%, la temperatura crítica fue 35 °C. En general, existe una fuerte disminución en la concentración de las Antocianinas extraídas a temperaturas superiores a 45 °C. (Cacace & Mazza, 2006)

Fan et al. (2008a) investigaron sobre las condiciones de extracción de Antocianinas presentes en batata morada. Trabajaron con etanol como solvente de extracción acidificado con ácido clorhídrico, cuyas variables independientes son: temperatura de extracción, tiempo y relación sólido-líquido y como respuesta se evalúa el rendimiento de extracción de antocianinas. La temperatura de extracción y la relación sólido-líquido aumentaron el rendimiento de extracción, mientras que el tiempo no tiene efecto significativo. Estos autores obtuvieron que la mejor combinación de las variables son temperatura de 80°C, relación sólido- líquido 1:32 y tiempo de extracción 60 minutos.

Bordignon et al. (2009), investigaron sobre la extracción de Antocianinas de frutillas con una solución etanólica en el rango de pH de 1.0 a 13.0. A pH 1 obtuvieron la mejor extracción de Antocianina.

Zapata et al. (2014), investigaron la influencia de variables del proceso de extracción sólido-líquido de Antocianinas de Arándanos. Obtuvieron una combinación de variables que maximizó la recuperación, las cuales fueron etanol acidificado con ácido cítrico al 1% como solvente de extracción, proporción materia prima/solvente 1:3 kg/kg, temperatura 36 ± 1 °C y tiempo de extracción 2 h.

3.4. Factores que Influyen en la Extracción de Antocianinas

El proceso de extracción es afectado por varios factores como:

3.4.1. Temperatura

El calor facilita el pasaje de agua a través de las membranas semipermeables de las células vegetales. Esta deberá ser lo suficientemente alta para que permita una buena solubilidad del pigmento, sin llegar al extremo de hidrolizar al pigmento ni de solubilizar (Camavilca Cordova & Leyva Aliaga, 2015).

Muchos estudios sobre la estabilidad de la Antocianina han indicado que las Antocianinas son fácilmente degradadas por el calor. La tasa de degradación depende de la estructura de la antocianina (Furia, 1978). Kan et al (1976), recomienda usar temperaturas no mayores a 60°C, para evitar la degradación de antocianinas.

3.4.2. Tamaño de Partícula

La reducción del tamaño de la partícula facilita la extracción de un constituyente deseado, contenido en una estructura compuesta (Brennan, 1970). Por lo tanto, para obtener una buena difusión del soluto en el solvente es necesario determinar el grado de molienda o fineza del producto. Así cuanto más pequeña sean las partículas mucho mayores es el área interfacial entre el sólido y el líquido.

Cuando el material es demasiado fino ofrece dificultades en la extracción ya que en algunos casos impide la libre circulación del líquido, la separación de las partículas del líquido y el drenaje del sólido residual resulta más difícil, y en algunos casos la ruptura de las células deja en libertad materiales indeseables (Camavilca Cordova & Leyva Aliaga, 2015).

3.4.3. Agitación del Solvente

Incrementa la difusión y por lo tanto aumenta la transferencia de material, desde la superficie de las partículas a la solución. El agitador debe tener una velocidad adecuada o moderada considerando lo siguiente (Zapata, 1978):

- Velocidad alta da rapidez a la mezcla.

3.4.4. Equilibrio entre el Solvente y el Soluta

Es necesario encontrar una relación adecuada entre el solvente y la materia prima a ser extraída. Una proporción alta da lugar a extractos demasiado diluidos y si es muy baja no habrá buena difusión. El equilibrio se alcanza cuando el soluto se disuelve totalmente y la concentración de la solución que se forma es uniforme (Aguilar Quispe & Carcausto, 2017)

3.4.5. Número de Lavados de la Materia Prima

Es necesario determinar el número de lavados a que debe ser sometida la materia prima, para obtener un extracto con un grado de concentración lo suficientemente alto, y asimismo tratar de agotar completamente el soluto (Zapata 1978).

3.4.6. Calidad del Solvente

Un buen solvente debe ser selectivo y su viscosidad suficientemente baja para que pueda circular libremente. La concentración del soluto aumentará y la relación de extracción disminuirá progresivamente, debido a que el gradiente de concentración se va reduciendo; y porque la solución se hace más viscosa (Aguilar Quispe & Carcausto, 2017).

Se han mencionado diferentes solventes para la extracción de antocianinas, entre ellos: acetona, agua, etilen glicol, glicol de propileno, metil etil cetona, iso propanol, metanol y etanol. Los dos últimos son superiores al resto de solventes mencionados. La acetona es efectiva, pero aparentemente contribuye a la degradación de los pigmentos bajo un contacto prolongado.

El agua es conveniente pero menos efectivo (Chiriboga y Francis 1970).

Como las Antocianinas son estables a pH ácidos es necesario incluir ácidos orgánicos e inorgánicos. Se ha demostrado que el HCl estabiliza los pigmentos (Fuleki y Francis 1968a).

En investigaciones recientes sobre extracción de Antocianinas del maíz morado se demuestra que el ácido sulfúrico aumenta la eficiencia de extracción y da mayor estabilidad al pigmento; en cambio el ácido cítrico proporciona bajo porcentaje de extracción y aparentemente se produce cierta degradación del pigmento (Kan et al, 1976) Main et al (1978), señala que el ácido cítrico es menos corrosivo que el HCl y que los quelatos metálicos de ácido cítrico puede no tener efecto protector durante el secado por atomización (Zapata, 2014)

3.5. Conservación del Extracto Antocianinas de Arándano

Existen varias maneras de conservar el producto Extracto de Antocianinas de Arándano.

A continuación, se mencionan las alternativas más importantes:

3.5.1. Microencapsulación

La encapsulación es una técnica que se ha aplicado para preservar y proteger numerosos ingredientes. Puede considerarse una forma especial de empaquetar, en la que un material en particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente, de la reacción con otros compuestos o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno (QuimiNet, 2006).

La principal ventaja es que el encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado, obteniéndose productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales. Se utiliza también el término microencapsulación en la industria alimentaria o farmacéutica cuando se encapsulan sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades. Los dos términos, encapsulación y microencapsulación, se usan indistintamente (QuimiNet, 2006).

3.5.2. Conservación de las Antocianinas en Estado Líquido

Zapata, (2014). Hace referencia a la conservación de Extracto de Antocianinas en tres temperaturas para la degradación mínima de los compuestos fenólicos:

-Para tiempo prolongado de conserva de 1 año en adelante, es aconsejable una temperatura de -18°C .

-Para el uso del extracto en 2 días posteriores a su obtención, es aconsejable 4°C .

En todos los casos, el extracto debe encontrarse en botellas de vidrio ámbar herméticamente cerradas, para evitar la degradación por presencia de luz y oxígeno.

CAPÍTULO IV
PARTE EXPERIMENTAL

IV. CAPÍTULO

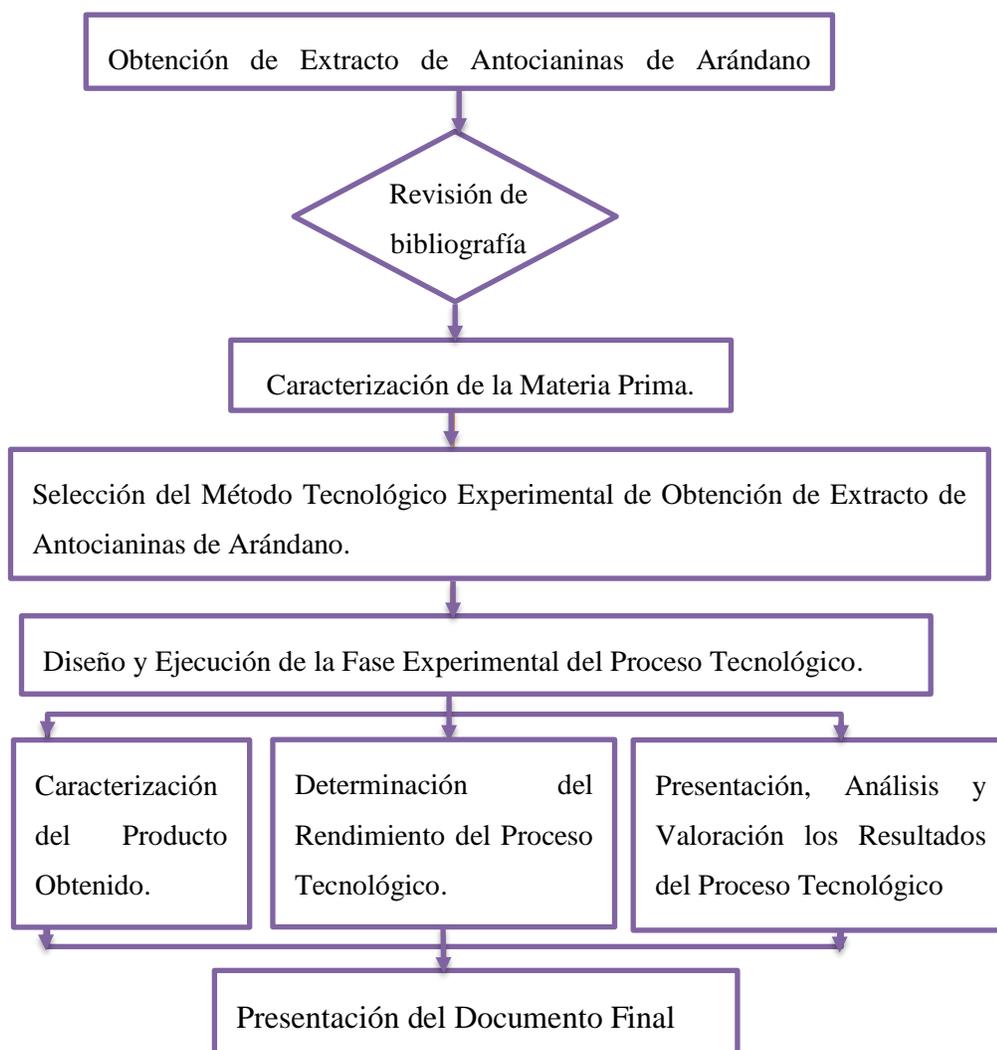
PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Metodología del Estudio para la Extracción de Antocianinas

4.1.1. Descripción Esquemática de la “Metodología del Estudio”

La metodología a emplear está en el marco de la normatividad, para la finalidad de la investigación y se describe en la figura 4-1, desde el momento en el que se realizó la recolección de información, hasta la presentación del documento final.

Figura 4- 1: Metodología del Estudio



Fuente: Elaboración propia, 2018.

4.2. Selección del Método de Extracción de Antocianinas de Arándano

La selección de un método de extracción es de gran importancia en el análisis de las antocianinas, y depende en gran medida del objetivo de la extracción, la naturaleza de las antocianinas, y de la materia prima. También es conveniente que el procedimiento de extracción no sea demasiado complejo, laborioso, peligroso o costoso.

De acuerdo a las referencias bibliográficas que se tienen, se reporta que se puede realizar la extracción mediante dos métodos: Extracción por Fermentación y Extracción Sólido-Líquido.

Señalado los métodos para la extracción de Antocianinas, procede a realizar una matriz de decisión para la selección del método que se aplicara, se asigna una calificación de acuerdo a una escala predeterminada de uno a diez.

En la tabla IV-1 se observa las calificaciones ponderadas, siendo el proceso adecuado aquel que acumule el mayor puntaje.

Tabla IV- 1: Escala de Calificación por Puntuación del 1 al 10

ESCALA DE PUNTUACIÓN	PUNTUACIÓN
Excelente	9-10
Muy buena	7-8
Buena	5-6
Regular	3-4
Mala	1-2

Fuente: Elaboración propia, 2018.

Tabla IV- 2: Matriz de Decisión para la Selección del Método de Extracción de Antocianinas

Factores	Valoración porcentual de los factores (%)	Extracción por Fermentación			Extracción Sólido-Líquido		
		Calif.	Fracción de Calif.	Pond. Final	Calif.	Fracción de Calif.	Pond. Final
Complejidad del método	30	2	0,2	6	9	0,9	27
Pureza del producto	25	8	0,8	20	5	0,5	12,5
Rendimiento de extracción	25	3	0,3	7,5	8	0,8	20
Costo del método	20	1	0,1	2	7	0,7	14
Total	100			35,5			73,5

Fuente: Elaboración propia, 2018.

De acuerdo a las tablas presentadas anteriormente se observa que la extracción sólido-líquido tiene una mayor ponderación final respecto a la extracción por fermentación, tiene una baja complejidad del método, el extracto obtenido no es altamente puro, pero se obtiene mejor rendimiento y con un menor costo, por lo que se escogió el método sólido-líquido.

La extracción por fermentación requiere de condiciones y equipos, no disponibles para su realización. Principal razón para tomar en cuenta la extracción sólido-líquido como método por excelencia para nuestro medio científico.

4.3. Selección del Solvente para la Extracción de Antocianinas

El método de extracción sólido-líquido, descrito en el acápite 3.2.1.2, tiene diferentes técnicas, dependiendo del solvente que se utilice.

Un buen solvente debe ser lo más selectivo posible, con una viscosidad lo suficientemente baja para facilitar su flujo a través del sólido y de bajo punto de ebullición para que el extracto pueda concentrarse por la evaporación del solvente (Zapata, 2014).

El fin del trabajo de investigación es obtener Extracto de Antocianinas para el consumo humano por lo que se debe considerar un solvente que no sea tóxico. Por este motivo se realizara una descripción de los solventes a utilizar.

Tabla IV- 3: Ventajas y Desventajas de los Posibles Solventes para la Extracción de Antocianinas

Método	Ventajas	Desventajas
Acetona con Cloroformo	-Mayor pureza que otros métodos. -30% más efectivo que el metanol. -Alta recuperación de antocianinas.	Efectos tóxicos y crónica para la salud humana.
0.001 % HCl en metanol.	Este es el método más efectivo después de acetona y cloroformo.	-HCl es corrosivo -Metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
0.001 % HCl en etanol.	80% tan efectivo como el metanol.	-Degradación durante la concentración del pigmento.

Método	Ventajas	Desventajas
0.001 % HCl en agua.	27 % tan efectivo como el metanol.	-Bajo rendimiento
Metanol acidificado con ácido cítrico.	Este es el más eficiente de los ácidos orgánicos.	Metanol tiene efectos tóxicos en la salud humana.
Etanol acidificado con ácido cítrico	-Minimiza la descomposición de los pigmentos. -Efecto no tóxico para el ser humano	- Concentración del extracto retardada con respecto al metanol con HCl. -Menor rendimiento

Fuente: Elaboración propia, 2018.

El procedimiento de extracción debe maximizar la recuperación de Antocianinas con una mínima cantidad de impurezas y mínima alteración o degradación del medio natural (in vivo). Sin embargo, nunca se puede estar seguro de que el pigmento extraído es exactamente el mismo que ocurre in vivo (Brouillard y Cuelga, 1994).

El conocimiento de los factores que influyen en la estructura y la estabilidad de Antocianinas son vitales y ha sido mencionado anteriormente en el acápite 3.4. Tomando en cuenta estos factores, se decide realizar la extracción de Antocianinas mediante el método de extracción sólido-líquido, el solvente seleccionado es etanol acidificado con ácido cítrico, para cumplir con el fin último del proyecto, se decide utilizar el solvente menos tóxico, para la salud humana.

4.4. Selección de Variables del Proceso de Extracción de Antocianinas de Arándano

Las variables y sus respectivos valores que se toman en cuenta de manera tentativa son:

4.4.1. pH

Dependiendo del pH las Antocianinas pueden encontrarse en distintas formas química (Moldovan et al., 2012; Bordignon et al., 2009). En los estudios consultados sobre el efecto del pH en la estabilidad de las antocianinas, los rangos de experimentación van desde 1 a 8. En general se puede señalar que bajos valores de pH posibilitan la obtención un mayor rendimiento en la extracción, lo que probablemente se debe a que valores altos de acidez favorecen la formación del catión flavilio, que es la forma más estable de las Antocianinas (Zapata, 2014).

En la presente investigación se decide trabajar entre los pH 3,5 y 4. Y no valores más altos de pH dado que el objetivo de extraer Antocianinas de Arándanos es poder obtener un extracto con fin de ser utilizado como un principio bioactivo y colorante natural, por lo que se requiere de un extracto altamente puro. Por otro lado, valores de pH muy altos podrían producir una degradación rápida de las Antocianinas, por lo que es probable que gran parte de éstas se pierdan en el proceso extractivo. Por tal motivo los valores de pH a trabajar son: 3,5 y 4.

4.4.2. Estado de la Materia Prima Arándano

El Arándano no consumido en la temporada de cosecha, es almacenado en cámaras refrigerantes para su posterior venta, aprovisionando el mercado de Arándano congelado durante todo el año (Marcal, 2018).

El contenido de Antocianinas en las frutas depende del estado en las que se encuentren, el tiempo, la luz, el oxígeno, la temperatura, la amplitud térmica, hacen que varíe la concentración de Antocianinas en la materia prima. Por ende las condiciones a las cuales se encuentra la muestra influyen mucho en la concentración de Antocianinas, por este motivo se tomó como variable el Arándano fresco y Arándano congelado (Marcal, 2018)

4.4.3. Relación de Materia Prima / Solvente de Extracción

La transferencia de Antocianinas hacia el seno del solvente se produce hasta alcanzar un equilibrio en la concentración de Antocianinas en todo el conjunto del sistema de extracción. Por lo tanto, cuanto mayor sea la proporción de materia prima / solvente, mayor será el gradiente de concentración entre las partículas de Arándanos y la solución extractiva y así la velocidad de difusión de las Antocianinas aumentará.

Sin embargo, conviene hacer también el análisis desde un punto de vista económico, ya que trabajar con mayor cantidad de solvente, no solo significa un mayor consumo de éste (aunque parte podría llegar a recuperarse), sino que también, se requiere mayor tiempo para su eliminación a efectos de conseguir un extracto concentrado de antocianinas.

Por todo lo expuesto, en la presente investigación se formula un diseño en el que la proporción materia prima / solvente estuvo comprendida entre 1:2 y 1:3 g/ml.

4.5. Diseño Experimental para la Obtención de Extracto de Antocianinas

El diseño experimental es una técnica estadística, que tiene como objetivo definir una serie de pruebas en las cuales existen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso sistema, de tal manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios que se producen en la respuesta de salida, de tal modo que el investigador obtenga estimaciones con la mayor precisión.

4.5.1. Planteamiento de la Hipótesis

Para llevar a cabo el diseño experimental se tomaron en cuenta las siguientes hipótesis:

- Existe diferencia en el rendimiento en cuanto a la relación soluto/solvente en la extracción de antocianinas.
- Existe diferencia en el rendimiento en cuanto al tiempo de extracción de antocianinas.
- Existe diferencia en cuanto a la estabilidad y el rendimiento de Antocianinas en el extracto.
- Existe variación en la interacción entre ambos factores.

