

UNIVERSIDAD LE CORDON BLEU

ESCUELA DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



INFORME FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: “Condiciones óptimas de extracción de antocianinas de la cáscara de la granada (Punica granatum L.) variedad Wonderful”

RESPONSABLE: Mg. Sc. Ing. Flor de María Vásquez Castillo

Lima-Perú

Enero 2016

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Universidad Le Cordon Bleu y en la facultad de Ingeniería y Arquitectura de la USMP, estableciéndose el siguiente objetivo principal:

Determinar las condiciones óptimas de: tiempo de maceración, relación materia prima/solvente, influencia del ácido, influencia de la concentración del ácido, influencia de la temperatura de maceración.

Determinar el contenido de antocianinas en cada condición

En el estudio a nivel preliminar se evaluaron 4 tratamientos: para escoger ya sea ácido o alcohol, mejor proporción piel de granada: solución, de los cuales se escogió el tratamiento T1: Solución ácido cítrico a pH= 2 a 50°C, proporción piel de granada: solución (1:5) a 400 rpm, en 2 etapas de 15 minutos cada uno y a T° de 50°C.

Posteriormente se evaluaron 18 tratamientos como pruebas definitivas, de las cuales el Tratamiento 12 resultó ser el que contenía mayor cantidad de antocianinas (46.1 mg de antocianina en 100 g de piel de granada en base húmeda y 158.8 mg de antocianina en 100 gr de piel de granada en base seca), a las siguientes condiciones: solución ácido málico a pH=2, en 2 etapas de 400 rpm a un T° de 50°C, tiempo de 60 minutos cada etapa, proporción de piel de granada: solución(1:5)

2.4. MARCO TEÓRICO

2.4.1. Antecedentes de la Investigación.

Según Tabaraki *et al* (2012), las condiciones óptimas para extraer los polifenoles y antioxidantes de la cáscara de granada por el método de extracción asistida por ultrasonidos fue con una solución de etanol al 70% en agua como disolvente, a la temperatura de 60 °C y el tiempo de extracción de 30 min.

Según Hayouni (2011) probó la eficacia de un ungüento con 5% de extracto metanólico de granada con una mejora en el potencial de curación vivo en heridas dérmicas de conejillos de india. El extracto exhibió significativa actividad antibacteriana y antifúngica frente a casi todas las bacterias probadas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella anatum*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* y hongos *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Trichopyton rubrum* y *Aspergillus niger*.

Según Ventura (2012), preparó una decocción acuosa a partir de las cáscaras. Brevemente, 40 g de cáscara molida y seca fueron hervidos durante 10 minutos con 300 ml de agua desionizada, es decir en una proporción 4:30 (p/v). Después de la extracción, todo el material fue filtrado con tela de tul, el líquido fue reservado y la cáscara fue extraída dos ocasiones más. Posteriormente todo el extracto fue centrifugado a 1360 x g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante fue liofilizado. El extracto en polvo fue guardado en recipientes con cierre hermético y almacenado protegido de la luz.

Según Vishal *et al.* (2011), llevaron a cabo un estudio para aislar y estandarizar los diversos componentes fitoquímicos activos presentes en las cáscaras de frutas de *Punica granatum*, se secó la cáscaras de frutas de *Punica granatum* se extrajo con metanol en un extractor estático; el porcentaje del rendimiento del extracto metanólico fue de 26%; el extracto metanólico se repartió usando n-butanol, acetato de etilo y agua; el porcentaje de rendimiento de las fracciones se encontró que 17,16%, 26,88% y 47,72% respectivamente. Fueron aislados e identificados como punicalina, punicalagina, ácido gálico y ácido elágico.

Según Arrazola *et al* (2014), las muestras de cáscara de berenjena previamente acondicionadas se sometieron al proceso de extracción en una relación 1:10 (1g de cáscara de berenjena con 10 mL de etanol acidificado con ácido clorhídrico (HCl) al 1%). Una vez finalizada la obtención, la mezcla se filtró en un embudo Buchner y el sólido recuperado fue lavado con el solvente etanol acidificado. Luego se combinaron los sobrenadantes de las filtraciones. Para llevar a cabo la extracción de las antocianinas de la berenjenas se emplearon las siguientes condiciones de extracción: utilizando como solvente etanol acidificado (Etanol desde el 50 - 90 % v/v), temperatura de extracción (30 a 60 °C) y tiempo de extracción (4 - 12 h). La más alta concentración de antocianinas a partir de cáscara de berenjena (115 mg /100 g) se obtuvo con 53 % etanol, por 3h y a 29°C de temperatura.

Çam *et al* (2014) investigaron los efectos de las condiciones de microencapsulación en la calidad del producto de los compuestos fenólicos de cáscara de granada. Los resultados indican una temperatura de entrada de aire óptima de 160 °C y 1/1 (w / w) o 1/3 (w / w) para

la relación de compuestos fenólicos / maltodextrina. Las que se mantuvieron en períodos de almacenamiento de 90 días a 4 C ($p > 0,05$).

Según Chandrasekhar et al (2012) utilizaron diferentes medios de extracción de antocianinas de la col roja, concluyendo que la mezcla de 50% (v / v) de etanol y agua acidificada resultó con un contenido de antocianinas máximo (390,6 mg / L).

2.4.2. Bases Teóricas

2.4.2.1. La Granada

El granado (*Punica granatum* L.) es un frutal cuyo cultivo se conoce desde la antigüedad. Se trata de uno de los frutales bíblicos, como la vid, el olivo o la palmera. Según Nikolai Vavilov; citado por Calín y Carbonell, el granado pertenece al Centro IV: Centro de Oriente Próximo (Asia Menor, la Transcaucásica, Irán y las tierras altas de Turkmenistán).

El granado (*Punica granatum* L.) es un árbol caduco de pequeñas dimensiones que puede alcanzar como máximo 8 metros de altura en estado salvaje. Es un frutal muy interesante para muchas zonas del mundo, especialmente aquellas áridas y semiáridas, ya que, aunque menos importante que otros frutales, es capaz de adaptarse a distintas zonas en las que muchos, actualmente más importantes, serían incapaces de dar una producción rentable (Melgarejo y Salazar, 2003; citado por Calín y Carbonell, 2014).