- El nivel de significación es del 95%

4.5.2. Modelo del Diseño Factorial

El diseño factorial pertenece al modelo 2^k . Donde 2 hace representación a los niveles y k a los factores, las variables cuantitativas; pH. Arándano fresco-congelado, relación soluto/solvente. La variable de respuesta será rendimiento total de antocianinas.

El modelo de experimento será: 2^3

El número de experiencias es: $2^3 = 8$

Se consideran dos réplicas con el fin de obtener resultados significativos y validados.

El número de experimentos totales: $2^3 \times 2 = 16$ experimentos

A continuación, se muestra la tabla de niveles y los factores seleccionados.

Tabla IV- 4: Niveles de Variación de los Factores

Factores (K)	Nivele min	Nivel máx
pH	3,5	4
Estado de la materia prima: Arándano	Congelado	Fresco
Resolución soluto/solvente(g/ml)	1:2	1:3

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Para facilitar el tratamiento de datos, se codifica las variables en la siguiente tabla:

Tabla IV- 5: Codificación de Variables

Factores (K)	Nivele min	Nivel máx
pH	-1	1
Estado de la materia prima	-1	1
Resolución soluto/solvente(g/ml)	-1	1

Fuente: Elaboración propia, 2019.

La tabla IV-6 representa la matriz del diseño a utilizar, los ocho experimentos más su réplica.

Tabla IV- 6: Matriz de Diseño

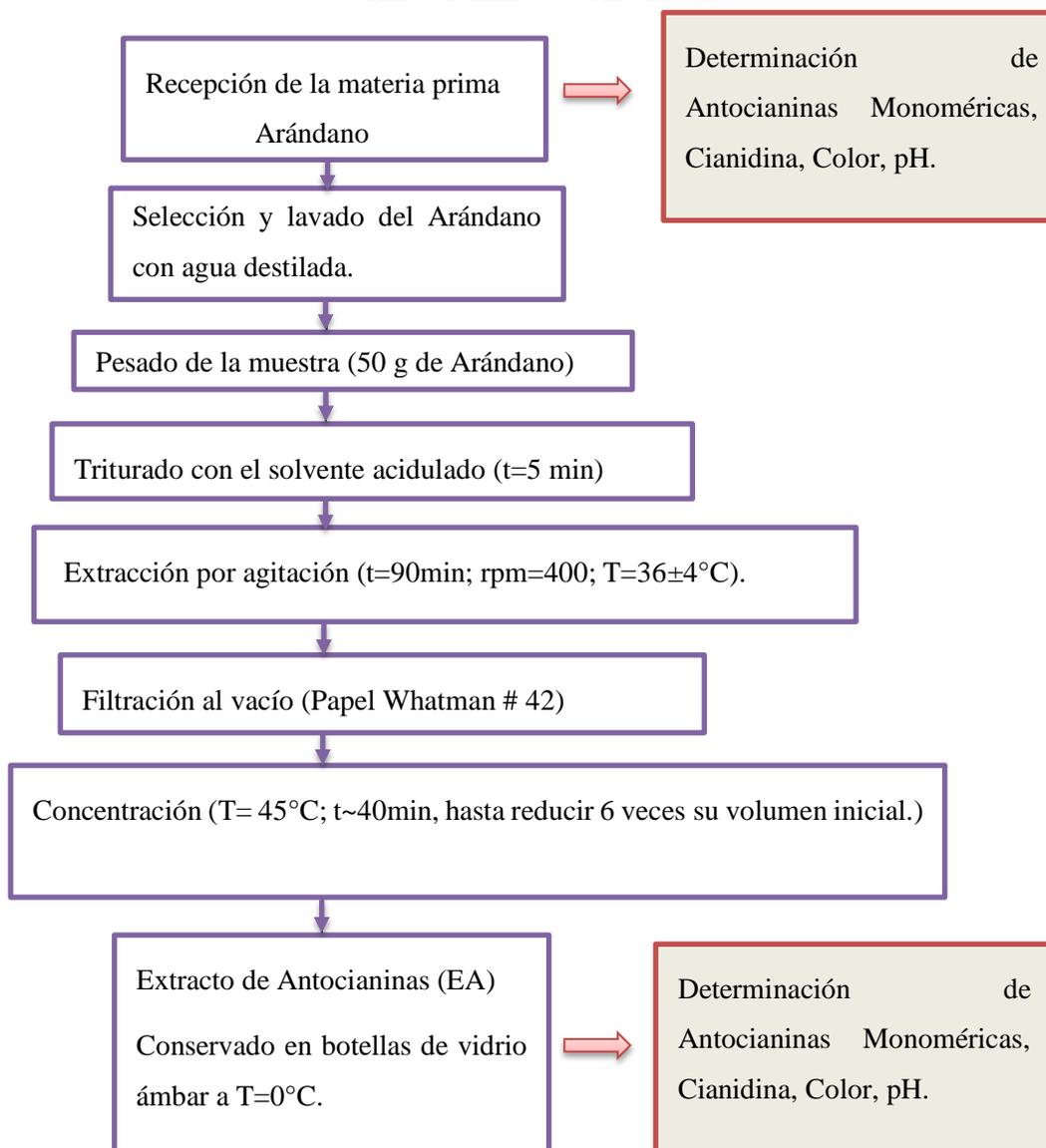
Número de experimentos	pH	Estado de la materia prima: Arándano	Resolución soluto/solvente (g/ml)	Rendimiento total de Antocianinas (%)
1	-1	-1	-1	Y ₁
2	-1	1	-1	Y ₂
3	1	-1	-1	Y ₃
4	1	-1	1	Y ₄
5	-1	1	1	Y ₅
6	-1	1	-1	Y ₆
7	-1	-1	1	Y ₇
8	1	1	1	Y ₈
9	-1	-1	-1	Y ₉
10	-1	1	-1	Y ₁₀
11	1	-1	-1	Y ₁₁
12	1	-1	1	Y ₁₂
13	-1	1	1	Y ₁₃
14	-1	1	-1	Y ₁₄
15	-1	-1	1	Y ₁₅
16	1	1	1	Y ₁₆

Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6. Diseño del Proceso Tecnológico Experimental Seleccionado de Extracción de Antocianinas.

Identificado el proceso de extracción sólido- líquido y como solvente etanol acidificado con ácido cítrico, a continuación se describe un esquema del proceso.

Figura 4- 2: Esquema del Proceso de Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano



Fuente: Elaboración propia, 2019.

La descripción del proceso por etapas, es descrita a continuación:

4.6.1. Recepción de la Materia Prima: Arándano

La materia prima utilizada en el presente estudio es Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) del tipo Highbush (Arándano alto) procedente de la localidad de Turumayo, perteneciente al Valle Central de Tarija.

Con una ubicación geográfica de:

Latitud: 21.571588

Longitud: 64.783974

Figura 4- 3: Ubicación Geográfica de la Procedencia de la Materia Prima



Fuente: Elaboración propia, 2019.

Para reducir el deterioro de la post cosecha, las bayas frescas son refrigeradas a ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) y las bayas congeladas son mantenidas a una temperatura de (-18°C) en bandejas de polietilentereftalato hasta el momento de utilizar en las diferentes experiencias.

4.6.2. Selección y Lavado del Arándano

La selección del Arándano se basa en escoger Arándanos que se encuentren en buen estado, sin presentar signos de descomposición, daño o alteración.

El lavado de los Arándanos se efectúa por inmersión con agua destilada para eliminar residuos externos post-cosecha, como partículas de tierra y suciedades.

Figura 4- 4: Selección y Lavado del Arándano



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.3. Pesado de la Materia Prima: Arándano

Se pesa con balanza analítica (especificación técnica, ver Anexo III) 50 g de la materia prima: Arándano a utilizar durante el proceso con la finalidad de calcular el rendimiento y las pérdidas en el proceso de extracción.

Figura 4- 5: Pesado de la Materia Prima



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.4. Triturado de la Materia Prima: Arándano

El triturado se realiza en una mezcladora de acero inoxidable o de uso general (especificación técnica, ver Anexo III), donde se mezcla la materia prima con el solvente ya acidulado, por un tiempo de 5 minutos.

Figura 4- 6: Triturado de la Materia Prima



Fuente: Elaboración propia, 2019.

Acidulación del solvente: con el objetivo de realizar la variación del pH, según el diseño factorial se acidula el solvente en dos niveles, pH 4 y pH 3,5 con ácido cítrico.

4.6.5. Extracción Mediante Agitación

La agitación de la solución soluto-solvente, es realizada en 90 min a una velocidad de 400 rpm, protegiendo de la luz, para lograr la lixiviación del soluto y evitar la posible degradación de las Antocianinas.

Figura 4- 7: Extracción Mediante Agitación Magnética



Fuente: Elaboración propia, 2019.

La temperatura a la cual se trabajo es 36 ± 4 °C.

4.6.6. Filtrado del Extracto de Antocianinas

Mediante filtración se separa el sólido del líquido, por succión de vacío usando un equipo de filtración al vacío y papel Whatman número 42, para mejorar la filtración.

Figura 4- 8: Filtración al Vacío



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.7. Concentración del Extracto de Antocianinas

La concentración de los extractos se realiza en un Rota Vapor (especificación técnica, ver Anexo III), aproximadamente por 40 min, a una temperatura de 45°C del baño María.

Es aconsejable que el solvente recibido sea 6 veces el volumen del extracto para poder parar la concentración.

El tiempo de evaporación prolongado debe evitarse para minimizar la degradación del pigmento. Una marcada reducción en la tasa de evaporación, así como un aumento aparente de la viscosidad en el indicativo que el líquido residual es principalmente agua.

Figura 4- 9: Concentración del Extracto



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.8. Almacenamiento del Extracto Concentrado de Antocianinas de Arándano

El extracto concentrado extraído de la evaporación, es recolectado en botellas de vidrio color ambar, almacenado a 4 ° C y analizado en 2 días seguidos a la obtención del mismo.

Para períodos más largos de análisis (hasta 1 año o incluso más), almacenar a -18°C.

Figura 4- 10: Muestras de Extracto Concentrado



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.9. Análisis Cuantitativo de Antocianinas

Para realizar el análisis cuantitativo de Antocianinas en el producto obtenido, se usa un Espectrofotómetro UV- Visible. Se llevan todos los extractos a las mismas condiciones, evaporando hasta que se tenga 100 ml del extracto, para proceder con el análisis.

Se toma 1 ml de la muestra y se diluye en con alcohol al 96 % hasta aforar un matraz de 50 ml. De esta solución llamada solución madre, se toma 1 ml de la mencionada solución y se prepara soluciones tampón a pH 1 y pH 4,5, para después leer las absorbancias, según el Anexo II.

Figura 4- 11: Análisis Cuantitativo de Antocianinas



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.10. Análisis de Color en el Extracto de Antocianinas de Arándano

Para realizar el análisis de color en el Extracto de Antocianinas de Arándano, se usa un medidor de Colorimetría CR-400 (especificación técnica, ver Anexo III). Se toma una alícuota de cada extracto y se procede a la lectura directa de las coordenadas CIE $L^*b^*a^*$.

Figura 4- 12: Análisis de Color del Extracto



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.11. Balance de Materia y Energía

Para el balance de Materia y Energía se realiza la extracción de Antocianinas a partir de 50,631 g de Arándano con una humedad del 83,04 %. El proceso de extracción se realiza con las variables que proporcionan una mayor cantidad de Antocianinas totales; pH 4, Arándano fresco y una relación soluto/solvente de 1:3, a una temperatura de 36 ± 4 °C, con un tiempo de extracción de 90 min.

Cada uno de los valores de entalpías, capacidades caloríficas, temperaturas se obtienen de tablas termodinámicas, de acuerdo a la presión que ejercía la bomba en el sistema, fueron obtenidas de las tablas de termodinámica. (Smith Van Ness, Perry, 1995)

Tabla IV- 7: Datos de Proceso de Obtención de Extracto de Antocianinas

Balance de Materia	
Densidad de Arándano	1,0058 g/ml
Etanol al 96 °GL	450 ml
Densidad del etanol al 96 °GL	0,793g/ml
Densidad del ácido cítrico	1,66g/ml
Densidad del agua	1g/ml
Tiempo de extracción	90min
Volumen del ácido cítrico	0,32 ml
Masa de Arándano inicial	50,503gr
Densidad del etanol al 87 °GL	0,8199g/ml
Densidad del extracto concentrado	1,032g/ml
Balance de Energía	
Temperatura de ebullición del etanol	41°C
Temperatura del baño del Rota-Vapor	45°C
Temperatura final del agua de condensación	20°C
Masa de agua de baño del Rota- Vapor	3,8 Kg
Masa de extracto concentrado	0,01997 Kg
Masa del etanol recuperado	294,306 g
$C_{p_{OH}}$ = Calor específico del etanol	2,513 Kj/Kg°C
$C_{p_{Agua}}$ = Calor específico del agua	4,186 Kj/Kg°K
λ_{OH} =Calor latente del alcohol	845Kj/Kg

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla IV- 8: Nomenclatura Utilizada en el Balance de Materia

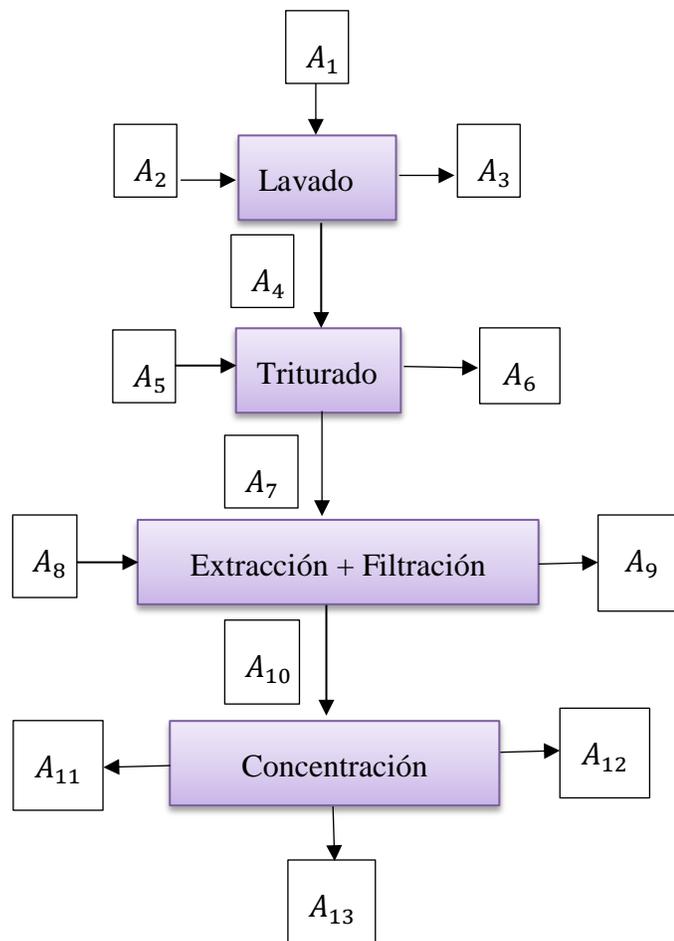
Nomenclatura utilizada en el Balance de Materia	Especificación
$A_{\#}$ Corriente másica global	A = Corriente másica # = Número de corriente, toma valores de 1,2,3,4....13
$A_{\#E}$ Corriente másica de cada componente	A = Corriente másica # = Número de corriente, toma valores de 1,2,3,4....13 E = Abreviatura del componente de la corriente, sus significados son: Ac=Ácido, Ant=Antocianinas, H2O=Agua, OH=Etanol, S=Sólidos.
$X_{\#E}$ Fracción másica de cada componente	X = Fracción másica # = Número de corriente, toma valores de 1,2,3,4....13 E = Abreviatura del componente de la corriente, sus significados son: Ac=Ácido, Ant=Antocianinas, H2O=Agua, OH=Etanol, S=Sólidos.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

La tabla IV-8 describe cada término de la nomenclatura utilizada en el balance de materia.

La figura 4-13 muestra el diagrama de bloques, con la entrada y salida de cada corriente

Figura 4- 13: Diagrama de Bloques del Proceso



Fuente: Elaboración propia, 2019.

La siguiente tabla muestra las especificaciones de las corrientes de diagrama de bloques del proceso.

Tabla IV- 9: Corrientes del Proceso

Corriente	Especificación	Corriente	Especificación
A ₁	Arándano	A ₇	Mezcla de Arándano triturado
A ₂	Agua destilada	A ₈	Etanol acidulado

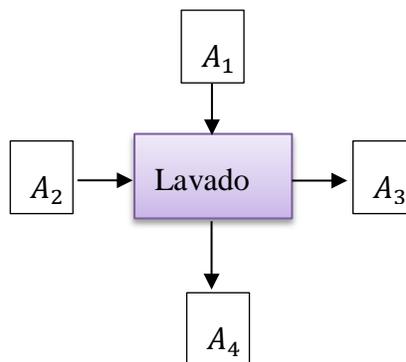
Corriente	Especificación	Corriente	Especificación
A ₃	Agua + Impurezas	A ₉	Pérdidas + torta
I _L	Impurezas	A ₁₀	Extracto bruto
A ₄	Arándano lavado	A ₁₁	Etanol recuperado
A ₅	Etanol acidulado	A ₁₂	Pérdidas por concentrado
A ₆	Pérdidas por triturado	A ₁₃	Extracto de Antocianinas

Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.11.1. Balance de Materia

El balance de materia proporciona datos sobre flujos intermedios y pérdidas en el proceso, ya sea por extracción, filtrado y/o tamizado.