Su clasificación sistemática es la siguiente:

División: Fanerógamas.

Clase: Dicotiledóneas.

Subclase: Arquiclamídeas.

Orden: Myrtales.

Familia: Punicaceae.

Género: Punica.

Especie: Granatum.

a) Historia de la granada

Este árbol es originario de la región que abarca desde Irán hasta el norte de los Himalaya en India, y fue cultivado y naturalizado en toda la región del Mediterráneo incluida Armenia, desde la Antigüedad. Muy apreciado en las zonas desérticas, ya que está protegido de la desecación por su piel gruesa y coriácea, lo que permitía que las caravanas pudieran transportar su fruta grandes distancias, conservando sus apreciadas cualidades. Testimonios de su consumo se recogen en todos los documentos antiguos.

Se sabe del cultivo de la granada, desde hace al menos 5000 años en Asia occidental y en el Norte de África; se plantaba en los jardines colgantes de Babilonia y se encuentra esculpido en los bajorrelieves egipcios.

Los antiguos egipcios preparaban con su jugo un vino ligero con sabor a frambuesa.

Hipócrates recomendaba el jugo de la granada contra la fiebre y como fortificante contra la enfermedad.

Los antiguos egipcios eran enterrados con granadas. Los babilonios creían que masticar sus granos antes de las batallas los hacía invencibles.

Los romanos conocieron la granada gracias a los fenicios que la trajeron de Fenicia (aproximadamente en el actual Líbano) a Roma, de ahí su nombre científico de *Punica*.

La Biblia hace referencia en numerosas ocasiones a este fruto, y siempre en su defensa.

La granada tiene un cáliz con forma de corona. En la tradición judía fue el diseño original, que inspiró para hacer las coronas.

Son los bereberes quienes traen la fruta a Europa, y la ciudad de Granada, fundada en el siglo X, recibió su nombre por esta fruta.

Muchos pueblos han visto la granada como un símbolo de amor, de fertilidad y prosperidad.

La granada forma parte del escudo de la ciudad de Tacna, al sur de Perú. Desde 1492 una granada forma parte del escudo de España. También del de Colombia. Son los únicos estados del mundo con una granada en sus emblemas nacionales. Granada, antigua capital del Reino Nazarí de Granada en la Edad Media, es el nombre de la actual ciudad española, así como de su provincia. Su fruto está incluido en el escudo de armas de la ciudad.

b) Producción

Los principales países productores de granada fresca en el mundo se encuentran en Medio Oriente, destacando como principales productores: India, China, Bangladés y Egipto; de todos estos el único principal productor que no exporta es China que destina su producción a su consumo local; otros países que están incrementando su producción, pero exclusivamente para la exportación, son Perú, Chile y España, ya que en sus mercados internos no hay hábito de consumo de la granada fresca; en España, que es el principal país productor de Europa, existen más de 2500 hectáreas cultivadas con una producción de 20 000 toneladas al año.

c) Usos

Aunque la especie no es nativa del Japón, se cultiva ampliamente en este país y se han desarrollado numerosos cultivares. Se utiliza ampliamente en los bonsái, debido a sus bonitas flores y los troncos retorcidos que adquieren los ejemplares más viejos. El jugo de la granada se utiliza como tinte natural en las fábricas de productos no-sintético.

d) Etimología

El nombre genérico, *Punica*, proviene del latín *pūnicum* y alude a los fenicios, activos impulsores de su cultivo, mientras que *granatum*, el epíteto específico, deriva del adjetivo latino *grānātus*, que significa con abundantes granos. En la Antigua Roma se denominaba al granado como *punicum arbos* (árbol púnico) y al fruto como *malum granatum* (manzana granada) o *punicum malum* (manzana púnica). Plinio el Viejo, a mediados del siglo I, menciona en su *Naturalis historia*: «En África, en los alrededores de Cartago, existe la manzana púnica que algunos llaman *granatum*».

e) Variedades

- **“Bedana”** - es media a grande, con corteza blanquecina a parduzca y pulpa dulce rosáceo-blanca.
- **“Kandhari”** - es grande, de color rojo oscuro, con pulpa de color rosa oscuro o sangre-roja, subácida y semillas duras.
- **“Alandi” (“Vadki”)** - de tamaño mediano, con la pulpa roja o rosada, carnuda, semillas muy duras.
- **“Dholka”** - grande, amarillo-rojo, de corteza gruesa y pulpa carnuda, purpurino-blanco o blanca, dulce; semillas duras. Es árbol de hoja perenne.
- **“Kabul”** - grande, con la corteza rojo oscuro y amarilla claro; pulpa carnuda, rojo oscuro, dulce, levemente amarga.
- **“Rojo del Muscat”** - con la corteza fina o bastante gruesa, carnudas, jugosas, medio-dulces de la pulpa, suaves. La planta es un portador moderadamente prolífico.
- **“Shell de papel”** - redonda, medio grande, amarillo claro ruborizado con color de rosa; con la pulpa carnuda, rojiza o rosada, dulce, muy jugosa, la corteza muy fina, y semillas suaves.
- **“Pune”** - grande, con la corteza rojo oscuro, gris o grisáceo-verde, manchada a veces, y la pulpa naranja-roja o rosado-y-roja.
- **“Rubí español”** - redonda, pequeño-medio o grande; brillante-rojo, con la corteza fina, la pulpa aromática las y semillas pequeñas-medias, bastante suaves.
- **Medio de “Vellodu”** - tiene pulpa grande, con la corteza medio-gruesa, carnuda, jugosa.
- **“Blanco”** - grande, color crema del Muscat teñida con color de rosa; corteza fina; pulpa carnuda, crema-coloreada, dulce.
- **“Maravilloso”** - originado en Florida y propagado en California en 1896. La fruta es el púrpura-rojo muy grande, oscuro, con la corteza medio-gruesa; de color rojo oscuro, jugosa.