4.6.11.1.1. Balance de Materia en la Etapa de Lavado



$$A_1(\text{Arándano}) = 50,631 \text{ g}$$

$$A_2(\text{Agua destilada}) = 200 \text{ g}$$

$$A_3(\text{Agua + Impurezas})$$

$$A_4(\text{Arándano lavado}) = 50,503 \text{ g}$$

Balance Global

$$A_1 + A_2 = A_3 + A_4 \quad \text{Ec. 4.1}$$

$$A_3 = A_1 + A_2 - A_4$$

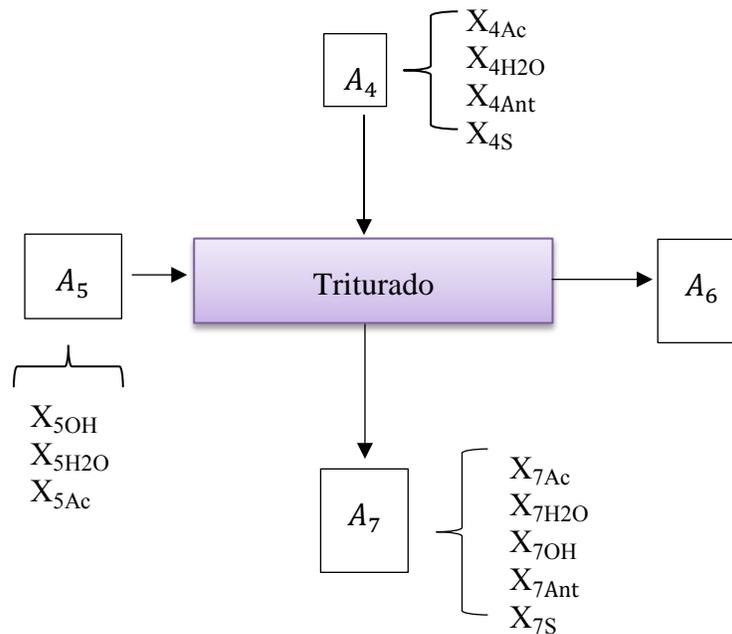
$$A_3 = 250,631\text{g} - 50,503\text{g} = 200,128\text{g}$$

Determinación de Impurezas

$$I_L = A_3 - A_2 \quad \text{Ec. 4.2}$$

$$I_L = 200,128 - 200 = 0,128\text{g}$$

4.6.11.1.2. Balance de Materia en la Etapa de Triturado



$$A_4(\text{Arándano lavado}) = 50,503\text{g}$$

$$A_5(\text{Etanol acidulado}) = 120,527\text{g}$$

$$A_6(\text{Pérdidas por triturado}) = 3,092\text{g}$$

$$A_7(\text{Mezcla de Arándano triturado})$$

$$A_7 = A_5 + A_4 - A_6 \quad \text{Ec. 4.3}$$

$$A_7 = 50,503\text{g} + 120,527\text{g} - 3,092\text{g} = 167,938\text{g}$$

Balance para A_4 : Arándano lavado = 50,503 g

$$A_4 = X_{4Ac}A_4 + X_{4H_2O}A_4 + X_{4Ant}A_4 + X_{4S}A_4 \quad \text{Ec. 4.4}$$

$$X_4 = X_{4Ac} + X_{4H_2O} + X_{4Ant} + X_{4S} = 1 \quad \text{Ec. 4.5}$$

Según datos obtenidos en los análisis realizados en el CEANID (Anexo I)

$$X_{4Ac} = \frac{0,06\%}{100\%} = 6 \times 10^{-4}$$

$$X_{4H_2O} = \frac{83,04\%}{100\%} = 0,830$$

Según resultados obtenidos en análisis de Antocianinas en el Arándano (Anexo II)

$$A_{4Ant} = \frac{98\text{mg de Antocianinas}}{100\text{g de Arándano}} * 50,503\text{ g de Arándano} = 49,493\text{ mg} = 0,049\text{ g}$$

$$X_{4Ant} = \frac{0,049\text{g}}{50,503\text{g}} = 9,702 \times 10^{-4}$$

Mediante cálculo y despejando la Ec. 4.5:

$$X_{4S} = 1 - X_{4Ac} - X_{4Ant} - X_{4H_2O}$$

$$X_{4S} = 1 - 6 \times 10^{-4} - 9,702 \times 10^{-4} - 0,830 = 0,168$$

Balance para A_5 : Etanol acidulado

$$A_5 = A_{5OH} + A_{5H_2O} + A_{5Ac} \quad \text{Ec. 4.6}$$

$$X_5 = X_{5OH} + X_{5H_2O} + X_{5Ac} = 1 \quad \text{Ec. 4.7}$$

Se utiliza 150 ml de etanol al 96°Gl acidulado con 0,32 ml de ácido cítrico

Las densidades del alcohol y el ácido son:

$$\rho_{OH} = 0,793\text{g/ml}$$

$$\rho_{Ac} = 1,66\text{g/ml}$$

$$\rho_{H_2O} = 1\text{g/ml}$$

$$A_{5OH} = 150 \text{ ml} * 0,96 * \frac{0,793\text{g}}{\text{ml}} = 114,192\text{g}$$

Para preparar la solución ácida se utiliza 12 gramos de ácido cítrico en 100 ml de agua, y se toma de esta solución 0,32 ml para acidificar hasta pH 4, los 150 ml de alcohol.

$$A_{5Ac} = 0,32 \text{ ml de solución} * \frac{12 \text{ g de ácido}}{100 \text{ ml solución}} = 0,0384\text{g de ácido}$$

Mediante cálculo despejando la Ec. 4.6:

$$A_{5H_2O} = \left(150 \text{ ml} * 0,04 * 1 \frac{\text{g}}{\text{ml}}\right) + \left(0,32 \text{ ml} - \frac{0,0384 \text{ g}}{1,66 \frac{\text{g}}{\text{ml}}}\right) = 6,297\text{g}$$

$$A_5 = 6,297\text{g} + 0,0384\text{g} + 114,192 \text{ g} = 120,527 \text{ g}$$

$$X_{5OH} = \frac{114,192 \text{ g}}{120,527 \text{ g}} = 0,947$$

$$X_{5Ac} = \frac{0,0384 \text{ g}}{120,527 \text{ g}} = 3,186 \times 10^{-4}$$

$$X_{5H_2O} = \frac{6,297 \text{ g}}{120,527 \text{ g}} = 0,052$$

Según cálculo de Ec. 4.7:

$$X_5 = 0,947 + 3,186 \times 10^{-4} + 0,0522 = 1$$

Balance para A_T: Arándano total triturado

$$A_4 + A_5 = A_7 + A_6 \quad \text{Ec. 4.8}$$

$$\text{Según cálculo de Ec. 4.8} \quad A_T = 50,503\text{g} + 120,527\text{g} = 171,030\text{g}$$

$$A_T = X_{TAc}A_T + X_{TH_2O}A_T + X_{TOH}A_T + X_{TAnt}A_T + X_{TS}A_T \quad \text{Ec. 4.9}$$

Balance para el ácido cítrico en A_T

$$A_{TAc} = A_4 * X_{4Ac} + A_5 * X_{5Ac} \quad \text{Ec. 4.10}$$

$$A_{TAc} = (50,503\text{g} * 6 \times 10^{-4}) + (120,527 * 3,186 \times 10^{-4}) = 0,0687\text{g}$$

$$X_{TAc} = \frac{0,0687 \text{ g de ácido}}{171,030 \text{ g de extracto}} = 4,017 \times 10^{-4}$$

Balance para el agua en A_T

$$A_{TH_2O} = A_4 * X_{4H_2O} + A_5 * X_{5H_2O} \quad \text{Ec. 4.11}$$

$$A_{TH_2O} = (50,503 \text{ g} * 0,830) + (120,527 \text{ g} * 0,0522) = 48,209 \text{ g}$$

$$X_{TH_2O} = \frac{48,209 \text{ g de H}_2\text{O}}{171,030 \text{ g de extracto}} = 0,282$$

Balance para el etanol en A_T

$$A_T * X_{TOH} = A_5 * X_{5OH} \quad \text{Ec. 4.12}$$

$$X_{TOH} = \frac{A_5 * X_{5OH}}{A_T} = \frac{120,527 \text{ g} * 0,947}{171,03 \text{ g}} = 0,667$$

Balance para Antocianinas en A_T

$$A_T * X_{TAnt} = A_4 * X_{4Ant} \quad \text{Ec. 4.13}$$

$$X_{TAnt} = \frac{A_4 * X_{4Ant}}{T} = \frac{50,503 \text{ g} * 9,702 \times 10^{-4}}{171,03 \text{ g}} = 2,865 \times 10^{-4}$$

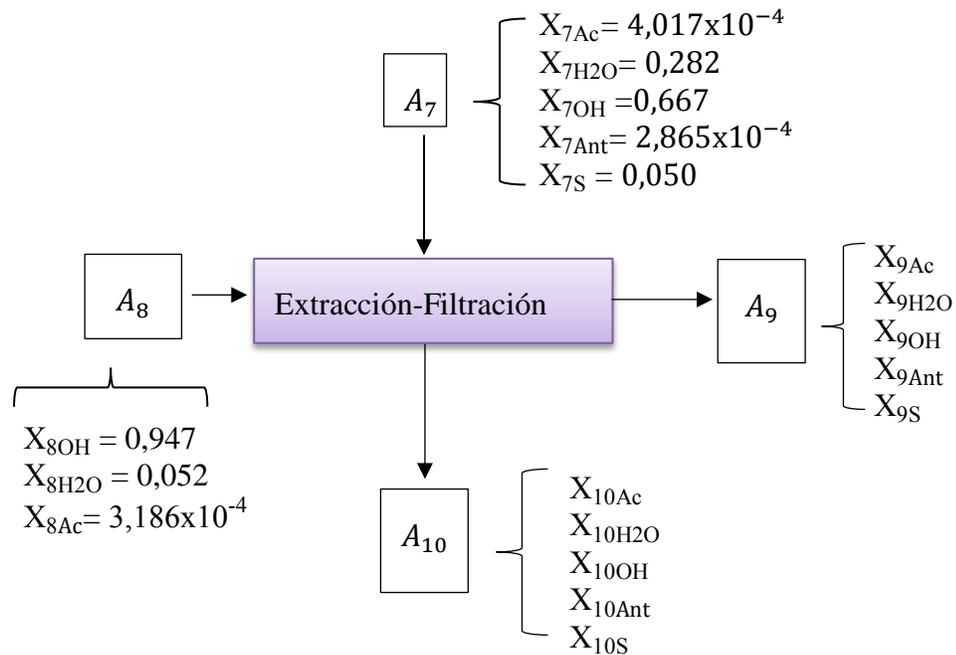
Balance para sólidos en A_T

$$X_{TS} = 1 - X_{TAc} - X_{TH_2O} - X_{TOH} - X_{TAz} - X_{TAnt} \quad \text{Ec. 4.14}$$

$$X_{TS} = 1 - 4,017 \times 10^{-4} - 0,282 - 0,667 - 2,865 \times 10^{-4} = 0,050$$

Para determinar la composición de A_6 y A_7 , se utiliza las fracciones de A_T

4.6.11.1.3. Balance de Materia de la Etapa de Extracción-Filtración



A_7 (Mezcla de Arándano triturado) = 167,938 g

A_8 (Etanol acidulado) = 241,054g

A_9 (Pérdidas + torta) =

A_{10} (Extracto bruto) = 314,455g

$$A_7 + A_8 = A_9 + A_{10} \quad \text{Ec. 4.15}$$

Despejando la Ec. 4.15 $A_9 = A_7 + A_8 - P_{10}$

$$A_9 = 167,938\text{g} + 241,054\text{g} - 314,455\text{g} = 94.537 \text{ g}$$

Balance para A_7 : Mezcla Arándano triturado = 167,938g

$$A_{7Ac} = A_7 * X_{TAc} = 167,938 \text{ g} * 4,017 \times 10^{-4} = 0,067 \text{ g}$$

$$A_{7H_2O} = A_7 * X_{TH_2O} = 167,938 \text{ g} * 0,282 = 47,358 \text{ g}$$

$$A_{7OH} = A_7 * X_{TOH} = 167,938 \text{ g} * 0,667 = 112,015 \text{ g}$$

$$A_{7Ant} = A_7 * X_{TAnt} = 167,938 \text{ g} * 2,865 \times 10^{-4} = 0,048 \text{ g}$$

$$A_{7S} = A_7 * X_{TS} = 167,938 \text{ g} * 0,050 = 8,3969 \text{ g}$$

Balance para A₁₀: Extracto bruto = 314,455g

Balance para el etanol en A₁₀

Para determinar la cantidad de etanol en la corriente A₁₀, se emplea el alcoholímetro dando un valor de 85 °GL, la densidad de la corriente A₁₀ son:

$$\rho_{A_{10}} = 0,825 \text{g/ml}$$

$$\rho_{OH} = 0,793 \text{g/ml}$$

Realizando la corrección de 85°GL a fracción másica:

$$X_{10OH} = 0,85 \frac{\text{ml OH}}{\text{ml sol}} * \frac{0,793 \frac{\text{g}}{\text{ml OH}}}{0,825 \frac{\text{g}}{\text{ml Sol}}} = 0,817$$

$$A_{10OH} = A_{10} * X_{10OH} \quad \text{Ec. 4.16}$$

$$A_{10OH} = 314,455 \text{g} * 0,817 = 256,910 \text{g}$$

Balance para el ácido en A₁₀

$$A_{10} * X_{10Ac} = A_{13} * X_{13Ac} = A_{10Ac} \quad \text{Ec. 4.17}$$

$$X_{10Ac} = \frac{A_{13Ac}}{A_{10}} = \frac{0,0559 \text{g}}{314,455 \text{g}} = 1,778 \times 10^{-4}$$

$$A_{10Ac} = 314,455 \text{g} * 1,778 \times 10^{-4} = 0,056 \text{g}$$

Balance para sólidos en A₁₀

$$A_{10} * X_{10S} = A_{13} * X_{13S} = A_{10S} \quad \text{Ec. 4.18}$$

$$X_{10S} = \frac{A_{12S}}{A_{10}} = \frac{4,776 \text{ g}}{314,455 \text{g}} = 0,015$$

$$A_{10S} = 314,455 \text{g} * 0,015 = 4,717 \text{g}$$

Balance para Antocianinas en A₁₀

$$A_{10} * X_{10Ant} = A_{13} * X_{13Ant} = A_{10Ant} \quad \text{Ec. 4.19}$$

$$X_{10\text{Ant}} = \frac{A_{12\text{Ant}}}{A_{10}} = \frac{0,019969\text{g}}{314,455\text{g}} = 6,350 \times 10^{-5}$$

$$A_{10\text{Ant}} = 314,455\text{g} * 6,350 \times 10^{-5} = 0,020\text{g}$$

Mediante cálculo se obtiene la fracción del agua en A_{10}

$$X_{10\text{H}_2\text{O}} = 1 - X_{10\text{Ac}} - X_{10\text{S}} - X_{10\text{OH}} - X_{10\text{Ant}} \quad \text{Ec. 4.20}$$

$$X_{10\text{H}_2\text{O}} = 1 - 1,778 \times 10^{-4} - 0,015 - 0,817 - 6,350 \times 10^{-5} = 0,168$$

$$A_{10} * X_{10\text{H}_2\text{O}} = A_{10\text{H}_2\text{O}} \quad \text{Ec. 4.21}$$

$$A_{10\text{H}_2\text{O}} = 314,455\text{g} * 0,168 = 52,753 \text{ g}$$

Balance para A_9 : Pérdidas + torta = 94, 537 g

Balance para el etanol en A_9 .

$$A_{9\text{OH}} = A_{7\text{OH}} + A_{8\text{OH}} - A_{10\text{OH}} \quad \text{Ec.4.22}$$

$$A_{9\text{OH}} = 112,015 \text{ g} + 228,278 - 256,910 = 83,383\text{g}$$

$$X_{9\text{OH}} = \frac{A_{9\text{OH}}}{A_9} = \frac{83,383\text{g}}{94,537 \text{ g}} = 0,882$$

Balance para el agua en A_9 .

$$A_{9\text{H}_2\text{O}} = A_{7\text{H}_2\text{O}} + A_{8\text{H}_2\text{O}} - A_{10\text{H}_2\text{O}} \quad \text{Ec. 4.23}$$

$$A_{9\text{H}_2\text{O}} = 47,358 \text{ g} + 12,535\text{g} - 52,514 = 7,379 \text{ g}$$

$$X_{9\text{H}_2\text{O}} = \frac{A_{9\text{H}_2\text{O}}}{A_9} = \frac{7,379 \text{ g}}{94,537\text{g}} = 0,078$$

Balance para el ácido en A_9

$$A_{9\text{Ac}} = A_{7\text{Ac}} + A_{8\text{Ac}} - A_{10\text{Ac}} \quad \text{Ec. 4.24}$$

$$A_{9\text{Ac}} = 0,067 \text{ g} + 0,077 \text{ g} - 0,056 \text{ g} = 0,088 \text{ g}$$

$$X_{9\text{Ac}} = \frac{A_{9\text{Ac}}}{A_9} = \frac{0,088 \text{ g}}{94,537 \text{ g}} = 9,308 \times 10^{-4}$$

Balance para Antocianinas en A_9

$$A_{9Ant} = A_{7Ant} - A_{10Ant} \quad \text{Ec. 4.25}$$

$$A_{9Ant} = 0,048 \text{ g} - 0,01996 \text{ g} = 0,02804 \text{ g}$$

$$X_{9Ant} = \frac{A_{9Ant}}{A_9} = \frac{0,02804 \text{ g}}{94,537 \text{ g}} = 2,966 \times 10^{-4}$$

Balance para sólidos en A_9

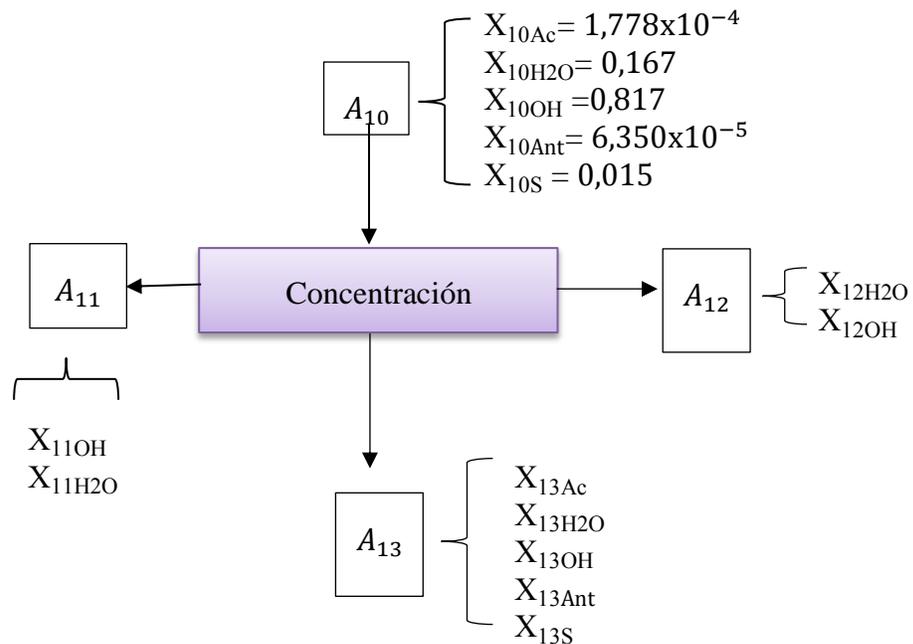
$$X_{9S} = 1 - X_{9Ac} - X_{9H_2O} - X_{9OH} - X_{9Ant} \quad \text{Ec. 4.26}$$

$$X_{9S} = 1 - 9,308 \times 10^{-4} - 0,078 - 0,882 - 2,966 \times 10^{-4}$$

$$X_{9S} = 0,039$$

$$A_{9S} = A_9 * X_{9S} = 3,687 \text{ g}$$

4.6.11.1.4. Balance de Materia de la Etapa de Concentración



Balance Global

$$A_{10}(\text{Extracto de Antocianinas}) = 314,455 \text{ g}$$

$$A_{11}(\text{Etanol recuperado}) = 235,97 \text{ g}$$

$$A_{13} \text{ (Extracto de Antocianinas)} = 19,969 \text{ g}$$

A_{12} (Pérdidas en la concentración)

$$A_{11} + A_{12} + A_{13} = A_{10} \quad \text{Ec. 4.27}$$

Despejando la Ec. 4.27 $A_{10} - A_{11} - A_{13} = A_{12}$

$$314,455 \text{ g} - 235,97 \text{ g} - 19,969 \text{ g} = A_{12}$$

$$A_{12} = 58,516 \text{ g}$$

Balance para A_{11} : Etanol recuperado = 235,97 g

Para determinar la cantidad de alcohol en la corriente A_{11} , se emplea el alcoholímetro dando un valor de 87 °GL, las densidades de la corriente A_{11} en estas condiciones son:

$$\rho_{A_{11}} = 0,8199 \text{ g/ml}$$

$$\rho_{0H} = 0,793 \text{ g/ml}$$

Realizando la corrección de 87°GL a fracción másica:

$$0,87 \frac{\text{ml OH}}{\text{ml sol}} * \frac{0,793 \frac{\text{g}}{\text{ml OH}}}{0,8199 \frac{\text{g}}{\text{ml Sol}}} = 0,8414$$