En España las más conocidas y comerciales son las siguientes:

- **“Mollar de Elche”** - Árbol muy vigoroso, de rápido desarrollo, fruto de tamaño grande, grano grueso, rojo oscuro y semillas muy reducidas y blandas. Madura entre octubre y noviembre; presenta mayor posibilidad de rajado y de ataque de plagas.
- **“Mollar valenciana”** - Árbol vigoroso, fruto de tamaño grande, forma redondeada y aplanada, granado grueso y semilla muy reducida. Se caracteriza por ser de recolección temprana.
- **“Wonderful”** - Se trata de una fruta más grande de lo normal, con un sabor más agradable. Roja su carne, jugosa con un sabor agudo. Crece bien en el suelo alcalino que mataría a la mayoría de las plantas. Crece hasta cerca de 6 m de alto.¹³

En España se producen de muy buena calidad en el litoral mediterráneo (Valencia, Elche, Albufera) y las tres variedades más consumidas son:

- Grano de Elche o Mollar de Elche. Es rojo oscuro es el más cultivado.
- Mollar de Játiva
- Mollar de Valencia

Procedencia de España:

- Granada Blanca: fruto mediano, piel lisa, recubrimiento con arilos de color rosa.
- Granada Pignonenca: fruto grande, coloreado, con semillas muy duras.
- Granada Mollar de Elche: Es la variedad más cultivada en España, frutos rosados, tamaño medio. Existen variedades de Mollar de Játiva o Mollar de Valencia
- Granada Tendral: tamaño medio, color rojo sobre fondo amarillo. Granos pequeños, muy azucarados. Piel fina, no apta para transportes largos.
- Granada Valenciana: de producción más temprana, de menor calidad que las mollar de elche, pero cuando estas se dan aún no hay de esta fruta.

Procedencia de India:

- Granada Dholka: fruto grande, piel amarillo-rojizo y morada en la base, piel delgada, pepitas muy dulces
- Granada Ganesh: variedad de Dholka, frutos medios con arilos de color rosa, semilla suave

Procedencia de EEUU:

- Granada Española: Tamaño medio, piel amarilla con zonas rojas, arilos rosados. Pepitas de sabor dulce
- Granada Wonderful: fruto grande, color rojo oscuro, semillas pequeñas y duras, sabor ácido
- Granada: Maduración temprana, mutación de la Wonderful, tamaño pequeño.
- Granada Paper Shell (Spanish sweet): frutos gruesos, color amarillo con toques púrpuras. Pepitas muy dulces, pequeñas y de color rojo.

f) Composición Química de la Granada

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares, arilos y semillas (Figura 1). El producto más importante derivado de la granada es el zumo, sin duda el producto más estudiado con multitud de referencias en la literatura científica tanto española como internacional.

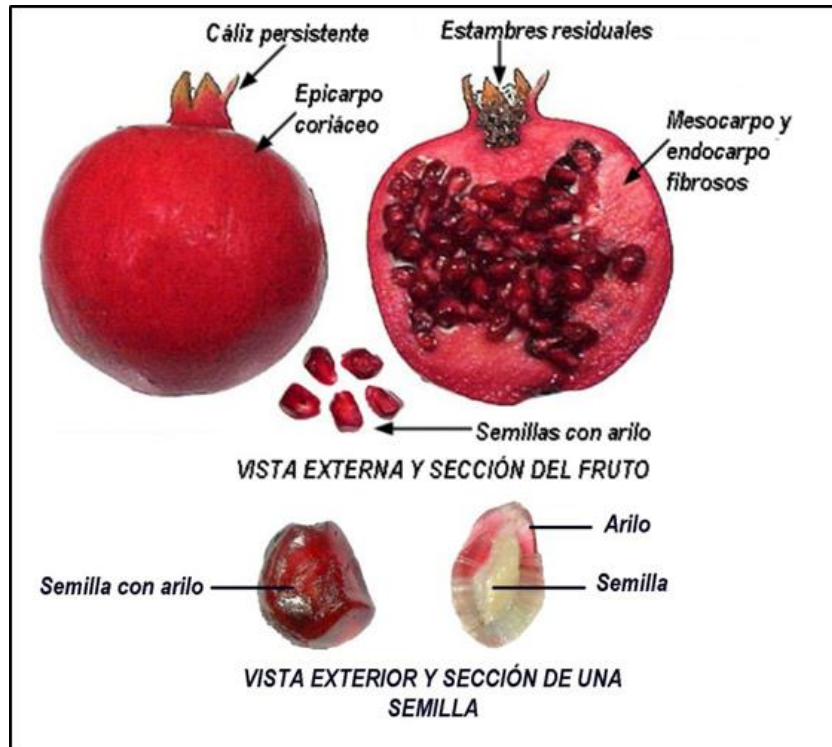


Figura 1. La granada y sus diferentes partes.

Alrededor del 50 % del peso total de la granada corresponde a la corteza y a las membranas carpelares, que son una fuente importantísima de compuestos bio-activos como polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas y minerales principalmente potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio. Por lo que, los productos nutracéuticos y condimentos alimentarios elaborados a partir de extractos de corteza y membranas carpelares pueden ser una fuente importante de todos estos compuestos, si se han procesado de modo correcto.

La parte comestible de la granada representa alrededor del 50 % del peso total de una granada y a su vez consiste en un 80 % de arilo (parte carnosa) y un 20 % de semilla (parte leñosa).

La cáscara de la granada, comprende entre el 30-40% del peso total del fruto. Contiene una gran cantidad de compuesto polifenólicos, entre los que destacan los taninos (50-60 g/ kg cáscara). La punicalagina es el elagitanino más abundante en la cáscara, constituye cerca del 80-85% de los taninos totales presentes en la cáscara (Seeram *et al.*, 2006, citado por Ventura, 2012).

En el Cuadro 1 se observa el análisis bromatológico de la cáscara de granada en materia seca.

Cuadro 1. Análisis bromatológico de la cáscara de granada expresado en g por 100 g de materia seca.