Balance para el etanol en A_{11}

$$A_{110H} = A_{11} * 0,8414$$

$$A_{110H} = 235,97 \text{ g} * 0,8414 = 198,545 \text{ g}$$

$$X_{110H} = 0,841$$

Balance para el agua en A_{11}

$$X_{11H_2O} = 1 - X_{110H} = 1 - 0,8414 = 0,1586$$

$$A_{11H_2O} = A_{11} * X_{11H_2O} \quad \text{Ec. 4.28}$$

$$A_{11H_2O} = 235,97 \text{ g} * 0,1586 = 37,425 \text{ g}$$

Balance para A₁₃: Extracto de Antocianinas = 19,969 g

Según datos obtenidos en los análisis realizados en el CEANID (Anexo I)

$$X_{13Ac} = \frac{0,28\%}{100\%} = 0,0028$$

$$A_{13Ac} = A_{13} * X_{13Ac} \quad \text{Ec. 4.29}$$

$$A_{13Ac} = 19,969g * 0,0028 = 0,056g$$

Balance para el etanol en A₁₃

Para determinar la cantidad de etanol en la corriente A₁₃, se emplea el alcoholímetro dando un valor de 35 °GL, la densidad de la corriente A₁₃ en estas condiciones es según análisis:

$$\rho_{A13} = 1,032g/ml$$

$$\rho_{0H} = 0,793g/ml$$

Realizando la corrección de 35°GL a fracción másica:

$$X_{13OH} = 0,35 \frac{ml \text{ OH}}{ml \text{ sol}} * \frac{0,793 \frac{g}{ml \text{ OH}}}{1,032 \frac{g}{ml \text{ Sol}}} = 0,269$$

$$A_{13OH} = A_{13} * X_{13OH} \quad \text{Ec. 4.30}$$

$$A_{13OH} = 19,969g * 0,269 = 5,372 \text{ g}$$

La humedad se determina, por análisis en el CEANID (Anexo I)

$$X_{13(H2O+OH)} = \frac{75,71\%}{100\%} = 0,757$$

$$A_{13(H2O+OH)} = A_{13} * X_{13(H2O+OH)} \quad \text{Ec. 4.31}$$

$$A_{13(H2O+OH)} = 19,969g * 0,7571 = 15,118g$$

$$A_{13H2O} = A_{13H} - A_{13OH} \quad \text{Ec. 4.32}$$

$$A_{13H2O} = 15,118g - 5,372g = 9,746g$$

$$X_{13H_2O} = \frac{9,746g}{19,969} = 0,488$$

Según resultados obtenidos en análisis de Antocianinas en el extracto (acápite 5.3)

$$A_{13Ant} = \frac{\frac{103,2mg \text{ de Antocianinas}}{100ml \text{ de extracto}}}{\frac{1,032g}{ml}} * 19,969 \text{ g de extracto conc} = 19,969 \text{ mg}$$

$$= 0,019969g$$

$$X_{13Ant} = \frac{0,019969g}{19,969} = 1 \times 10^{-3}$$

Mediante cálculo se obtiene la cantidad de sólido en A_{13}

$$X_{13S} = 1 - X_{13Ac} - X_{13H_2O} - X_{13OH} - X_{13Ant} \quad \text{Ec. 4.33}$$

$$X_{13S} = 1 - 0,0028 - 0,488 - 0,269 - 1 \times 10^{-3} = 0,239$$

$$A_{13S} = A_{13} * X_{13S} = 19,969 \text{ g} * 0,239 = 4,776 \text{ g}$$

Balance para A_{12} : Pérdidas en la concentración = 58,516 g

Balance para el etanol en A_{12}

$$A_{12} = A_{10OH} - A_{11OH} - A_{13OH} \quad \text{Ec. 4.34}$$

$$A_{12OH} = 256,910g - 198,545g - 5,372g = 52,993g$$

$$X_{12OH} = \frac{A_{12OH}}{A_{12}} = \frac{52,993g}{58,516 \text{ g}} = 0,906$$

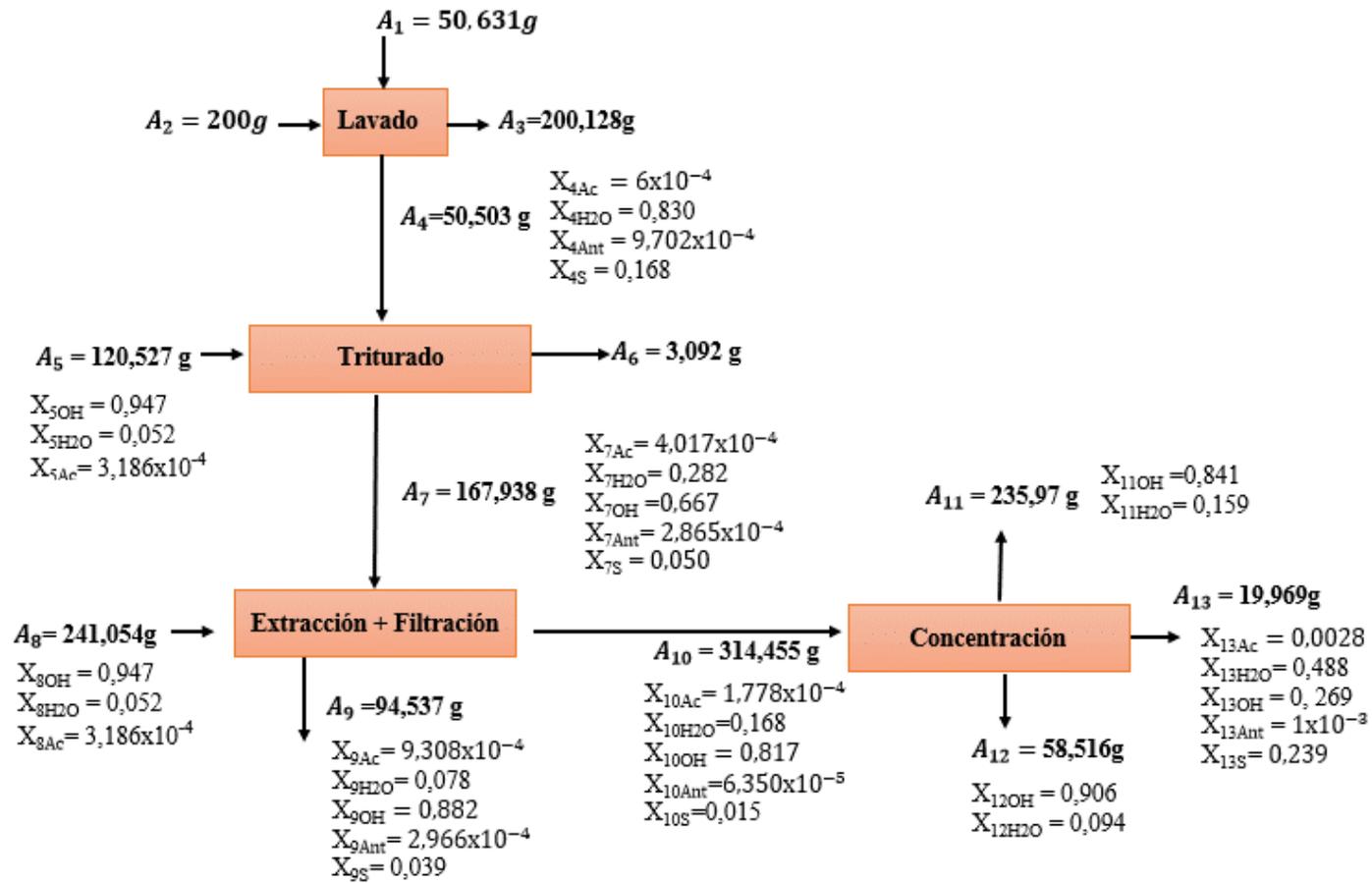
Balance para el agua en A_{12}

$$X_{12H_2O} = 1 - X_{12OH} = 1 - 0,9056 = 0,0944$$

$$A_{12H_2O} = A_{12} * X_{12H_2O} \quad \text{Ec. 4.35}$$

$$A_{12H_2O} = 58,516 \text{ g} * 0,0944 = 5,524 \text{ g}$$

Figura 4- 14: Balance de Materia para la Extracción de Antocianinas de Arándano



Fuente: Elaboración propia, 2019.

4.6.11.2. Balance de Energía

En este acápite se realiza el balance de energía en la etapa de extracción en el agitador magnético, en el sistema rota-evaporación y evaporación condensación.

4.6.11.2.1. Balance de Energía en el Agitador Magnético

La velocidad máxima de trabajo para el agitador magnético es 1500 rpm a 80W. Para obtener los watts a los que trabaja el agitador se hace una relación entre las velocidades y energía utilizada, tomando en cuenta la velocidad de trabajo de 400 rpm.

Potencia = 80W

Velocidad = 1500 rot/min

$$Q_1 = \frac{80 \text{ W} * 400 \text{ rpm/min}}{1500 \text{ rpm/min}} = 21,333 \text{ W} = 0,02133 \text{ Kw}$$

4.6.11.2.2. Balance de Energía en el Rota-Evaporador

La bomba de vacío reduce la presión del sistema en 78 kPa, por lo que la presión del sistema es:

$$P_{\text{sist}} = P_{\text{atm}} - P_{\text{red}} \quad \text{Ec. 4.36}$$

$$P_{\text{sist}} = 101,3 \text{ Kpa} - 78 \text{ Kpa}$$

$$P_{\text{sist}} = 23,3 \text{ Kpa}$$

A esta presión la temperatura de ebullición del etanol es:

$$T_{\text{bOH}} = 41^\circ\text{C}$$

$$Q_{\text{entregado}} = Q_{\text{absorbido}}$$

$$Q_{\text{entregado}} = m_{\text{baño-agua}} * \Delta T * C_{p_{\text{agua}}} \quad \text{Ec. 4.37}$$

$$Q_{\text{entregado}} = 3,8 \text{ Kg} * (45^\circ\text{C} - 18^\circ\text{C}) * 4,186 \text{ Kj/Kg}^\circ\text{C}$$

$$Q_{\text{absorbido}} = Q_{\text{entregado}} = 429,4836 \text{ Kj}$$

$$Q_{\text{absorbido}} = (\Delta T * C_{p_{\text{OH}}} * m_{\text{OH}}) + (\Delta T * m_{\text{ext}} * C_{p_{\text{ext}}}) \quad \text{Ec. 4.38}$$

Calculando el Cp del extracto:

$$C_{p_{\text{ext}}} = \frac{Q_{\text{absorbido}} - (\Delta T * C_{p_{\text{OH}}} * m_{\text{OH}})}{\Delta T * m_{\text{ext}}} \quad \text{Ec. 4.39}$$

$$C_{p_{\text{extracto}}} = \frac{429,4836 \text{ kJ} - \left((41^\circ\text{C} - 18^\circ\text{C}) * 2,513 \frac{\text{Kj}}{\text{Kg}} * 0,294 \text{ Kg} \right)}{(45^\circ\text{C} - 18^\circ\text{C}) * 0,01997 \text{ Kg}}$$

$$C_{p_{\text{MEZCLA}}} = 765, \frac{\text{Kj}}{\text{Kg}}^\circ\text{C}$$

$$Q_2 = 429,4836 \text{ KJ} * \frac{1 \text{ KW}}{3600 \text{ KJ}} = 0,1193 \text{ Kw}$$

La potencia que se necesita para el baño según especificaciones técnicas del equipo es de 1320 W (Anexo III) y por lo que el tiempo mínimo requerido es:

$$Q_{\text{entregado}} = \text{Potencia} * \text{tiempo (s)} \quad \text{Ec. 4.40}$$

$$\text{Tiempo} = \frac{429,4836 \text{ Kj}}{1,320 \text{ Kj/s}}$$

$$\text{Tiempo} = 325,37 \text{ s}$$

4.6.11.2.3. Balance de Energía en el Condensador

Temperatura de salida del serpentín: 20°C, el agua necesaria para condensar el etanol es:

$$Q_3 = Q_4 \quad \text{Ec. 4.41}$$

$$Q_{\text{absorbido}} = Q_{\text{entregado}}$$

$$(\lambda_{\text{OH}} * m_{\text{OH}}) + (m_{\text{OH}} * C_{p_{\text{OH}}} * \Delta T) = m_{\text{agua de cond}} * \Delta T * C_{p_{\text{agua}}} \quad \text{Ec. 4.42}$$

$$m_{\text{agua de cond}} = \frac{(m_{\text{OH}} * \lambda_{\text{OH}}) + (m_{\text{OH}} * C_{p_{\text{OH}}} * \Delta T)}{\Delta T * C_{p_{\text{agua}}}} \quad \text{Ec. 4.43}$$

$$m_{\text{agua de cond}} = \frac{\left(0,294\text{Kg} * 845 \frac{\text{Kj}}{\text{kg}}\right) + (0,294\text{Kg} * 2,513(41 - 20)^{\circ}\text{C})}{(20 - 18)^{\circ}\text{C} * 4,186 \text{ Kj/Kg}^{\circ}\text{C}}$$

$$m_{\text{agua de cond}} = 31,88\text{Kg}$$

$$Q_4 = 31,88 \text{ Kg} * \frac{4,186 \text{ Kj}}{\text{Kg}^{\circ}\text{C}} * (20 - 18)^{\circ}\text{C}$$

$$Q_3 = Q_4 = 266,900\text{Kj} * \frac{1\text{Kw}}{3600\text{Kj}} = 0,074 \text{ Kw}$$

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIONES

V. CAPÍTULO

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Análisis de la Materia: Arándano

Las características de la materia prima utilizada en el presente proyecto de investigación, se detalla a continuación en la tabla V-1.

Tabla V-1: Características de la Materia Prima: Arándano

Arándano (<i>Vaccinium corymbosum</i> L)	
Parámetros	Valor
Humedad (%)	83,04
Proteína (%)	0,98
Grasa (%)	0,10
Cenizas (%)	0,97
Hidratos de carbono (%)	14,91
Fibra (%)	n.d.
Azúcares totales (%)	11,84
Acidez (%)	0,06
Sólidos Solubles (%)	16,9
pH (20°C)	3,33
Densidad relativa	1,0058

Fuente: Centro de Análisis, Investigación y Desarrollo “CEANID”, 2019.

En la tabla V-1, n.d. significa no detectado

5.1.1. Antocianinas en Arándano

Para realizar el análisis de Antocianinas en la materia prima: Arándano, se usa un Espectrofotómetro UV- Visible. Se realiza una extracción en 3 etapas utilizando como solvente el metanol al 1% acidulado con HCl (Anexo II), se realizaron dos extracciones y el análisis se realizó por triplicado mediante el método de pH diferencial, descrito en el acápite 5.3.1.

Tabla V-2: Análisis de Antocianinas en la Materia Prima: Arándano

#	Longitud de onda (nm)				Resultados		
	pH 1		pH 4,5		AM	Promedio	CV
	510	700	510	700	(mg/100 g Arándano)	(mg/100g Arándano)	
1A	0,547	0,015	0,161	0,017	101,076	98,557	3,153
1B	0,545	0,015	0,163	0,015	99,513		
1C	0,55	0,024	0,191	0,03	95,084		
2A	0,546	0,019	0,168	0,019	98,471	96,908	2,794
2B	0,536	0,012	0,168	0,022	98,471		
2C	0,532	0,024	0,159	0,011	93,782		
Concentración de Antocianinas en Arándano					97,73(mg/100 g Arándano)		

Fuente: Elaboración Propia, 2019.

En la tabla V-2: AM = Antocianinas Monoméricas; CV = Coeficiente de Varianza

5.1.2. Análisis de Color en el Arándano

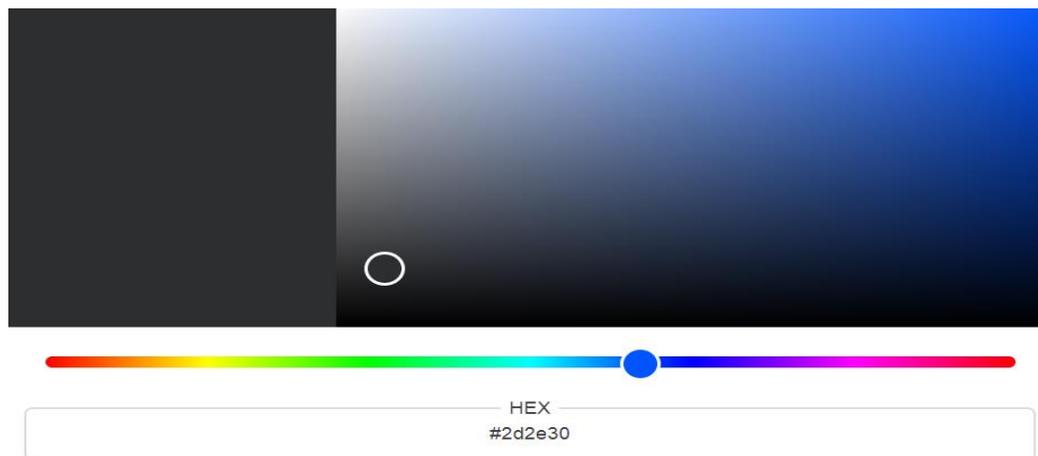
El análisis de color se realiza mediante lectura de las coordenadas CIE L*a* b*, se usa un medidor de Colorimetría CR-400(especificación técnica, ver Anexo III). Se toma una muestra de la baya de Arándano completa y se procede a la lectura directa.

Tabla V-3: Análisis de Color en la Materia Prima: Arándano

# Ensayo	Coordenadas		
	L*	a*	b*
A ₁	21,090	0,28	-1,96
A ₂	17,41	-0,28	-0,89
A ₃	20,36	-0,30	-1,71
A ₄	17,96	-0,30	-0,52
Promedio	19,205	-0,15	-1,27

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la tabla V-3, se observa cuatro lecturas de coordenadas CIE L* a* b*, realizadas a distintas bayas de Arándano, para definir el color característico, se toma en cuenta el promedio de las lecturas.

Figura 5 -1: Color Característico de la Materia Prima: Arándano

En la figura 5-1 se evalúa el color de la baya de Arándano con el valor promedio de Coordenadas CIE L*a*b*(L*:19,205; a*: -0,15; b*:-1,27), convertidas a coordenadas Hexadecimal, sistema que identifica al color con el código #2d2e30.