Parámetro	(%)
Materia seca	95.0 ± 1.3
Humedad	5.5 ± 1.5
Ceniza	3.6 ± 0.08

Grasa Cruda	3.6 ± 0.38
Proteína total	1.3 ± 0.17
Fibra cruda	17.8 ± 1.61
Azúcares totales	16.1 ± 0.61
Azúcares reductores	4.4 ± 0.01
Fenoles totales	6.1 ± 1.83
Ácido elágico	0.26 ± 0.08
Acido gálico	4.32 ± 0.00
Catequina	1.9 ± 0.00

Los resultados expresan la media de dos experimentos ± la desviación estándar.

Fuente: Ventura, 2012

También se puede observar en el Cuadro 2, los compuestos fenólicos del extracto de cáscara de granada.

Cuadro 2. Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto de cáscara de granada.

Tipo de compuesto	Nombre común	mg/g E
Ravonol	Rutina	N.D.
	Quercetina	N.D.
Ravan-3-ol	Catequina	N.D.
Ácido hidroxicinámico	Ácido p-cumárico	N.D.
Ácido hidroxibenzóico	Ácido gálico	N.D.
	Ácido elágico	14.22 ± 0.21
Fenoles totales	g EAG/100 g cáscara (%)	g EAG/100 g extracto (%)
	11.11 ± 0.19	22.23 ± 0.38

Los valores representan la media de dos experimentos ± la desviación estándar.

ND= No detectado g EAG= gramos de equivalentes de ácido gálico

Fuente: Ventura, 2012

2.4.2.2. Colorantes usados en la industria alimentaria

De toda la gama de colorantes existentes en el ámbito industrial, existía una tendencia por el uso de colorantes sintéticos debido a su gran poder tintóreo, a la estabilidad, bajo costo y fácil utilización; sin embargo en estos últimos tiempos las tendencias están cambiando y la demanda por estos colorantes a decrecido por los efectos mutagénicos y cancerígenos que ocasionan algunos de ellos alterando la salud del hombre (Hrazdina, 1981; citado por Quispe, 2003). Esto ha ocasionado la creciente búsqueda de colorantes provenientes de fuentes naturales, por ser productos seguros, sanos y confiables para la salud del consumidor. El Cuadro 3 muestra la relación de colorantes autorizados por la FDA para uso en alimentos y bebidas y que no requieren de certificación.

Cuadro 3. Colorantes naturales para uso en alimentos autorizados por la FDA

Extracto de annato
B-apo-8-carotenal
Remolacha en polvo
Cantaxantina
Caramelo
Aceite esencial de zanahoria
Extracto de cochinilla
Harina de algodón tostada, parcialmente desengrasada cocida
Jugo de frutas
Extracto de hollejos de uva
Pimentón y oleoresina de pimentón
Riboflavina
Azafrán
Cúrcuma, oleoresina de cúrcuma

Fuente: Hendry (1992), citado por Quispe (2003)

Dentro de los colorantes utilizados por las industrias tenemos aquellos que provienen de fuentes naturales, los cuales no requieren de certificación y aquellos obtenidos por síntesis química, quienes si son certificados por la FDA y autorizados por los Estados Unidos siendo controlados continuamente, el Cuadro 4 nos muestra estos colorantes autorizados por la FDA.

Cuadro 4. Colorantes sintéticos para uso en alimentos autorizados por la FDA

Código	Denominación	Color
FD&C Azul N° 1	Azul brillante FCF	630 nm Rojo-Violeta
FD&C Amarillo N° 5	Tratrazina	Naranja brillante-amarillo
FD&C Rojo N°3	Eritrosina	531 nm Marrón
FD&C Azul N°2	Indigo carmín	Azul oscuro
FD&C Verde N°3	Verde rápido FCF	628 nm Verde oscuro
Rojo cítrico N°2	_____	Solo para piel de naranjas

Fuente: Dominic (1989) citado por Quispe (2003)

2.4.2.3. Las antocianinas

Son colorantes pertenecientes a la familia de los flavonoides, estos son ampliamente distribuidos entre flores, frutos (particularmente en bayas) y vegetales, son responsables por el color brillante tal como: azul, rojo y morado.

Lock (1997) menciona, que el término antocianina fue utilizado por Marquat en 1835 para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no sólo era el color azul, sino que también el purpura violeta, magenta y todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y algunas hojas y raíces de plantas los que se deberían a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat.

A. Distribución en la naturaleza

Las antocianinas son pigmentos de mayor uso provenientes del reino vegetal, se encuentran principalmente en los frutos y flores de las angiospermas y generalmente como mezcla de ellas, son los responsables aunque no como un único pigmento del atractivo color de muchas frutas y vegetales. Las mayores fuentes alimentarias que contienen antocianinas pertenecen a las familias; vitáceas (uva), rosáceae (fresa, cereza, manzana, pera, etc.), oleáceae (olivo negro), crucíferas (calabaza roja, repollo morado), solanácea (tomacillo, papa, camote), etc. (Lock, 1997).

El Cuadro 5 nos muestran los mayores pigmentos de antocianinas distribuidos en las diferentes fuentes alimenticias pertenecientes al reino vegetal y en el Cuadro 6 se muestra el contenido de antocianinas de estas fuentes naturales.

Cuadro 5. Color y distribución de antocianinas en algunas frutas y vegetales

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

Fuente: Wang et al. (1997), citado por Quispe (2003)

Cuadro 6. Contenido de antocianinas en algunas frutas y vegetales comunes

mg de antocianinas/100 g b.h.

Alimentos	1	2	3
Manzanas (Scugog)	–	10	10
Manzana (cáscara)	10-2160	–	–
Arándanos azules silvestres	–	–	300-320
Zarzamoras o moras	82-180	83-326	83-326
Mora	160.9	25-495	–
Grosella negra	–	250	130-400
Grosella roja	–	12-19	–
Arándanos azules/Mora azul	460	78	25-495
Col roja	25	25	25
Bayas de Aronia	–	–	560
Cerezas	350-450	350-450	4-450
Arándanos rojos	–	–	60-200
Sauco	200-1560	–	450
Uvas	–	–	6-600

Uva roja	30-750	30-750	–
Uva morada	8-388	–	–
Kiwi	–	–	100
Cebollas rojas	–	9-21	7-21
Cebollas	>200	–	–
Ciruela	1.9-25	–	2-25
Rabanitos rojos	11-60	–	11-60
Frambuesa	10-60	–	–
Frambuesas negras	–	214-428	300-400
Frambuesas rojas	–	20-60	20-60
Fresas	12.7-36	7-30	15-35
berenjena	750	–	–
Papa (roja)	15-45	–	–
Maíz morado	1642	–	–

Fuente:

- 1) He (2004) citado por Betalleluz (2006)
 - 2) Wang *et al.* (1997); citados por Quispe (2003)
 - 3) Giusti y Wrolstad (2001)
- Citados por Ramos *et al.* (2012)

En el siguiente cuadro 7 podemos observar los tipos de antocianinas comunes en frutas y vegetales

Cuadro 7. Antocianinas comunes en frutas y vegetales

Nombre botánico	Nombre común	Antocianina
<i>Malus pumila</i>	Manzana	Cn-3-galactósido Cn-3-arabinósido Cn-7-arabinósido
<i>Musa</i>	Plátano	Pg-3-monósido Pg-3-glicósido
<i>vaccinum myrtillus</i>	Arándano	Cn-3-glicósido Pt-3-monósido Dp-3-glucósido Mv-3-glucósido
<i>Pubus fruticosis</i>	Zarzamora	Cn-3-glucósido Cn-3-rutinósido
<i>Vaccinum angustifolium</i>	Vaccinio	3-glucósido 3-galactósidos 3-arabinósido de Dp, Mv, Pt, Pn.
<i>Prunus cerasus</i>	Cereza agria	Cn-3-glucosil rutinósido

		Cn-3xilosilrutinosido Cn-3-rutinosido Cn-3- glucosido Pn-3-rutinosido Cn-soforosido
<i>Prunus avium</i>	Cereza dulce	Cn-3-glucosido Cn-3-rutinosido
<i>Vaccinum Vitis- Idae Linn</i>	Arándano	Cn-3-galactosido
<i>Vaccinum macrocarpum</i>	Arándano	3-galactosido 3-glucosidos 3-arabinosidos de Cn y Pn
<i>Ficus carica</i>	Higos	Cn-3-monosido
<i>Ribes nigrum</i>	Grosella negra	Cn-3-glucosido Cn-3-rutinosido Dp-3-glucosido
<i>Ribes sativum</i>	Grosella roja	Dp-3-glucosido Cn-3-rutinosido Cn-3xilosilrutinosido Cn-3-soforosido Cn-3-glucosil rutinosido
<i>Sambucus nugra</i>	Baya del saúco	Cn-3-glucosido Cn-3-sambubiósido 5-glucosido
<i>Ribes uva-crisa</i>	Uva espina	Cn-3-glucosido Cn-3-rutinosido
<i>Vitis vinifera riparia</i> <i>Vitis labrusca e hibridos</i>	Uva	Cn, Dp, Pn, Mv-Vitis glucosidos y 3,5, diglucosidos Mv-3-p-coumaril glucosido-5- glucosido Mv-3-cafeoilglucosido-5-glucosido
<i>Solanum melongena</i> <i>var erculenton</i>	Berenjena	Delph-3-pent.gluc. Delph-3-biósido
<i>Morus nigra</i>	Mora negra	Cn-3-glucosido
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja	Cn-3-glucosido Dp-3-glucosido
<i>Pasiflora edulis</i>	Granadilla	Dp-3-glucosido Dp-3-diglucosido
<i>Prunus pérsica</i>	Melocotón	Cn-3-glucosido
<i>Pyrus cummunis</i>	Pera	Cn-3-galactosido
<i>Prunus doméstica</i>	Ciruela	3-glucosido y 3-rutinosido de Cn y Pn
<i>Punica granatum</i>	Granada	Dp-3,5-diglucosido
<i>Rubus idaeus</i>	Frambuesa roja	Cn-3-glucosido Cn-3-rutinosido Cn-3-soforosido

		Cn-3-glucosilrutinosido
<i>Rubus occidentales</i>	Frambuesa negra	Cn-3-glucósido Cn-3-rutinosido Cn-3-sambubiósido Cn-3,5-diglucósido Cn-3-rutinosido-5-glucósido Cn-3xilosilrutinosido
<i>Prunus spinosa</i>	Endrina	3-glucósido 3-rutinosido de Cn y Pn
<i>Fragarias spp</i>	Fresa	Pg-3-glucósido Pg-3-galactósido Cn-3-glucósido Pg-3-biósido
<i>Phaseolous vulgaris</i>	Judía enana Judía escarlata	Dp-3-glucósido Dp-3,5-diglucósido Mv-3,5-diglucósido
<i>Brassica olearaceae</i>	Repollo rojo	Cn-3-(diferulosilfosforido)- 5glucósido
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	Cn-3-laminariobiósido Cn-3-monósido
<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	Pg-5-glucósido Pg-3-(p-coumarilsoforósido)-5- glucósido

Cn= Cianidina; Pn=Peonidina; Pg=Pelargonidina; Dp=Definidina; Mv=Malvidina; Pt=Petunidina

Fuente: Shrikhande (1976), Hoagland (1976) y Hendry (1992); citado por Fernandez (1995)

B. Estructura química

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C₆-C₃-C₆ (Hendry, 1992; citado por Quispe, 2003).

Cook y Samman (1996) indican que los flavonoides son sustancias polifenolicas de bajo peso molecular basado en el núcleo flavan. La Figura 2 muestra la estructura genérica de los flavonoides y el sistema numérico que es utilizado para distinguir la posición del carbono alrededor de la molécula. Los 3 anillos fenólicos son mencionados como los anillos A, B y C. Los flavonoides incluyen flavonoles, flavones, flavanones, antocianidinas, catequinas, isoflavones, dihidroflavonoles y calconas.