Según el sistema RGB el color de la baya de Arándano está compuesto por los porcentajes siguientes:

Rojo: 32,37 %

Verde: 33,09%

Azul: 34,53%

5.1.3. Análisis de Antocianinas por HPLC para la Materia Prima: Arándano

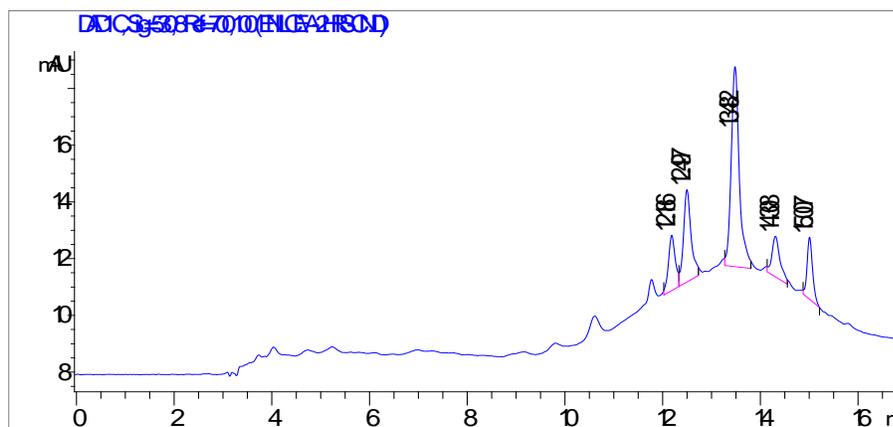
El análisis de Antocianinas con referencia a Cianidina por HPLC (especificación técnica, ver Anexo III), se realiza mediante la inyección al equipo HPLC de 20 µl del extracto metanólico (preparación del extracto metanólico, ver Anexo II) de la materia prima Arándano, con un flujo de 0,8 ml/min. La temperatura de la columna se mantiene constante a 25° C. Para la fase móvil se utiliza un sistema de flujo binario que consiste en:

- Solvente A: 1% de ácido acético/agua
- Solvente B: Metanol

El tiempo de elusión es de 25 min, con un gradiente mostrado en la tabla V-9, la Cianidina es medida por un detector de arreglo de diodos (DAD) a 530nm.

Los resultados mostrados son:

Figura 5 -2: Cromatograma de la Materia Prima: Arándano



Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura 5-2: mAU=Absorbancia; min=Tiempo

En la figura 5-2 se muestra el Cromatograma de la materia prima Arándano, donde el pico más alto hace referencia a la Cianidina con un tiempo de retención de 13,482 min.

La concentración y otros datos obtenidos del Cromatograma son mostrados en la siguiente tabla V-4:

Tabla V-4: Resultado de Análisis por HPLC

Tiempo (min)	Área (µm)	Altura (µm)	Ancho (µm)	Conc. Cianidina (mg/100g)
13,482	81,7	7,1	0,1751	0,140

Fuente: Elaboración propia, 2019.

La concentración de Cianidina en las bayas de Arándano es 0,140 mg por cada 100 g de Arándano.

5.2. Análisis del Producto: Extracto de Antocianinas de Arándano

Las características del producto Extracto de Antocianinas de Arándano, se detalla a continuación en la tabla V-5:

Tabla V-5: Características del Extracto de Antocianinas de Arándano

Extracto de Antocianinas de Arándano	
Parámetros	Valor
Humedad (%)	75,71
Proteína (%)	1,14
Materia grasa	n.d
Cenizas (%)	0,28
Azúcares totales (%)	20,58
Acidez (%)	0,28
Solidos Solubles(°Bx)	27,7

Extracto de Antocianinas de Arándano	
Parámetros	Valor
pH(20°C)	2,95

Fuente: Centro de Análisis, Investigación y Desarrollo “CEANID”, 2019.

5.3. Análisis de la Concentración de Antocianinas en los Extractos

El análisis de concentración de Antocianinas se realiza mediante el método de pH diferencial.

5.3.1. Método de pH Diferencial

Las Antocianinas se someten a transformaciones estructurales reversibles con un cambio en el pH manifestado sorprendentemente por diferentes espectros de absorbancia. A pH 1,0 las Antocianinas existen en la forma altamente coloreada y a pH 4,5 están predominantemente en forma incolora. La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción será proporcional al contenido de Antocianinas. (Whitaker, 2001)

El método de pH diferencial se basa en esta reacción, y permite la medición rápida y precisa del contenido de Antocianinas totales, incluso en la presencia de otros compuestos de interferencia. (Whitaker, 2001)

5.3.1.1. Procedimiento

A una alícuota: 0,01 ml de extracto sólido-líquido, se agrega 5 mL de solución tampón de cloruro de potasio pH 1 y se mide la absorbancia a 510 nm (longitud de onda de máxima absorción de Antocianinas) con un Espectrofotómetro UV- Visible.

Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se mide la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizan contra un blanco de agua ultra pura. La misma dilución y procedimiento se realiza pero utilizando solución tampón de acetato de sodio pH 4.5 con el fin de eliminar la absorbancia debida a la intensidad de color de pigmentos poliméricos amarrados y Antocianinas degradadas. (Anexo II).

La concentración de las Antocianinas se expresa como mg cianidina-3-glucósido/1 L de extracto, calculada de acuerdo a las siguientes expresiones (Wrolstad et al., 2005):

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

$$AT \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{\Delta A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Dónde:

AT: Antocianinas totales.

ΔA : Cambio en la Absorbancia.

PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol.

FD: Factor de dilución.

ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900.

l: Longitud de paso de celda, 1cm.

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos.

Para un mejor tratamiento de datos se expresa la concentración como mg cianidina-3-glucósido/100 ml de extracto, llevando todos los extractos a un volumen de 100 ml, concentrando en el Rota Vapor para eliminar el solvente y aforando en un matraz con alcohol recuperado, sí es necesario, que permite que el análisis se realice en las mismas condiciones para todas las muestras. La fórmula queda reducida en:

$$AT \left(\frac{\text{mg}}{100\text{ml}} \right) = \frac{\Delta A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times l}$$

El detalle de la fórmula es el mismo que el anterior a excepción:

100: Factor de conversión de g a mg y de L a ml.

Tabla V-6: Resultados de Análisis de Antocianinas en los Extractos

# muestra	Longitud de onda				Resultados		
	pH 1		pH 4,5		AM	Promedio	CV
	510	700	510	700	(mg/100ml)	(mg/100ml)	
1A	0,149	0,004	0,017	0,002	65,126	64,625	1,10
1B	0,145	0,002	0,016	0,001	64,124		
2A	0,177	0,010	0,038	0,011	70,136	69,134	2,05
2B	0,185	0,019	0,039	0,009	68,132		
3A	0,128	0,001	0,012	0,001	58,113	58,363	0,61
3B	0,130	0,002	0,011	0,000	58,613		
4A	0,128	0,004	0,017	0,001	54,105	53,604	1,32
4B	0,124	0,002	0,018	0,002	53,103		
5A	0,268	0,045	0,070	0,030	91,678	89,423	3,57
5B	0,263	0,049	0,071	0,031	87,169		
6A	0,180	0,026	0,047	0,021	64,124	65,878	3,76
6B	0,175	0,021	0,045	0,026	67,631		
7A	0,172	0,009	0,018	0,003	74,144	75,396	2,35
7A	0,176	0,011	0,015	0,003	76,648		
8A	0,253	0,013	0,044	0,009	102,699	103,200	0,69
8B	0,251	0,011	0,039	0,006	103,701		
9A	0,143	0,002	0,015	0,000	63,122	63,874	1,66
9B	0,148	0,003	0,016	0,000	64,625		
10A	0,179	0,018	0,038	0,011	67,130	69,134	4,10

# muestra	Longitud de onda				Resultados		
	pH 1		pH 4,5		AM	Promedio	CV
	510	700	510	700	(mg/100ml)	(mg/100ml)	
10B	0,180	0,011	0,039	0,012	71,138		
11A	0,138	0,004	0,026	0,008	58,113	58,864	1,81
11B	0,147	0,014	0,019	0,005	59,615		
12A	0,134	0,012	0,017	0,001	53,103	54,355	3,26
12B	0,136	0,011	0,016	0,002	55,608		
13A	0,253	0,029	0,072	0,029	90,676	90,926	0,39
13B	0,253	0,028	0,074	0,031	91,177		
14A	0,188	0,016	0,040	0,002	67,130	65,126	4,35
14B	0,189	0,027	0,039	0,003	63,122		
15A	0,178	0,018	0,012	0,003	75,646	75,897	0,47
15A	0,182	0,014	0,019	0,003	76,147		
16A	0,249	0,012	0,039	0,008	103,200	100,720	3,48
16B	0,251	0,011	0,045	0,001	98,240		

Fuente: Elaboración Propia, 2019.

En la tabla V-6: AM=Antocianinas Monoméricas; CV=Coeficiente de Varianza

Los análisis se realizan por duplicado, en cada muestra.

5.4. Rendimiento de Antocianinas

El rendimiento de extracción de Antocianinas se calcula mediante la ecuación:

$$\% R = \frac{\text{CA Extracto}}{\text{CA Materia Prima}} * 100\%$$

%R= Porcentaje de Rendimiento de extracción de Antocianinas.

CA Extracto = Cantidad de Antocianinas en el Extracto de Antocianinas en g.

CA Materia Prima = Cantidad de Antocianinas en la Materia Prima: Arándano en g.

Tabla V-7: Rendimiento de Antocianinas en los Extractos

# muestra	pH	Estado	Relación (g/ml)	Rendimiento (%)
1	3,5	Congelado	1:2	23,495
2	3,5	Fresco	1:2	25,212
3	4	Congelado	1:2	26,241
4	4	Congelado	1:3	22,728
5	3,5	Fresco	1:3	36,174
6	4	Fresco	1:2	26,627
7	3,5	Congelado	1:3	27,320
8	4	Fresco	1:3	41,753
9	3,5	Congelado	1:2	28,363
10	3,5	Fresco	1:2	26,664
11	4	Congelado	1:2	24,049
12	4	Congelado	1:3	23,067
13	3,5	Fresco	1:3	33,118
14	4	Fresco	1:2	24,935
15	3,5	Congelado	1:3	30,699
16	4	Fresco	1:3	38,772

Fuente: Elaboración Propia, 2019.

En la tabla V-7, las franjas resaltadas muestran las condiciones en las cuales se logró un mínimo y máximo rendimiento de Antocianinas respecto a la materia prima.

El máximo rendimiento es obtenido con Arándano fresco, a pH 4 y una relación soluto-solvente 1:3 (g/ml).

El mínimo rendimiento es obtenido con Arándano congelado, pH 4 y una relación soluto-solvente 1:3 (g/ml).

5.5. Análisis de Color de los Extractos de Antocianinas de Arándano

El análisis de color se realiza mediante lectura directa de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, con un equipo CR-400 de medición de color de:

Coordenadas CIE $L^*a^*b^*$

Las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$ son un método para expresar el color de un objeto usando una anotación. La Commission Internationale de l'Éclairage (CIE), una organización sin fines de lucro, es considerada como la autoridad en la ciencia de la luz y el color, ha definido espacios de color, incluyendo CIE XYZ, CIE L^*C^*h , y CIE $L^*a^*b^*$, para comunicar y expresar el color objetivamente (Minolta, 2019).

Las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, cuantifican el color mediante la medición del mismo a partir de tres colores primarios de luz que son vistos por el ojo humano, específicamente, el rojo, el verde y el azul. Esta medición de color llamada "tri-estímulos" proporciona datos sobre la cantidad de los tres componentes que están presentes en la luz reflejada (sólidos) o transmitida (típicamente los líquidos) por un producto específico

Este método determina un espacio de color tridimensional donde el eje de a^* y b^* forman un plano ortogonal al eje L^* .

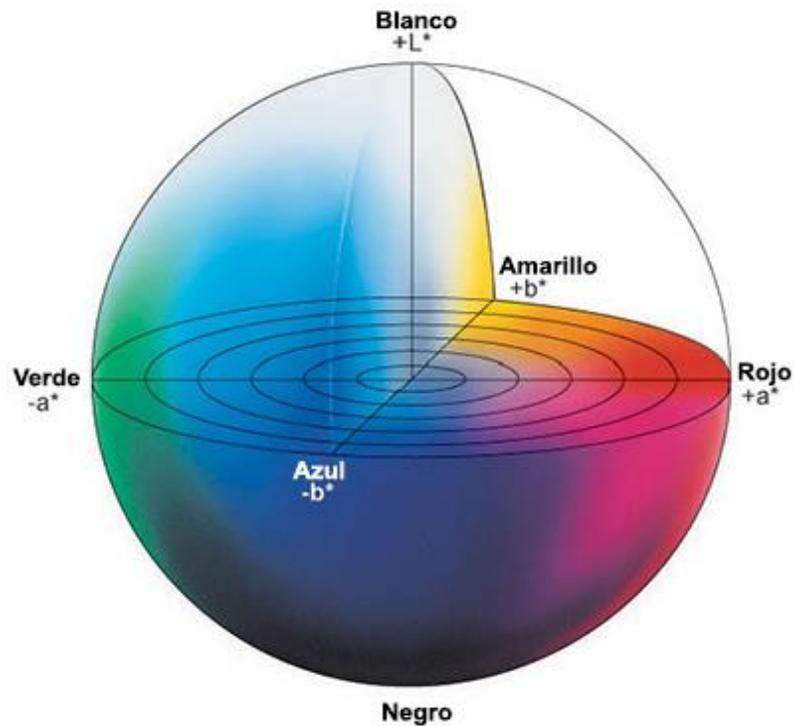
Donde:

L^* = Luminosidad del color.

a^* = Variación de color de verde a rojo.

b^* = Variación de color de amarillo a azul.

Figura 5 -3: Diagrama de Cromaticidad del Espacio de Color



Fuente: Minolta, 2019.

En la figura 5-3, se muestra el diagrama de Cromaticidad con los tonos correspondientes a cada coordenada.

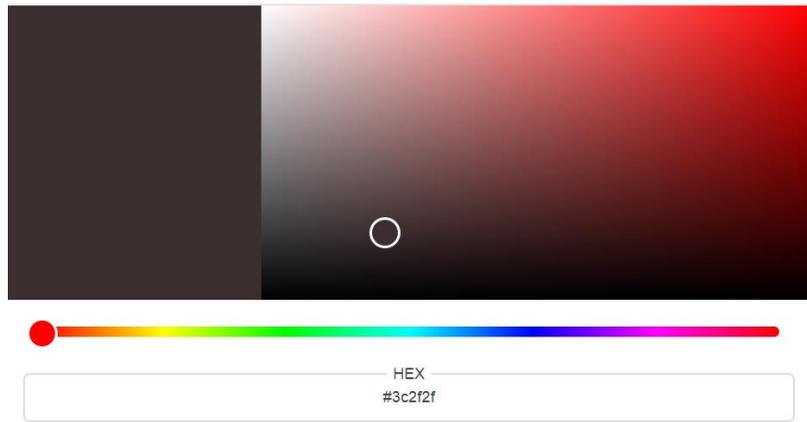
La tabla V-8 se muestra los valores de las coordenadas CIE $L^*a^*b^*$, para todos los extractos. La muestra número 8, cuyo rendimiento de Antocianinas es mayor a los demás extractos, muestra mayores valores en coordenadas CIE $L^*a^*b^*$.

Tabla V-8: Resultados de Análisis de Color en los Extractos

# muestra	Coordenadas		
	L*	a*	b*
1	15,82	6,99	3,22
2	16,74	6,02	2,73
3	14,80	2,44	1,46
4	12,32	1,16	0,91
5	19,15	9,98	2,70
6	16,32	4,16	1,93
7	17,07	4,39	2,11
8	21,22	6,21	2,11
9	15,80	7	3,21
10	16,22	5,82	2,73
11	14,94	2,45	1,57
12	12,95	1,30	0,99
13	19,33	10,33	2,64
14	16,28	3,81	1,91
15	18,10	4,22	2,15
16	20,74	6,36	2,36

Fuente: Elaboración Propia, 2019.

Figura 5 -4: Color Característico del Mejor Extracto



Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura 5-4 se evalúa el color del Extracto de Antocianinas que presenta mayor rendimiento y valores más altos de Coordenadas CIE L*a*b*. El mismo es identificado por tres sistemas: Color Hexadecimal, RGB y Coordenadas CIE L*a*b*.

En el sistema Hexadecimal es identificado con el código #3c2f2f.

En las coordenadas CIE L*a*b*, tiene los siguientes valores:

L*=21,22; a*=6,21; b*=2,11

Según el sistema RGB el color del Extracto de Antocianinas de Arándano está compuesto por los porcentajes siguientes:

Rojo: 38,96 %

Verde: 30,52%

Azul: 30,52%

5.6. Análisis de Antocianinas por HPLC para el Producto: Extracto de Antocianinas.

El análisis de Antocianinas respecto a Cianidina por HPLC (especificación técnica, ver Anexo III), se realiza mediante el análisis de cromatografía del Extracto de Antocianinas de Arándano.

5.6.1. Método de HPLC

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) es una técnica de cromatografía en columna que bombea una muestra o mezcla de analitos con un solvente (fase móvil) con alta presión a través de la columna que contiene la fase estacionaria. Este método tiene la capacidad de separar e identificar los compuestos presentes en una mezcla o muestra (Panarrieta, 2019)

5.6.1.1. Procedimiento

Se inyecta al equipo 20 µl de la muestra y se programa el flujo de 0,8 ml/min. La temperatura de la columna se mantiene constante a 25° C. Para la fase móvil se utiliza un sistema de flujo binario que consiste en:

- Solvente A: 1% de ácido acético/agua
- Solvente B: Metanol

El tiempo de elusión es de 25 minutos bajo el gradiente mostrado en la tabla V-9.

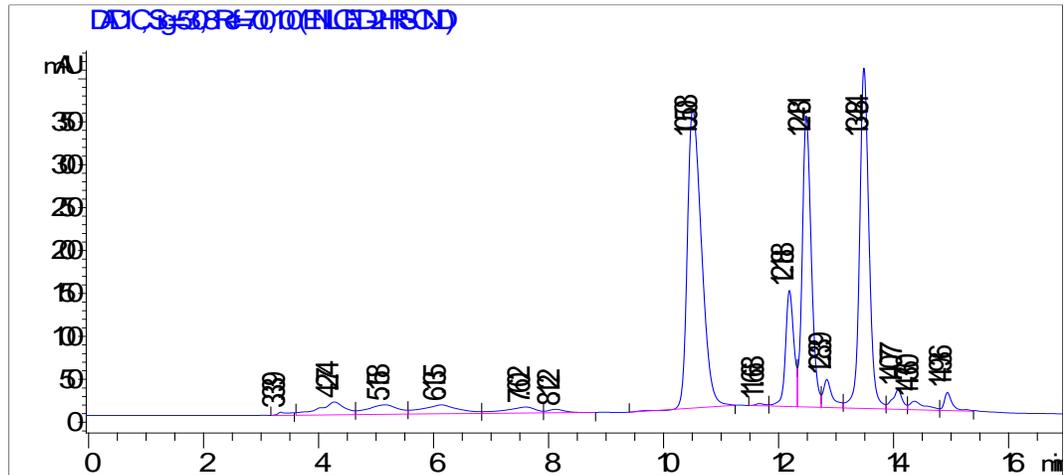
Tabla V-9: Método de análisis, HPLC

Tiempo (min)	% de Metanol
0	20
5	30
10	40
15	50
17	65
19	80
25	20

Fuente: Penarrieta, 2019.