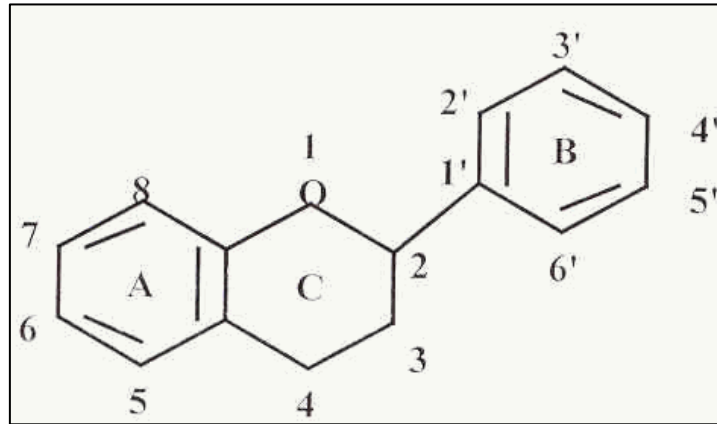


Figura 2. Estructura genérica de los flavonoides

Fuente: Cook y Samman (1996); citado por Quispe (2003)

Las antocianinas son glicósido de las antocianidinas y estas son, por lo tanto las agliconas de las antocianinas, la estructura básica de las antocianidinas es el grupo flavilio (2-fenil-benzopirilo) el cual consiste en un núcleo benzopirilo y un anillo fenólico (Hrazdina, 1981; citado por Quispe, 2003), como se muestra en la Figura 3.

Antocianidin	Estructura básica	R3'	R4'	R5'	R3	R5	R6
Aurantininidin		-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH
Cyanidin		-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Delphinidin		-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidin		-OCH ₃	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Luteolinidin		-OH	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidin		-H	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Malvidin		-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OH
Peonidin		-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-H	-OH
Petunidin		-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-H	-OH
Rosinidin		-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-H	-OCH ₃

Figura 3. Tipos de antocianinas y su estructura.

En el Cuadro 8 se muestra la longitud de onda máxima de cada tipo de antocianinas y en que vegetales se encuentran.

Cuadro 8. Sustitución en el catión de la estructura química de algunas antocianinas comunes

Tipo	Longitud max. (CH ₃ OH/HCl) (0.01%)	Presencia
Pelargonidina	520	Fresa
Cianidina	535	Manzana
Peonidina	532	Peonia
Delfinidina	546	Delfinium
Petunidina	543	Petunia
Malvidina	542	Uvas

Fuente: Dominic (1989), citado por Quispe(2003)

Los azúcares unidos a las antocianinas encontradas en mayor proporción son: glucosa, ramnosa, galactosa, xilosa y arabinosa. Las antocianinas también pueden tener una o más moléculas de ácidos p-cumárico, ferúlico, cafeico, acético y parahidroxibenzoico unido a una molécula de azúcar por esterificación (Furia, 1978 y Hoagland, 1976; citado por Quispe, 2003).

C. Factores que afectan el color y la estabilidad de las antocianinas

Debido a la deficiencia de electrones que presenta el núcleo flavilio de los pigmentos de antocianinas hacen que estas sean altamente reactivas, ocasionando fácilmente cambios en su estructura y color, que muchas veces son indeseables en el procesado de frutas y vegetales.

Este mecanismo de degradación de las antocianinas es producido por múltiples factores que ocasionan la destrucción de las antocianinas reflejada en la pérdida de estabilidad. Dentro de estos factores cabe mencionar; ciertas enzimas, la temperatura, el ácido ascórbico, el pH, el oxígeno, los metales, los azúcares, la luz, el anhídrido sulfuroso, etc.

C.1. pH

El color de cada antocianina depende de su estructura química, de la presencia de sales con las que interactúan y principalmente del pH.

En función al pH se produce en las antocianinas grandes modificaciones del color, estos se comportan como verdaderos indicadores de pH.

Los cambios de color abarcan el intervalo de pH 1-7 en donde se encuentra la mayoría de los alimentos. Estos cambios estructurales con respecto al pH incluyen la formación de la sal flavilio, la base anhidra y la pseudobase carbinol (Braverman, 1980).

Es así como las antocianinas exhiben intensos colores rojos en medios fuertemente ácidos en rangos de pH entre 1 y 3 y sufren transformaciones estructurales reversibles, con pérdida del color rojo y/o la formación característica de colores indeseables a pH elevados (Hrazdina, 1981; citado por Quispe, 2003).

Como se puede observar en la Figura 4, los cambios de color de la antocianina con respecto al pH.



Figura 4. Cambios de color de la antocianina con respecto al pH

C.2. Temperatura

Según los estudios realizados sobre la estabilidad de las antocianinas han indicado que estos pigmentos son muy sensibles al calor. La degradación de este pigmento dependerá en mayor medida de la estructura química.

Como en la mayoría de las reacciones químicas la estabilidad de las antocianinas y el porcentaje de degradación está marcadamente influenciada por la temperatura. La estabilidad térmica de las antocianinas varía con su estructura, pH, la presencia de oxígeno e interacciones con otros componentes del sistema.

En general las fracciones estructurales que conducen a incrementar la estabilidad térmica, la hidroxilación de la aglicona decrece la estabilidad mientras que la metoxilación glicosidación y acilación tienen el efecto opuesto (Hendry, 1992; citado por Quispe, 2003).

La estabilidad de la antocianina está directamente relacionada con la temperatura. Las conversiones estructurales de las antocianinas son reacciones endotérmicas. Resisten bien los procesos térmicos alta temperatura-corto tiempo. Por efecto del calor (a temperaturas por encima de 60°C) se degradan según su cinética de primer orden. En general, las características estructurales que conducen a una mayor estabilidad al pH son las mismas que conducen a una mayor estabilidad térmica. Por lo tanto, las antocianinas altamente hidroxiladas son menos estables térmicamente que las metiladas, glicosiladas o acetiladas (Fennema, 1996).

C.3. Luz

Se ha reconocido que la luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. Se ha observado que la sustitución del hidroxilo en C-5 hace que la antocianina sea más susceptible a la fotodegradación. Sin embargo, la copigmentación puede retrasar esta

fotodegradación, cuando ésta se presenta con flavonas polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas.

Las antocianinas son generalmente inestables cuando exhiben la luz ultravioleta (UV) o luz visible u otras fuentes de radiación ionizante. Su descomposición parecería ser principalmente foto-oxidación. Las antocianinas sustituidas en el grupo hidroxilo del C-5 son más susceptibles a la descomposición foto-química, que aquellos no sustituidos en esa posición mencionada (Hendry, 1992; citado por Quispe, 2003).

La estructura química propia de la molécula influye notablemente en la estabilidad de las antocianinas. A si vemos en el estudio realizado por van Buren et al. (1968) reportaron que las antocianinas diglucósidas metiladas y aciladas exhiben la más grande estabilidad en contra de la luz en la elaboración de vinos, siendo los monoglucósidos y diglucósidos no acilados menos estables.

Por este motivo en la producción de vinos se aconseja envasar los zumos y vinos tintos en botellas de vidrio oscuro (Yúfera, 1979; citado por Quispe, 2003).

C.4. Azúcares

Los azúcares que más frecuentemente forman parte de las antocianinas de las frutas son glucosa, ramnosa, galactosa, arabinosa y soforosa (B-D glucosa(1:2)-D-glucosa)(Yúfera, 1979; citado por Quispe, 2003).

La naturaleza de éstos azúcares influyen en la estabilidad de las antocianinas. Por ejemplo la antocianina conteniendo galactosa es más estable que aquella con arabinosa (Lock, 1997).

Los azúcares a altas concentraciones, como ocurre en las conservas de frutas, estabilizan las antocianinas. Este efecto se cree que es debido a la disminución de la actividad de agua.

El ataque nucleofílico del agua sobre el catión flavilio ocurre en la posición C-2, formándose una base carbinol incolora. Cuando los azúcares están presentes en concentraciones lo suficientemente bajas como para tener poco efecto sobre la actividad de agua, ellos o sus productos de degradación pueden a veces acelerar la degradación de las antocianinas. A concentraciones bajas, la fructosa, arabinosa, lactosa y sorbosa tienen un efecto degradativo mayor sobre las antocianinas que la glucosa, sacarosa y maltosa. La velocidad de degradación de la antocianina sigue la velocidad de degradación del azúcar a furfural. El furfural, que se deriva de las aldopentosas, y el hidroximetilfurfural, que es un derivado de las cetoheptosas, resultan de la reacción de Maillard o de la oxidación del ácido ascórbico.

Estos compuestos se condensan fácilmente con las antocianinas, formando compuestos pardos. Se desconoce el mecanismo de esta reacción. Es muy dependiente de la temperatura, se acelera por la presencia de oxígeno y es muy evidente en los zumos de fruta (Fennema, 1996).

Meschter (1953), citado por Quispe (2003) relacionó el efecto de los azúcares en la estabilidad de las antocianinas. Este efecto se atribuye a la presencia de productos de degradación de los azúcares tales como el furfural y el 5-hidroximetil-furfural, que se forman en medio ácido, en el calentamiento o durante un prolongado almacenamiento a temperatura ambiente.

Por otro lado Lock (1997) señala que las concentraciones altas de azúcar (<20%) o de jarabe para preservar las frutas o jugos de frutas tienden a ejercer un efecto protector sobre las antocianinas.

C.5. Enzimas

Las reacciones enzimáticas ocasionan la degradación de las antocianinas y estas ocurren de forma natural en el fruto.

Huang (1955), citado por Quispe (2003), mostró que las glucosidasas fúngicas (antocianinasas) pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos de las antocianinas produciendo antocianidinas, las cuales son mucho más inestables que las antocianinas y se decolorarían espontáneamente.

Estas enzimas fúngicas tienen carácter de B-glucosidasa e hidrolizan el enlace glucosídico en el átomo de carbono 3, produciendo el correspondiente aglucón, el cual es incoloro y puede entrar, posteriormente a una secuencia de reacciones secundarias de degradación (Braverman, 1980).

Junto a la antocianasa, la polifenoloxidasas puede también contribuir a la destrucción de la antocianina por medio de la oxidación acoplada. Las antocianinas tratándose de compuestos polifenólicos, cabe esperar que resulten afectadas por la polifenoloxidasas, pero no se ha confirmado la existencia de enzimas oxidantes de las antocianinas. Se ha demostrado que las peroxidases actúan sobre las antocianinas decolorándolas rápidamente en presencia de catecol o ácido clorogénico. Se admite que estos actúan como compuestos intermediarios siendo oxidado en primer lugar por la acción de la enzima, a o-quinona para luego provocar la oxidación de la antocianina (Quispe, 2003).

C.6. Metales

La estabilidad de las antocianinas se da únicamente en medios fuertemente ácidos. Debido a la inestabilidad de sus bases anhidro estos compuestos favorecen la decoloración en el rango de pH 4 a 6. Desde que el pH de algunas frutas cae dentro de este rango es posible que las antocianinas en su estado original, existen efectivamente en su forma estable.

Algunos investigadores indican la posible implicancia de complejos antocianina-metal en la estabilidad del color. Aunque anhidro bases puras son bastantes inestables, ellos forman sustancias complejas con metales tales como Aluminio y fierro los cuales son bastantes estables a altos pH (Shrikhande, 1976; citado por Quispe, 2003).

La presencia de iones metálicos da lugar a cambios de color en las antocianinas, por formación de complejos o verdaderas sales metálicas (Yúfera, 1979; citado por Quispe, 2003).

Las antocianinas con grupos hidroxilo fenólicos vecinos pueden secuestrar diversos metales multivalentes. La formación de complejos produce el desplazamiento batocrómico hacia el azul. La adición de AlCl_3 a las disoluciones de antocianinas se ha utilizado como una herramienta analítica para diferenciar la cianidina, la petunidina y la delphinidina de la pelargonidina, la peonidina y la malvidina. Este último grupo de antocianinas no posee hidroxilos fenólicos vecinos y por lo tanto, no reaccionan con el Al^{+3} . Según algunos estudios, la formación de complejos con metales estabiliza el color de los alimentos que contienen antocianina. Se ha observado que el Ca, Fe, Al y Sn ofrecen cierta protección a las antocianinas de los zumos de arándanos americanos; sin embargo, la decoloración azul y parda producida por los complejos metal-tanino contrarresta cualquier efecto beneficioso (Francis, 1978; citado por Quispe, 2003).