Cianidina es medida por un detector de arreglo de diodos (DAD) a 530nm.

Figura 5-5: Resultado de Análisis de Antocianinas. Muestra # 8

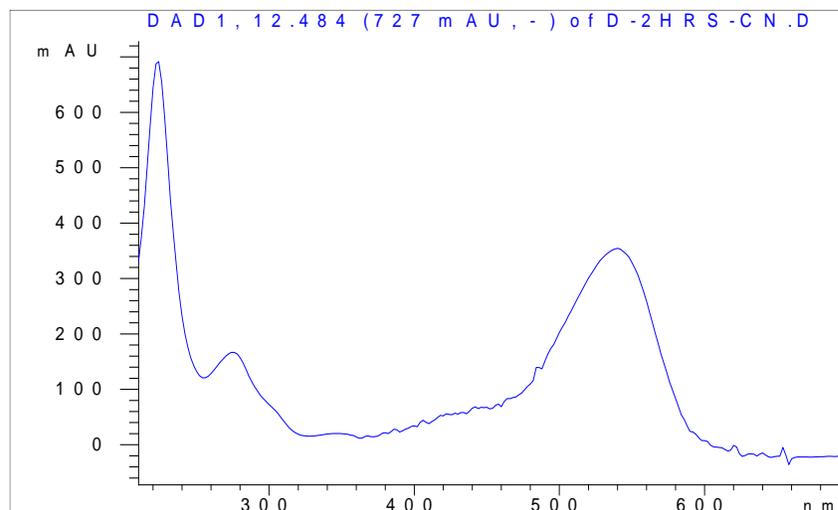


Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura mAU=Absorbancia; min=Tiempo

En la figura 5-5, se observa un Cromatograma del Extracto de Antocianinas de Arándano perteneciente a la muestra número 8, que presenta el mejor rendimiento respecto a Antocianinas Monoméricas. En el Cromatograma se puede observar los picos de distintos analitos, identificado el pico más alto en un tiempo de retención de 13,484 min, pico en el que es identificada la cianidina.

Figura 5-6: Espectro UV-Visible de Cianidina en los Extractos



Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura 5-6: mAU=Absorbancia ; nm=nanómetros (longitud de onda)

En la figura 5-6 se observa el espectro UV-Visible característico de Cianidina, absorbancia vs longitud de onda.

La concentración y otros datos obtenidos de tres muestras analizadas se observan en la siguiente tabla:

Tabla V-10: Resultado de Análisis por HPLC, para los Extractos de Antocianinas

# muestra	Tiempo (min)	Área (μm)	Altura (μm)	Ancho (μm)	Conc. Cianidina (mg/100ml)
4	13,535	32,4	2,9	0,1719	0,054
5	13,274	155,3	12,8	0,1798	0,259
8	13,484	4502	396,3	0,1725	7,503

Fuente: Elaboración Propia, 2019.

En la tabla V-10 se muestran los resultados de tres extractos, se analizaron los extractos con mayor y menor rendimiento, la concentración del extracto con mayor rendimiento es 7,503 mg de Cianidina por cada 100 ml de Extracto de Antocianinas, la que es identificada a un tiempo de retención de 13,484 min.

5.7. Resultados del Balance del Materia y Energía

5.7.1. Resultados del Balance de Materia

Tabla V-11: Resultados de Corrientes en el Balance de Materia

Balance de Materia		
Corriente	Definición	Gramos (g)
A ₁	Arándano	50,631
A ₂	Agua destilada	200
A ₃	Agua + Impurezas	200,128
A ₄	Arándano lavado	50,503

Balance de Materia		
Corriente	Definición	Gramos (g)
A ₅	Etanol acidulado	120,503
A ₆	Pérdidas por triturado	3,092
A ₇	Mezcla de Arándano Triturado	167,938
A ₈	Etanol Acidulado	241,054
A ₉	Pérdidas + torta	94,537
A ₁₀	Extracto bruto	314,455
A ₁₁	Etanol recuperado	235,97
A ₁₂	Pérdidas por concentrado	58,516
A ₁₃	Extracto de Antocianinas	19,969

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-12: Resultado de Fracciones en cada Corriente del Balance de Materia

Balance de Materia			
Corriente	Fracciones	Definición	Fracción
A ₄	X _{4Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	6x10 ⁻⁴
	X _{4H₂O}	Fracción másica de agua	0,830
	X _{4Ant}	Fracción másica de Antocianinas	9,702x10 ⁻⁴
	X _{4S}	Fracción másica de sólidos	0,168
A ₅	X _{5OH}	Fracción másica etanol	0,947
	X _{5H₂O}	Fracción másica de agua	0,052
	X _{5Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	3,186x10 ⁻⁴
A ₇	X _{7Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	4,017x10 ⁻⁴
	X _{7H₂O}	Fracción másica de agua	0,282
	X _{7OH}	Fracción másica de alcohol	0,667
	X _{7Ant}	Fracción másica de Antocianinas	2,865x10 ⁻⁴
	X _{7S}	Fracción másica de sólidos	0,050

Balance de Materia			
Corriente	Fracciones	Definición	Fracción
A ₈	X _{8OH}	Fracción másica etanol	0,947
	X _{8H₂O}	Fracción másica de agua	0,052
	X _{8Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	3,186x10 ⁻⁴
A ₉	X _{9Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	9,308x10 ⁻⁴
	X _{9H₂O}	Fracción másica de agua	0,078
	X _{9OH}	Fracción másica de etanol	0,882
	X _{9S}	Fracción másica de sólidos	2,966x10 ⁻⁴
	X _{9Ant}	Fracción másica de Antocianinas	0,062
A ₁₀	X _{10Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	1,778x10 ⁻⁴
	X _{10H₂O}	Fracción másica de agua	0,168
	X _{10OH}	Fracción másica de etanol	0,817
	X _{10S}	Fracción másica de sólidos	0,015
	X _{10Ant}	Fracción másica de Antocianinas	6,350x10 ⁻⁵
A ₁₁	X _{11H₂O}	Fracción másica de agua	0,159
	X _{11OH}	Fracción másica de etanol	0,841
A ₁₂	X _{12OH}	Fracción másica de alcohol	0,906
	X _{12H₂O}	Fracción másica de agua	0,094
A ₁₃	X _{13Ac}	Fracción másica de ácido cítrico	0,0028
	X _{13OH}	Fracción másica de alcohol	0,269
	X _{13H₂O}	Fracción másica de agua	0,488
	X _{13Ant}	Fracción másica de Antocianinas	1x10 ⁻³
	X _{13S}	Fracción másica de sólidos	0,239

Fuente: Elaboración propia, 2019.

5.7.2. Resultados del Balance de Energía

Tabla V-13: Resultados del Balance de Energía

Balance de Energía		
Equipo	Termino	Kilowatt (Kw)
Agitador magnético	Q ₁	0,021
Rota - evaporador	Q ₂ evaporador	0,119
	Q ₃ de condensación	0,074

Fuente: Elaboración propia, 2019.

5.8. Rendimiento del Proceso Tecnológico

$$\eta_{\text{rend}} = \frac{\text{masa del extracto}}{\text{masa de Arándano}} = \frac{19,969\text{g}}{50,503\text{g}} * 100 = 39,540\%$$

Donde:

η_{rend} = Rendimiento del Proceso Tecnológico

Para el rendimiento del proceso tecnológico, se toma en cuenta la cantidad de Extracto concentrado final respecto a la masa inicial de Arándano fresco, debido a que el objetivo del proyecto, es obtener un Extracto enriquecido en Antocianinas de Arándano.

5.9. Rendimiento de Antocianinas

El rendimiento de Antocianinas se calcula mediante la ecuación:

$$\eta_{\text{Ant}} = \frac{\text{CA Extracto}}{\text{CA Materia Prima}} * 100\%$$

Donde:

η_{Ant} = Rendimiento de Antocianinas.

CA Extracto = Cantidad de Antocianinas en el Extracto de Antocianinas en mg.

CA Materia Prima = Cantidad de Antocianinas en la Materia Prima: Arándano en mg.

$$\eta_{\text{Ant}} = \frac{20,7 \text{ mg}}{49,5 \text{ mg}} * 100\%$$

$$\eta_{\text{Ant}} = 41,753\%$$

Para el rendimiento de Antocianinas, se toma en cuenta la cantidad de Antocianinas en el Extracto final respecto a la cantidad de Antocianinas contenidas inicialmente en el Arándano fresco.

5.10. Análisis Estadístico del Diseño Experimental

Para el tratamiento estadístico de los datos del diseño factorial, se utilizó el programa SPSS STATISTICS 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences).

5.10.1. Análisis de Varianza Univariante

Se realiza un Análisis de Varianza Univariante, para poder determinar la influencia de los factores pH, estado de la materia prima: Arándano y relación materia prima-solvente, verificando si todos los factores y sus combinaciones son significativos respecto a la variable respuesta rendimiento de Antocianinas según la tabla V-7.

Los factores inter-sujetos se muestran en la figura 5-7 con la codificación de cada nivel.

Figura 5-7: Factores Inter-Sujetos

Factores inter-sujetos		
		N
pH	-1,000	8
	1,000	8
Estado	-1,000	8
	1,000	8
Relación	-1,000	8
	1,000	8

Fuente: Elaboración propia SPSS, 2019.

La figura 5-7 muestra las pruebas inter-sujetos realizadas para determinar las variables significativas.

Figura 5-8: Pruebas Inter-Sujeto**Pruebas de efectos inter-sujetos**

Variable dependiente: Rendimiento

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.
Modelo corregido	396,400 ^a	6	66,067	11,633	,001
Interceptación	13028,168	1	13028,168	2293,960	,000
pH	1,909	1	1,909	,336	,576
Estado	124,546	1	124,546	21,930	,001
Relación	128,777	1	128,777	22,675	,001
pH * Estado	30,410	1	30,410	5,354	,046
Estado * Relación	110,565	1	110,565	19,468	,002
pH * Relación	,194	1	,194	,034	,857
Error	51,114	9	5,679		
Total	13475,682	16			
Total corregido	447,514	15			

a. R al cuadrado = ,886 (R al cuadrado ajustada = ,810)

Fuente: Elaboración propia, 2019.

La franja de color, muestran los resultados de la variable pH y pH*relación, indicando que no son significativas, por lo que serán despreciables posteriormente.

5.10.2. Determinación del Modelo Matemático

Para determinar el modelo matemático se realiza una regresión con todas las variables significativas; estado de la materia prima: Arándano fresco-congelado, relación soluto/solvente, pH*Estado y Estado*Relación y como variable dependiente el rendimiento de Antocianinas que se muestran en la tabla V-14.

Tabla V-14: Variables para la Regresión

# muestra	pH	Estado	Relación	pH*Estado	Estado*Relación	Rendimiento (%)
1	-1	-1	-1	1	1	23,495
2	-1	1	-1	-1	-1	25,212
3	1	-1	-1	-1	1	26,241
4	1	-1	1	-1	-1	22,728
5	-1	1	1	-1	1	36,174
6	1	1	-1	1	-1	26,627
7	-1	-1	1	1	-1	27,32
8	1	1	1	1	1	41,753
9	-1	-1	-1	1	1	28,363
10	-1	1	-1	-1	-1	26,664
11	1	-1	-1	-1	1	24,049
12	1	-1	1	-1	-1	23,067
13	-1	1	1	-1	1	33,118
14	1	1	-1	1	-1	24,935
15	-1	-1	1	1	-1	30,699
16	1	1	1	1	1	38,772

Fuente: Elaboración propia, 2019.

En la figura 5-9 y 5-10, se muestra un resumen del modelo matemático y del análisis Anova para el rendimiento de Extracto de Antocianinas de Arándano, donde el exponente hace referencia a las variables: predictoras (Constante), Estado*Relación, pH*Estado.

Figura 5-9: Resumen del Modelo Matemático
Resumen del modelo^b

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación
1	,939 ^a	,881	,838	2,199517

a. Predictores: (Constante), Estado Relación, pH Estado.

b. Variable dependiente: Rendimiento

Fuente: Elaboración propia, SPSS 18.0

El análisis de varianza (Anova) en la figura 5-10 muestra un nivel de significación que tiende a cero, demostrando que el modelo matemático escogido es el correcto.

Figura 5-10: Resultados del Análisis Anova

ANOVA^a

Modelo	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
1 Regresión	394,298	4	98,574	20,376	,000 ^b
Residuo	53,217	11	4,838		
Total	447,514	15			

a. Variable dependiente: Rendimiento

b. Predictores: (Constante), Estado Relación, pH Estado.

Fuente: Elaboración propia, SPSS 18.0, 2019.

En la figura 5-11 se muestran los coeficientes para el modelo matemático de rendimiento de Antocianinas de Arándano.

Figura 5-11: Coeficientes del Modelo Matemático

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	95,0% intervalo de confianza para B	
	B	Error estándar	Beta			Límite inferior	Límite superior
	(Constante)	28,535	,550				51,894
Estado	2,790	,550	,528	5,074	,000	1,580	4,000
Relación	2,837	,550	,536	5,159	,000	1,627	4,047
pHEstado	1,379	,550	,261	2,507	,029	,168	2,589
Estado Relación	2,629	,550	,497	4,781	,001	1,418	3,839

a. Variable dependiente: Rendimiento

Fuente: Elaboración propia, SPSS 18.0, 2019.

Según los coeficientes indicados en la figura 5-11, el modelo matemático para la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano responde a la ecuación:

$$Y = 28,535 + 2,790X_1 + 2,837X_2 + 1,379X_3 + X_1 + 2,629X_1 * X_2$$

Donde:

X_1 = Estado.

X_2 = Relación soluto/solvente (g/ml).

X_3 = pH.

$X_3 * X_1$ = Interacción pH y Estado.

$X_1 * X_2$ = Interacción Estado y Relación.

Y = Rendimiento % de antocianinas.

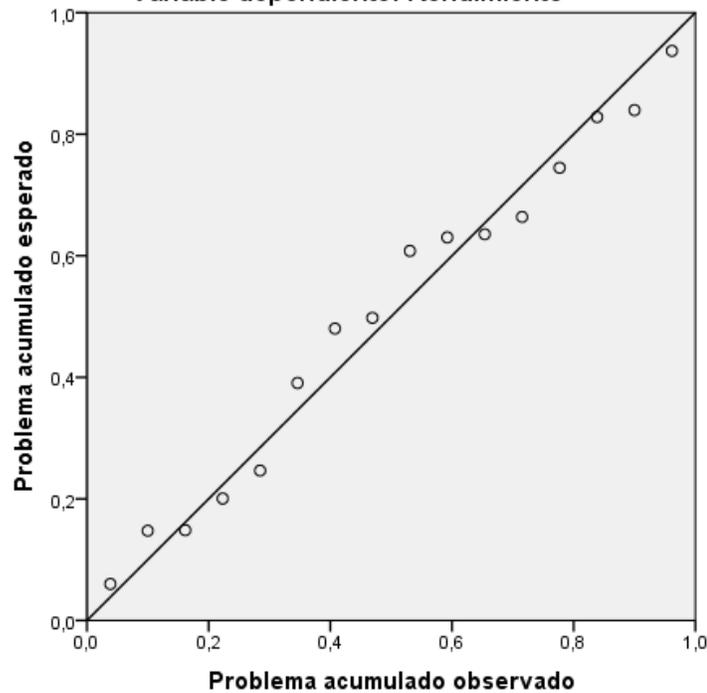
Cada una de las variables introducidas y el rendimiento están relacionada con la ecuación.

En la figura 5-12 se puede observar el modelo escogido y la posición de los puntos respecto al modelo, algunos puntos no se ajustan al modelo, sin embargo, según el análisis Anova no muestra gran significancia el desajuste, motivo por el cual el modelo escogido es correcto.

Figura 5-12: Modelo Lineal.

Gráfico P-P normal de regresión Residuo estandarizado

Variable dependiente: Rendimiento



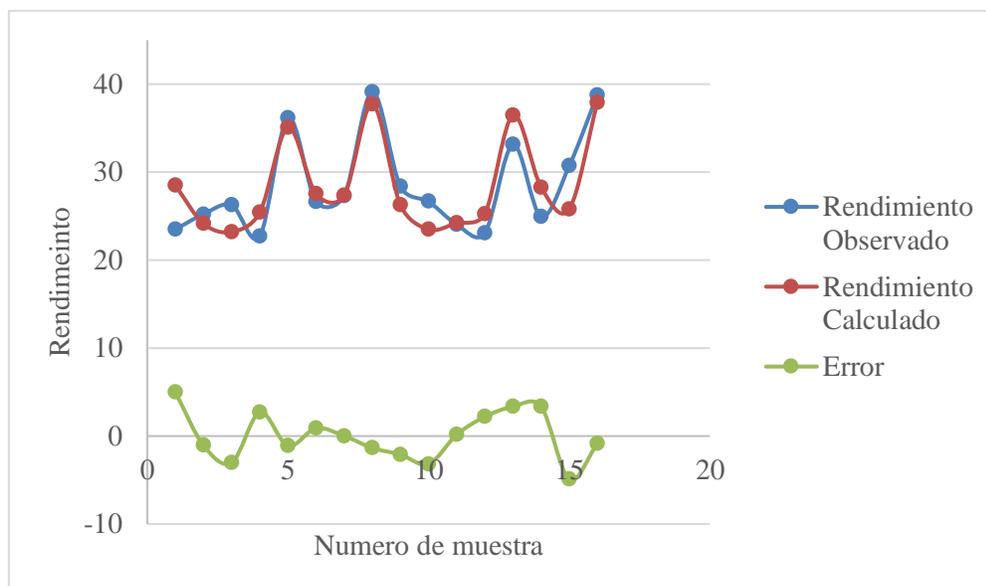
Fuente: Elaboración propia, SPSS 18.0, 2019.

Según el modelo lineal; se obtiene un nuevo rendimiento, recibe el nombre de rendimiento calculado, el que a continuación se gráfica junto al rendimiento observado que fue obtenido de cada experimento, para poder verificar el ajuste de la ecuación al modelo matemático.

Tabla V-15: Resultado de Rendimientos de Extracto de Antocianinas.

# muestra	Rendimiento Observado	Rendimiento Calculado	Error
1	23,495	28,470	4,975
2	25,212	24,149	-1,063
3	26,241	23,212	-3,029
4	22,728	25,414	2,686
5	36,174	35,066	-1,108
6	26,627	27,516	0,889
7	27,320	27,338	0,017
8	41,753	40,400	-1,353
9	28,363	26,258	-2,105
10	26,664	23,489	-3,175
11	24,049	24,208	0,159
12	23,067	25,260	2,193
13	33,118	36,455	3,337
14	24,935	28,285	3,350
15	30,699	25,802	-4,897
16	38,772	37,896	-0,876

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Figura 5-13: Rendimientos Observado, Calculado y Error.

Fuente: Elaboración propia, 2019.

5.11. Análisis de Costos

5.11.1. Costo del Estudio

Para determinar el presupuesto de investigación se realiza la evaluación de costos directos, que se realizan durante la elaboración de todo el proyecto. Las siguientes tablas muestran los detalles de los costos indirectos.

Tabla V-16: Detalle de costos de Materia Prima, Solventes y Reactivos.

Item	Descripción	Unidad	Cantidad	Valor Unitario (Bs)	Valor total (Bs)
Materia prima	Arándano	Kg	6	75,00	450,00
Solvente	Etanol	L	15	8,00	120,00
	Metanol	L	0,2	200,00	40,00

Item	Descripción	Unidad	Cantidad	Valor Unitario (Bs)	Valor total (Bs)
Reactivos	Ácido cítrico	Kg	0,5	25,00	12,50
	Ácido clorhídrico(0,1N)	ml	200	0,300	60,00
	Solución buffer KCl pH 1	L	1	200,00	200,00
	Solución Buffer NaC ₂ H ₃ O ₂ pH 4,5	L	0,5	200,00	100,00
	Hidróxido de Sodio	g	32	0,500	16,00
	Agua destilada	L	4	5,00	20,00
	Subtotal (a)				1.018,500

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-17: Detalle de Costos de Materiales.

Item	Descripción	Unidad	Cantidad	Costo Unitario (Bs)	Costo total (Bs)
Papel filtro	Whatman 42	pieza	60	2,00	120,00
Botellas de vidrio ambar	1000 ml	pza	2	20,00	40,00
	150 ml	pza	8	10,00	80,00
	30 ml	pza	16	5,00	80,00
Vaselina	Sólida	g	20	0,200	4,00

Item	Descripción	Unidad	Cantidad	Costo Unitario (Bs)	Costo total (Bs)
Bolsitas de polietileno	70x8 mm	pza	50	0,160	8,00
	Subtotal(b)				332,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-18: Detalle de Costos de Análisis.

Descripción	Parámetros	Cantidad	Costo Unitario (Bs)	Costo Total (Bs)
Arándano	Acidez	1	30,00	30,00
	Azúcares Totales	1	100,00	100,00
	Sólidos solubles	1	20,00	20,00
	pH	1	20,00	20,00
	Proximales	1	370,00	370,00
Extracto de Antocianinas	Acidez	1	30,00	30,00
	Azúcares Totales	1	100,00	100,00
	Humedad	1	40,00	40,00
	Sólidos solubles	1	10,00	10,00
Subtotal(c)				260,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-19: Detalle de Costos Material de Apoyo.

Descripción	Unidad	Cantidad	Costo Unitario (Bs)	Costo total (Bs)
Internet	meses	6	160,00	960,00
Mano de Obra	meses	6	1.000,00	6.000,00
Pasajes	meses	6	250,00	1500,00
Papel	resma	2	30,00	60,00
Tinta	ml	200	1,00	200,00
Anillado	-	4	5,00	20,00
Empastado	-	3	50,00	150,00
Subtotal(d)				8.890,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-20: Detalle de Costos Totales.

Descripción		Costo total (Bs)
a)	Detalle de costos de materia prima, solventes y reactivos.	925,00
b)	Detalle de costos de materiales.	485,00
c)	Detalle de costos de análisis.	260,00
d)	Detalle de costos material de apoyo.	8.890,00
e)	Imprevistos= 0,1 del total de costos en el detalle.	1.056,00
Total		11.616,00

Fuente: Elaboración propia, 2019.

El costo total de la investigación será 11.616,00 Bs.

5.11.2. Costo de Producción

A partir de los balances de materia y energía puede estimarse el costo de producción para Obtención de Extracto de Antocianinas del Arándano.

Los costos son; energía eléctrica 0,6 Bs/ KWh, agua 0,7 Bs/m³, el etanol 17 Bs/ litro y agua destilada 5Bs/litro.

De los 50,503 g de Arándano fresco se extraen aproximadamente 20 ml de Extracto de Antocianinas.

Las siguientes tablas estiman el costo de producción sin considerar el salario del operador.

Tabla V-21: Costo de Funcionamiento de los Equipos.

Proceso	Requerimiento energético				
	Potencia (kw)	Tiempo (hr)	Energía (kwh)	Costo Unitario (Bs)	Costo Total (Bs)
Agitación	0,02133	4,500	0,960	0,128	0,576
Filtración y Evaporación(Bomba)	0,57	5,177	2,951	0,342	1,770
Rota-vapor	0,1933	0,677	0,1309	0,115	0,078
Total					2,424

Fuente: Elaboración propia, 2019.

Tabla V-22: Costo de Material.

Agua	Cantidad	Unidad	Costo Unitario(Bs)	Costo Total(Bs)
Lavado	0,2	Litro	5,00	1,00
Baño Rota-vapor	3,8	Litro	0,07	0,266
Agua como refrigerante	31,880	Litro	0,07	2,232
Solventes y materia prima	Cantidad	Unidad	Costo Unitario(Bs)	Costo Total(Bs)
Etanol	0, 2	Litro	17,00	3,40
Ácido cítrico	$3,2 \times 10^{-4}$	Litros	30,00	$3,2 \times 10^{-4}$
Arándano	0,05	Kilogramos	70,00	3,50
Gastos Extras	Cantidad	Unidades	Costo Unitario(Bs)	Costo Total(Bs)
Botella de vidrio ambar para presentación	1	Unidades	2,0	2,000
Gasto Energético				2,424
Total				20,222

Fuente: Elaboración propia, 2019.

El costo total de producción aproximado es de 20,5 Bs para la producción de 19 ml de Extracto de Antocianinas de Arándano “Que contiene 0,01996 g de Antocianinas”, partiendo de 50,503 g de Arándano fresco, con 200 ml de etanol al 96°GL.

Si se considera el factor de seguridad 1,5, el costo de producción es:

30,75 Bs por cada 19 ml de Extracto de Antocianinas.

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

VI. CAPÍTULO

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente proyecto, se tienen las siguientes conclusiones:

- Los parámetros fisicoquímicos más importantes analizados por el laboratorio del CEANID del Arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) utilizado para el proceso de extracción es de variedad Highbush-Misty, producido en la comunidad de Turumayo- Tarija, son: Ceniza 0.97, Fibra n.d, Grasa 0.10%, Humedad 83.04%, Proteína 0.1%, Azúcares Totales 11.84 %, Acidez 0.06 %, pH 3,33 y densidad relativa 1,0058.

El color característico de la baya de Arándano tiende a azul, con las siguientes coordenadas

CIE L*a*b*:

L*=19,205

a*=-0,15

b*=-1,27

El análisis por HPLC muestra un resultado de 0,140 mg/100 g de Cianidina en las bayas de Arándanos.

- El método de extracción seleccionado según una matriz de decisión es sólido-líquido, considerando un mejor rendimiento, menor costo y una menor complejidad del método a diferencia de otros, como el de fermentación. El solvente escogido es etanol al 96% acidulado con ácido cítrico, con el objetivo de que el producto sea compatible para el uso humano.
- Las Antocianinas al igual que otros colorantes naturales tienden a ser inestables frente a una variedad de factores, como la temperatura, el pH, la luz, el estado de la materia prima y otros.

En el presente estudio se tomó en cuenta el análisis de tres factores con dos niveles como variables independientes, formulando un diseño de 2³. Los factores

estudiados en sus respectivos niveles son: pH (3,5 y 4); estado de la materia prima (fresco y congelado) y relación soluto: solvente (1:2 y 1:3)g/ml.

- Concluida la parte experimental y según la mejor variable de respuesta se determina las condiciones más óptimas para la Obtención de Extracto de Antocianinas de Arándano: pH 4, Arándano fresco y relación soluto: solvente 1:3 g/ml.
- Según el balance de materia y energía, el costo aproximativo de producción para 19 ml de extracto es de 20.5 Bs, considerando los gastos de energía y materia.
- A partir de 50.503 g de Arándano, se obtiene 19,969 g de extracto. El rendimiento del proceso respecto a la Obtención de Extracto de Antocianinas es 39.540 %.
- En 50.503 g de Arándano se logra identificar 49,5 mg de antocianinas, en 19,969 g de extracto se obtiene 20,7 mg de Antocianinas, dando como rendimiento de Antocianinas 41,753 %.
- Los parámetros fisicoquímicos más importantes del producto obtenido Extracto de Antocianinas de Arándano analizados por el laboratorio del CEANID son: Ceniza 0.28, Grasa n.d, Humedad 75.71%, Proteína 1.14%, Azúcares Totales 20,58 %, Acidez 0.28 %, pH 2.95 y densidad relativa 1,032.

El color característico del producto es rojizo, con las siguientes coordenadas

CIE L*a*b*:

L*=21,22

a*=6,21

b*=2,11

El análisis por HPLC muestra un resultado de 7,503 mg/100 ml de Cianidina en el Extracto de Antocianinas de Arándano.

- Según el análisis estadístico, no existe significancia en el rango de pH trabajado (3,5 y 4), por lo que se concluye que en mencionado rango de trabajo no existe una variación significativa respecto al Rendimiento de Antocianinas.

Debido a la no significancia en el rango de pH, es conveniente trabajar en pH 4, para disminuir los costos respecto a ácido cítrico.

- Según el análisis de color: La variación del color de los extractos está relacionada con la concentración de Antocianinas, mientras más altos sean los valores de L* (Luminosidad) y a*(Tono rojizo) en las coordenadas CIE L*a*b* mayor es la concentración de Antocianinas en el Extracto.

6.2. Recomendaciones

- Utilizar este mismo ensayo para evaluar otras variedades de Arándano presentes en el departamento de Tarija, que pueden ser interesantes para el mismo objetivo.
- Las Antocianinas como colorante natural, al ser liposoluble tiene ventaja de formar parte de productos como jugos, dulces, para enriquecer y dar valores agregados a dichos productos. Así también estudiar la calidad y uso apropiado en los alimentos.
- Se recomienda el uso de solventes no tóxicos en la etapa de extracción, debido a que si se desea incluir las Antocianinas en matrices alimenticias, es vital que no sean tóxicas, pues cualquier remanente tóxico puede afectar la calidad de vida del ser humano.
- Las antocianinas tienden a tener un tiempo de vida menor si las condiciones del producto son en estado líquido, por lo que es recomendable realizar un proceso de liofilización o secado spray para la Obtención de Extracto de Antocianinas en estado sólido.
- Para futuros estudios; Reutilizar el etanol recuperado en el proceso de destilación y con el agua que fue utilizada para su condensación en el equipo Rota-Evaporador.
- Se recomienda realizar la investigación a diferentes rangos de pH, con niveles más altos y bajos, de los trabajados, debido que a pH (3,5 y 4) no se encontró significancia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera Ortiz M. (2011). *Propiedades funcionales de las antocianinas*, en: Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud, N°2. Volumen 13 pp 16- 22. Agosto de 2011, Universidad de Sonora. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283361581_Propiedades_funcionales_de_las_antocianinas.

Agrogojar . (20 de Julio de 2018). Obtenido de <https://agrogojarviveros.com/frutas-del-bosque/>

Aguilar Quispe, L. A., & Carcausto, C. K. (2017). *Atomización de Extracto Antociánico de Flores de Mastuerzo (Tropaeolum majus L.) para su uso en Salchichas tipo Frankfurt* . Perú.

AméricaEconomía.com. (15 de Agosto de 2010). *América Economía* . Obtenido de <https://www.americaeconomia.com/negocios-industrias/productores-de-chile-argentina-y-uruguay-promueven-el-consumo-de-arandanos-en-in>

Alvarado Juan Antonio.(2011). *Protocolos de Análisis - Centro de Investigaciones en Química de Alimentos I.I.Q.* Análisis de la TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox)

Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. (2004). *Antiangiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. Biochemistry (Mosc)*, en: Biochemistry, N° 1. Volumen 69, pp 75-80. 2004. Bagchi, Sen, Bagchi, Atalay.

Brouillard R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. En: Markakis P, (ed.). Anthocyanins as food colours. New York: Academic Press, pág. 1-40.

Cacace, J. E., & Mazza, G. (20 de July de 2006). *Wiley Online Library*. Obtenido de Optimization of Extracction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2621.2003.tb14146.x>

Camavilca Cordova , M., & Leyva Aliaga, M. J. (2015). *Identificación de Antocianinas y Carotenoides en Flores De Mastuerzo(Tropaeolum majus) por Cromatografía en Capa de Fina.* Perú.

Castañeda, A., & Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Programa de Doctorado en Ciencias de Alimentos*, 25-33. Obtenido de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf>

Caillet S, Côté J, Sylvain JF and Lacroix M. Antimicrobial effects of fractions from cranberry products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*. 2012; 23: 419-28.

Colque Valdez D. (2017). *Obtención de Colorante Natural (antocianinas) del Hollejo de la Uva Negra.* Investigación Aplicada (Licenciatura en Ing. Química). Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Facultad de Ciencias y Tecnología. Tarija (Bolivia).

Diario Oficial de la Unión Europea. (11 de Noviembre de 2011). *Diario Oficial de la Unión Europea.* Obtenido de Reglamento (UE) N° 1129/2011: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:ES:PDF>

Faria A, Oliviera J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, De Freitas V, Mateus N. (2005). *Antioxidant Properties of Prepared Blueberry (Vaccinium myrtillus) Extracts.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Agosto de 2005.

Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16104817>

Fava, J. (54 de mayo de 2012). Anatomía Aplicada al Diseño de Tecnologías de Procesamiento mínimo en Frutos(bayas). Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Argentina. Obtenido de digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n5131_Fava.pdf

Fieser F., L., & Mary, F. (1966). *Química Organica Superior.* España: Ediciones Grijalbo, S. A.

Fuentes Miranda W. V. (2005). *Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos de Prunus capuli Cav. (Cereza), Rubus*

urticaefolius Poir. (Mora) y *Sambucus canadensis L. (Saúco)* como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales rojo No.40, rojo No.3 y rojo No.2, en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5. Tesis (Químico). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala (México).

Gaviria Mejía , M. A., & Mejía, A. M. (2012). *Evaluación de la Extracción de Colorantes de la Semilla de Aguacate como Negocio para la Región Antigua.* Obtenido de <https://es.slideshare.net/maldidochurin/admo0766>

Garzón, G. A. (2008). Las Antocianinas como Colorantes Naturales y Compuestos Bioactivos: Revisión. *Acta biol. Colomb*, 13(3), 27-36.

G. Skrede, R.E. Wrolstad, And R.W. Durst. (2000). *Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (Vaccinium corymbosum L.)* en: Sensory and Nutritive Qualities of Food, N° 2. Volumen 65, pp 357-364. 2000, Institute of Food Technologists

Gonzalez Villa, A. (Abril de 2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos de Plantas del Amazonas.* Obtenido de [www.bdigital.unal.edu.co › angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf](http://www.bdigital.unal.edu.co/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf)

He J and Giusti MM. (2010) Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, pág. 163-87.

Hernández Linares, V. M. (2016). *Extracción de Antocianinas a partir del Maíz Morado (ZEA mays L) para ser utilizado como Antioxidante y Colorante en la industria Alimentaria.* (F. d. Alimentarias, Ed.) Perú: Universidad Nacional "Pedro Ruíz Gallo".

Hidalgo Jerez, M. (2012). *Antocianos: metabolismo y actividad biológica.* Obtenido de Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria: eprints.ucm.es/20093/1/T34345.pdf

Ibarz, A., & Barbosa Cánovas, G. V. (2005). *Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos.* Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

Jayaprakasam B, Vareed SK, Olson LK and Nair MG. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53: 28-31.

Jijena Arroyo P.A. (2017). *Deshidratación Osmótica Del Arando*. Investigación Aplicada (Licenciatura en Ing. Química). Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Facultad de Ciencias y Tecnología. Tarija (Bolivia).

Kuskoski E.M, Asuero AG, Troncoso A.M, Mancini-Filho J, Fett R. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*, en: *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, N° 4. Volumen 25, pp 726-732. Diciembre de 2005. Campinas.

Laurentis, R. B. (2014). *Antocianinas*. Recuperado el 3 de mayo de 2018, de CHR. HANSEN: <https://www.chr-hansen.com/es/natural-colors/a-rainbow-of-colors/red-violet-purple/anthocyanin#>

Marcal Consultores (2017) *Se incrementa la producción de arándano en el Valle Central de Tarija*. Fecha de consulta: 20 marzo 2018

Disponible en: <http://www.marcal.com.bo/>

Martínez. G., G., Asacio V., J. A., Sepúlveda T., L., Rodríguez H., R., Aguilera C., A., & Aguilar, C. (2013). Extracción Asistida por Fermentación Fúngica de Antioxidantes Fenólicos. *Acta Química Mexicana*, 5(9), 16-24. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Leonardo_Sepulveda3/publication/256373606_Extraccion_Asistida_por_Fermentacion_Fungica_de_Antioxidantes_Fenolicos/links/02e7e5226012a37fbf000000/Extraccion-Asistida-por-Fermentacion-Fungica-de-Antioxidantes-Fenolicos.p

Minolta, K. (01 de Octubre de 2019). *Entendiendo El Espacio de Color CIE L*A*B**. Obtenido de <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>

Muñoz, C. (1988). Arándanos: Antecedentes Generales. *Instituto de Investigación Agropecuaria*, 5-13.

Muñoz, C. (1988). Arándanos: Antecedentes Generales. *Instituto de Investigación Agropecuaria*, 5-13.

Muñoz, C. (1999). *Arándano: Antecedentes Generales.*

Ortega G. M, Guerra M. (2006). *Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físicos*, N°3. Volumen 40 pp 3-11. Septiembre de 2006, Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar Cuba.

QuimiNet. (29 de Junio de 2006). *Secado por Aspersión y su Uso en la Encapsulación* . Obtenido de <https://www.quiminet.com/articulos/el-secado-por-aspersion-y-su-uso-en-la-encapsulacion-10261.htm>

Pau A. (2014). *Arándano, la súper fruta ahora es un producto “made in Bolivia”*, en: revista Página Siete. Fecha de consulta: 25 de marzo de 2018
Disponibile en : <http://www.paginasiete.bo/gente/2014/10/26/arandano-super-fruta-ahora-producto-made-bolivia-36363.html>

Ravazzani, G. (2014). *Arándanos: ácidos orgánicos.* Obtenido de <https://www.lavoz.com.ar/salud/arandanos-acidos-organicos>

Rosa Elena Dueñas. S.A. De C.V. (s.f.). *Extracto Fluído de Arándano Compuesto.* Obtenido de Laboratorio de Remedios Herbolarios: <https://redsa.com.mx/descargas/compuestos/arandano-compuesto%20.pdf>

Santacruz Cifuentes, L. A. (2011). *Análisis Químicos de Antocianinas en Frutos Silvestres Colombianos.* Bogotá: Universidad Nacional de Colombia .

Velarde Cárdenas , A. X. (2018). *"Determinación de Parámetros Tecnológicos para la Obtención por Evaporación de Extracto de Antocninas a base de un Extracto Hidroalcohólico de Coronta deMaíz Morado(Zea Mays L.) VAR. Arequipeño"*. Peru.

Whitaker, J. (2001). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. California: Copyright.

WordPress. (04 de julio de 2018). *Las Antocianinas para el Cuidado de la Piel y la aplicaciones Dermatológicas*. Obtenido de <http://conocimiento.articlesask.com/2health/2antiaging/1002163635.html>

Xiaonan Sui. (2017). *Impact of Food Processig on Anthocyanins*. Singapore: Springer Science .

Zapata L M.; Heredia, Ana M.; Quinteros, Carlos F.; Malleret, Antonio D.; Clemente, Gabriela; Cárcel, Juan A. (2014). *Optimización de la Extracción de Antocianinas de Arándanos*, en: *Ciencia, Docencia y Tecnología*, N° 49. Volumen 25 pp 166-192. Noviembre de 2014, Eva Perón FIB Concepción del Uruguay, Entre Ríos, Argentina.

Zapata L. M. (2014). *Obtención de Extracto de Antocianinas a partir de Arándanos para ser Utilizado como Antioxidante y Colorante en la Industria Alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, Departamento de Tecnología de Alimentos. España.

Prior RL and Wu X. (2006) Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities.

ANEXOS

ANEXO I
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

Resultado de los análisis Fisicoquímico de la materia prima Arándano.

CEANID-FOR-88
Versión 01
Fecha de emisión: 2016-10-31



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA "JUAN MISAEL SARACHO"
FACULTAD DE "CIENCIAS Y TECNOLOGÍA"
CENTRO DE ANÁLISIS, INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO "CEANID"
Laboratorio Oficial del Ministerio de Salud y Deportes
Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
Red Nacional de Laboratorios de Micronutrientes
Laboratorio Oficial del "SENASAG"



INFORME DE ENSAYO

I. INFORMACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente:	Enilce Jessica Cruz Humacata				
Solicitante:	Enilce Jessica Cruz Humacata				
Dirección:	Barrio IV Centenario				
Teléfono/Fax:	78704970	Correo-e:	*****	Código:	AL 122/19

ES COPIA FIEL
DEL ORIGINAL

II. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra:	Arándanos				
Código de muestreo:	*****	Fecha de vencimiento:	*****	Fecha de Elab:	***
Fecha y hora de muestreo:	2019-05-10				
Procedencia (Localidad/Prov/ Dpto):	Turumayo - Cercado - Tarija Bolivia				
Lugar de muestreo:	Turumayo				
Responsable de muestreo:	Enilce Cruz				
Código de la muestra:	494 FQ 241	Fecha de recepción de la muestra:	2019-05-23		
Cantidad recibida:	200 g	Fecha de ejecución de ensayo:	De 2019-05-23 al 2019-06-07		

III. RESULTADOS

PARÁMETRO	TECNICA y/o MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO	LÍMITES PERMISIBL		REFERENCIA DE LOS LÍMITES
				Min.	Max.	
Acidez (como ac. cítrico)	NB 229-98	%	0,06	Sin Referencia	Sin Referencia	
Azúcares totales	NB 38033-06	%	11,84	Sin Referencia	Sin Referencia	
Ceniza	NB 39034-10	%	0,97	Sin Referencia	Sin Referencia	
Densidad relativa	NB 230-99		1,0058	Sin Referencia	Sin Referencia	
Fibra	Gravimétrico	%	n. d.	Sin Referencia	Sin Referencia	
Grasa	NB 313019-06	%	0,10	Sin Referencia	Sin Referencia	
Hidratos de Carbono	Cálculo	%	14,91	Sin Referencia	Sin Referencia	
Humedad	NB 313010-05	%	83,04	Sin Referencia	Sin Referencia	
pH (20°C)	SM 4500-H-B		3,33	Sin Referencia	Sin Referencia	
Proteína total (Nx6,25)	NB/ISO 8968-1:08	%	0,98	Sin Referencia	Sin Referencia	
Sólidos solubles	NB 36003-02	°Brix	16,9	Sin Referencia	Sin Referencia	
Valor energético	Cálculo	Kcal/100 g	64,46	Sin Referencia	Sin Referencia	

NB: Norma Boliviana
N: Porcentaje

g: Gramos
Kcal: Kiloenergías

ISO: Organización Internacional de Normalización
mg: miligramos

- 1) Los resultados reportados se remiten a la muestra ensayada en el Laboratorio
- 2) El presente informe solo puede ser reproducido en forma parcial y/o total, con la autorización del CEANID
- 3) Los datos de la muestra y el muestreo, fueron suministrados por el cliente

Tarija, 07 de junio del 2019

Ing. Azucel Aceituno Cáceres
JEFE DEL CEANID



Original: Cliente
Copia: CEANID

Resultado de los análisis Físicoquímico del producto Extracto Concentrado de Antocianinas de Arándano

CEANID-FOR-8

Versión C

Fecha de emisión: 2016-10-3



UNIVERSIDAD AUTONOMA "JUAN MISAEL SARACHO"
FACULTAD DE "CIENCIAS Y TECNOLOGIA"
CENTRO DE ANALISIS, INVESTIGACION Y DESARROLLO "CEANID"
Laboratorio Oficial del Ministerio de Salud y Deportes
Red de Laboratorios Oficiales de Análisis de Alimentos
Red Nacional de Laboratorios de Micronutrientes
Laboratorio Oficial del "SENASAG"



INFORME DE ENSAYO

I. INFORMACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente:	Enilce J. Cruz Humacata				
Solicitante:	Enilce J. Cruz Humacata				
Dirección:	Barrio Los Chapacos				
Teléfono/Fax:	60271758	Correo-e:	***	Código:	MO 014/19

II. INFORMACIÓN DE LA MUESTRA

Descripción de la muestra:	Extracto de arándanos (antocianinas)				
Código de muestreo:	M-1	Fecha de vencimiento:	*****	Lote:	*****
Fecha y hora de muestreo:	2019-06-07				
Procedencia (Localidad/Prov/Dpto)	Tarija-Cercado-Tarija Bolivia				
Lugar de muestreo:	LOU - UAJMS				
Responsable de muestreo:	Enilce J. Cruz				
Código de la muestra:	553 FQ 270	Fecha de recepción de la muestra:	2019-06-10		
Cantidad recibida:	200 ml	Fecha de ejecución de ensayo:	De 2019-06-10 al 2019-06-17		

III. RESULTADOS

PARÁMETRO	TECNICA y/o MÉTODO DE ENSAYO	UNIDAD	RESULTADO	LIMITES PERMISIBLES		REFERENCIA DE LOS LIMITES
				Min.	Max.	
Acidez (ac.citrico)	NB 36002:2002	%	0,28	Sin Referencia		Sin Referencia
Azúcares totales	Reducción de Cu	%	20,58	Sin Referencia		Sin Referencia
Ceniza	NB 39034:10	%	0,28	Sin Referencia		Sin Referencia
Grasa	NB 313019:06	%	n.d	Sin Referencia		Sin Referencia
Humedad	NB 313010:05	%	75,71	Sin Referencia		Sin Referencia
pH(20°C)	NB 338006:2009	%	2,95	Sin Referencia		Sin Referencia
Proteina (Nx6,25)	NB/ISO 8968-1:08	%	1,14	Sin Referencia		Sin Referencia
Sólidos solubles	NB 36003:2002	°Brix	27,7	Sin Referencia		Sin Referencia

NB: Norma Boliviana
n.d: No detectado

ISO: Organización Internacional de Normalización
%: porcentaje

- 1) Los resultados reportados se remiten a la muestra ensayada en el Laboratorio
- 2) El presente informe solo puede ser reproducido en forma parcial y/o total, con la autorización del CEANID
- 3) Los datos de la muestra y el muestreo, fueron suministrados por el cliente

Tarija, 17 de junio del 2019

Ing. Rodolfo Aceituno Cáceres
JEFE DEL CEANID



Original: Cliente

Copia: CEANID

ANEXO II

PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA

ANALISIS DE ANTOCIANINA

Protocolo para la extracción de Antocianinas usado para el análisis de la materia prima arándano.

METHANOL EXTRACTION OF ANTHOCYANINS

This is the classical method of extracting anthocyanins from plant materials. This procedure involves maceration or soaking of the plant material in methanol containing a small concentration of mineral acid (e.g., HCl). Methanol extraction is a rapid, easy, and efficient method for anthocyanin extraction. However, a crude aqueous extract with several contaminants is obtained, and methanol evaporation can result in hydrolysis of labile acyl linkages, which is aggravated by the presence of HCl.

Additional Materials (also see Basic Protocol 1)

Acidified methanol: 0.01% (v/v) HCl in methanol

1. Homogenize 50 g powdered plant material (accurately weighed and recorded) in 2 vol (w/v) acidified methanol. Allow it to macerate 1 hr.

One hour should be sufficient time for anthocyanin extraction because of the high surface area of the powdered material. Materials are often allowed to extract overnight under refrigerated conditions, particularly when materials have been ground directly in the blender with acidified methanol and not previously powdered.

2. Filter slurry through a Whatman no. 1 filter paper by vacuum suction using a Buchner funnel.
3. Reextract plant material with acidified methanol until a faint-colored extract is obtained. Pool filtrates and discard plant material.

Three subsequent extractions should be sufficient.

4. Transfer filtrates to a boiling flask and evaporate methanol in a rotary evaporator at 40°C under vacuum.

The evaporating flask should be less than one-half full for efficient solvent removal. Prolonged evaporation time should be avoided to minimize pigment degradation. A marked reduction in the rate of evaporation as well as an apparent increase in viscosity is indicative that the residual liquid is mostly water.

If pigment isolate is to be analyzed in an aqueous system, the extract should not be taken to dryness. For some analytical applications, the sample should be taken to dryness and then dissolved in methanol or other appropriate solvent. In the latter concentration stages, azeotropic removal of water can be facilitated by addition of methanol.

5. Make up remaining aqueous extract to a known volume with acidified deionized distilled water, water, methanol, or other appropriate solvent. If the sample is to be analyzed within 2 days, store extract at 4°C. For longer periods (up to 1 year or even longer), store at -18°C. Avoid repeated freezing and thawing.

Extract should be made up in acidified water or water if continuing with Basic Protocol 2.

**ALTERNATE
PROTOCOL**

Fuente: Whitaker, J. (2001).

Protocolo para el análisis de concentración de antocianinas, método de pH diferencial.

PROTOCOLO I BÁSICO

Fundamento teórico del método de antocianinas monoméricas totales por el método del pH-diferencial

Los pigmentos de antocianinas sufren transformaciones estructurales reversibles con un cambio en pH manifiesto por espectros de absorbancia notablemente diferentes. La forma coloreada del oxonio predomina a pH 1.0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5. El método del pH-diferencial se basa en esta reacción, y permite la medida exacta y rápida de las antocianinas totales, incluso en presencia de pigmentos polimerizados degradados y otros compuestos interferentes.

Materiales

buffer de cloruro de potasio 0.025 M, pH 1.0 (ver receta)

buffer de acetato de sodio 0.4 M, pH 4.5 (ver receta)

1. Encender el espectrofotómetro. Permitir al instrumento calentarse por lo menos 30 min antes de tomar las medidas.
2. Determinar el factor de dilución apropiado para la muestra diluyendo con el buffer de cloruro de potasio, pH 1.0, hasta que la absorbancia de la muestra a la $\lambda_{\text{vis-max}}$ esté dentro del rango lineal del espectrofotómetro (o sea, para la mayoría de los espectrofotómetros las absorbancias deben ser menores a 1.2). Dividir el último volumen de la muestra por el volumen inicial para obtener el factor de dilución (DF; por ejemplo ver el paso 7).

NOTA IMPORTANTE: Para no exceder la capacidad del buffer, la muestra no debe exceder 20% del volumen total.

3. Poner a cero el espectrofotómetro con el agua destilada para todas las longitudes de onda que se usarán ($\lambda_{\text{vis-max}}$ y 700 nm).

Muchos espectrofotómetros permiten una corrección básica rápida para poner a cero usando la línea de ajuste de fondo.

4. Preparar dos diluciones de la muestra, una con el buffer de cloruro de potasio, pH 1.0, y la otra con el buffer de acetato de sodio, pH 4.5, diluyendo cada una por el factor de dilución previamente determinado (paso 2). Permita que estas diluciones se equilibren por 15 min.
5. Medir la absorbancia de cada dilución a $\lambda_{\text{vis-max}}$ y a 700 nm (para corregir por la turbidez), contra una celda blanco llena con agua destilada.

Todas las medidas deben hacerse entre 15 min y 1 h después de preparar la muestra, ya que tiempos mayores de espera tienden a incrementar las lecturas observadas.

Las lecturas de absorbancia se hacen contra blancos de agua, aun cuando las muestras estén en buffer o soluciones de bisulfito, ya que la absorbancia del buffer o del bisulfito es nula en las longitudes de onda medidas. Los autores han comparado los valores obtenidos usando el agua como blanco comparado con buffer o bisulfito como blancos en sistemas diferentes y no han

encontrado ninguna diferencia en los valores finales obtenidos para el contenido de antocianinas monoméricas y/o poliméricas; por otro lado, leer las muestras diluidas contra el buffer correspondiente y/o la solución de bisulfito consume más tiempo y extiende el procedimiento innecesariamente.

Las muestras a ser medidas deben estar claras y no contener ninguna turbidez o sedimentos; sin embargo, algunos materiales coloidales pueden suspenderse en la muestra, causando dispersión de luz y una apariencia nublada (niebla). Esta dispersión de luz necesita ser corregida leyendo a una longitud de onda donde ninguna absorbancia de la muestra ocurra, es decir, 700 nm.

7. Calcular la absorbancia de la muestra diluida (A) como sigue:

$$8. \quad A = \left(\frac{A_{\lambda_{\text{vis-max}}}}{A_{700 \text{ pH } 1.0}} - \frac{A_{\lambda_{\text{vis-max}}}}{A_{700 \text{ pH } 4.5}} \right)$$

6. Calcular la concentración de pigmento de antocianina monomérica en la muestra original usando la fórmula siguiente:

$$7. \quad \text{Pigmento de antocianina monomérica (mg/litro)} = (A \times MW \times DF \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

donde MW es la masa molecular, DF es el factor de dilución (por ej., si 0.2 mL de una muestra se diluyen a 3 mL, DF = 15), y ϵ es la absorptividad molar.

NOTA IMPORTANTE: El M_W y ϵ usado en esta fórmula corresponde a la antocianina predominante en la muestra. Use la ϵ reportada en la literatura para el pigmento de antocianina en el solvente acuoso ácido. Si el ϵ del pigmento principal no está disponible, o si la composición de la muestra es desconocida, calcule el contenido del pigmento como cianidin-3-glucósido, donde $MW = 449.2$ y $\epsilon = 26,900$ (ver Información de Apoyo, discusión de la absorptividad molar).

Fuente: Alvarado Juan A. (2012)

Protocolo para la preparación de Extractos Metanólicos para uso en el HPLC.

- Pesar un ependorf vacío
- Pesar el ependorf más la muestra (aproximadamente 0.1 gramos)
- Pesar el ependorf más la muestra, más metanol al 90% (aproximadamente 1 mL)
- Sonicar 15 minutos a 0°C con hielo
- Centrifugar la muestra a 12000 rpm por 2 minutos
- Decantar a otro ependorf, dejar en el refrigerador a 4°C
- El sólido restante dejar secar en la estufa a 65°C
- Pesar la muestra seca.

Fuente: Penarrieta. (2019).

ANEXO III
ESPECIFICACIONES DE LOS EQUIPO

Balanza analítica



Fuente: UAJMS-LOU

Marca: GIBERTINI

Accesorios: Bandeja y tapa de vidrio

Tensión: 230/240 V

Máximo: 510 gramos

Mínimo: 1 gramo

Error: 0.01 gramo

Voltaje: 230

Lugar de Ensayo y Propiedad:
UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

pH metro



Fuente: UAJMS-CEANID

Marca: Mettler Toledo

Margen de medición del pH/Exactitud: 0,00 hasta 14,00

Exactitud: $\pm 0,01$

Margen de medición de la temperatura: 0,0 hasta 100°C

Exactitud: $\pm 0,5$

Calibración: Max. 2 puntos, 3 grupos tampón predefinidos

Voltaje: 100 – 240 V

Frecuencia: 50 Hz

Dimensiones (An*Alt*L): 200x175x42 mm

Peso: 600 g

Lugar de Ensayo y Propiedad: UAJMS-CEANID

Agitador Magnético



Voltaje: 230V

Potencia: 640W

Frecuencia: 50 Hz

Temperatura máxima: 350 °C

Velocidad: 60 -1600 rpm

Dimensiones: 17x16x25 cm

Peso 3,5Kg

UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

Fuente: UAJMS-LOU

Rota-evaporador



Marca: Heidolph

Tipo: Heizbad HB digit

Accesorios: 2 balones, bomba, baño maría, mangueras y condensador

Frecuencia: 50 - 60 Hz

Tensión: 230/240 V

Temperatura: 30-180 °C

Voltaje: 230

Lugar de Ensayo y Propiedad: UAJMS-LOU (Laboratorio de Operaciones Unitarias).

Fuente: UAJMS-LOU

HPLC



Fuente: UMSA

Modelo: Agilent

Cuenta con un degasificador, bomba cuaternaria, autoinyector, horno de columna y detector múltiple de UV/Vis (series 200).

Columna de fase reversa Kromasil 100-5C18 (250 x 4,6 mm) protegida por una pre-columna de 10 mm (Scantec Lab, Sävedalen, Suecia).

Software: Chemstation Revision B.04 2009.

Lugar de Ensayo y Propiedad:

UMSA (Universidad Mayor de San Andres)

Carrera de Licenciatura en Química.

ANEXO IV
GALERIA DE FOTOS

Selección y lavado de la materia prima



Verificación de grado alcohólico de etanol usado en la extracción



Etapa de extracción y filtración de extracto de Antocianinas



Papel filtro en la primera, segunda y tercera filtración



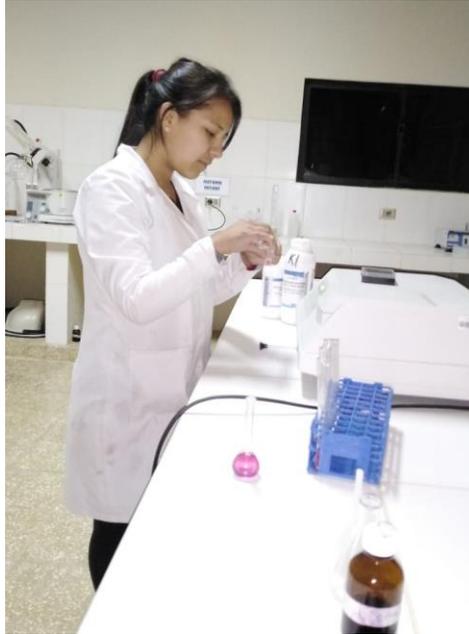
Extractos obtenidos: primera, segunda y tercera etapa de extracción



Concentración del Extracto



Análisis de Concentración de Antocianinas en el Extracto realizado en el Espectro UV-Visible



Análisis de Cianidina por HPLC