Los recipientes de aluminio también inducen a muchos cambios en las coloraciones de las antocianinas. Sin embargo, la presencia de iones citrato atenúa o evita éstos fenómenos probablemente por secuestrar los iones metálicos. Por este motivo en el envasado de frutos no deben emplearse lastas de hojalata, sino están convenientemente barnizadas (Yúfera, 1979; citado por Quispe, 2003).

C.7. Dioxido de sulfuro

En algunas ocasiones las frutas que contienen antocianinas son conservadas para su posterior procesamiento, mediante tratamientos que implica la utilización de cantidades moderadas de anhídrido sulfuroso que las decolora. Al desulfitar las frutas para la obtención de sus elaborados se regeneran nuevamente el color de las antocianinas. (Yúfera, 1979; citado por Quispe, 2003).

En las industrias frutícolas se emplea el anhídrido sulfuroso para el blanqueo de antocianinas. Este blanqueo puede ser reversible e irreversible. Así tenemos que concentraciones grandes de SO_2 (1.0 a 1.5%) y cal son usados para la destrucción de antocianinas de cerezas rojas en la preparación de cerezas marrasquino; usadas en ensaladas de frutas y cocteles. Las reacciones que implican este blanqueo irreversible no es muy conocido pero el mecanismo llevado es probable que sea el de la formación de una chalcona.

Investigaciones realizadas demuestran que concentraciones de SO_2 alrededor de 30 ppm pueden inhibir la degradación enzimática en la antocianina de cereza agridulce sin necesidad de un blanqueo (Markakis, 1974).

La decoloración de las antocianinas por SO_2 se produce por una reacción de este agente en la posición 4 de las antocianinas para formar un compuesto de adición, esta reacción es irreversible cuando la adición no se produce en la posición 2. En el caso que la posición 4 de las antocianinas se encuentre bloqueada por grupos metilo o fenilo no se ven afectados por el SO_2 y también son más estables a la luz en presencia de ácido ascórbico o trazas de hierro (Dominic, 1989; citado por Quispe, 2003).

C.8. Reacciones de condensación

Este fenómeno ha sido frecuentemente observado en los jugos de frutas que son almacenados por largos periodos de tiempo en donde se ve que pierden su color rojo, apareciendo en su lugar un color marrón o rojo ladrillo. Tenemos el ejemplo de la mermelada de fresa que después de un año de almacenamiento a temperatura ambiente ya no contiene ninguna antocianina, tornándose de color marrón rojizo. Esto ha sido demostrado, para el caso de vinos. (Quispe, 2003).

Las reacciones de condensación producidas en las antocianinas, se dan en la posición 4 con otros flavonoides como los flavanoles (Por ejemplo: catequinas) mediante una sustitución electrofílica para dar dímeros y polímeros. El producto resultante es un flaveno que puede oxidarse a 4-fenil antocianina. Es así como la pérdida progresiva de las antocianinas durante el envejecimiento del vino es atribuido a estos tipos de reacciones de condensación. En general alrededor de la mitad de las antocianinas se pierden formando flavenos (Dominic, 1989; citado por Quispe, 2003).

Los pigmentos condensados son menos sensibles a los cambios de pH que las antocianinas precursoras y son estables ante el SO₂ evitando su decoloración (Dominic, 1989; citado por Quispe, 2003).

C.9.La Copigmentación

Este es un mecanismo protector para las antocianinas y se da probablemente a través de los enlaces hidrógeno entre los grupos fenólicos de las moléculas de las antocianinas y flavonas. Las moléculas de flavona se intercalan entre las antocianinas para formar apilamientos alternados (Dominic, 1989; citado por Quispe, 2003).

Este mecanismo intermolecular al formar complejos con proteínas, taninos y otros flavonoides como quercetina y rutina aumentan la estabilidad y color de las antocianinas (Lock, 1997).

De estas sustancias solo unas pocas han sido investigadas con detalle. Los coloridos flavonoides y polifenoles son frecuentemente encontrados en asociación con antocianinas en vacuolas de las células coloridas de los órganos de las plantas, por lo tanto el fenómeno de copigmentación es difundido en la naturaleza (Davies y Mazza, 1993; citado por Quispe, 2003).

D. Extracción de antocianinas

El proceso de extracción es una operación difusional que implica la disolución de un componente soluble (soluto) de un material sólido en un sobrenadante (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

En un proceso de extracción se debe considerar tres etapas:

- El soluto se disuelve en el solvente
- El soluto se difunde hasta la superficie del sólido
- La migración desde la superficie del sólido en cuestión, hasta el grueso de la disolución.

D.1. Factores que influyen en la extracción de antocianinas

D.1.1. Tamaño de partícula o área de interfase sólido-líquido

La reducción del tamaño de partícula incrementa la velocidad de extracción debido al aumento del área y a la reducción de la distancia que el soluto tiene que migrar del interior del sólido a la superficie.

Sin embargo, un sólido demasiado dividido dificulta la extracción porque impide la libre circulación del solvente, el drenaje del sólido residual resulta más difícil y se separa las partículas del líquido; por lo tanto, es muy importante buscar un tamaño de partícula adecuado y eficiente que nos permita un mismo tiempo de extracción (Fernandez, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.1.2. Solvente

La selección del solvente es determinado por la estructura química del material a extraer, además de considerar los siguiente criterios:

- Propiedades Físicas, la baja tensión superficial facilita la humectación de los sólidos, baja viscosidad mejora la difusión en el disolvente y baja densidad permite la retención de una masa reducida de disolvente en el sólido extraído.
- Total estabilidad térmica a las temperaturas de procesamiento.

D.1.3. 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. Muchos estudios sobre la estabilidad de las antocianinas han indicado que son fácilmente degradadas por el calor. Kan et al., (1976); citado por Fernández, (1995), recomienda usar temperaturas comprendidas entre los 60 y 90°C.

D.1.4. Tiempo

El tiempo de extracción está en función inversa a los factores de temperatura y agitación (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

Es necesario tiempo suficiente para que el soluto pueda difundirse hasta la superficie y ponerse en contacto con el solvente.

D.1.5. Velocidad del flujo del solvente o agitación

A mayor velocidad y turbulencia del flujo del solvente sobre la superficie del sólido mayor es la velocidad de extracción. Si se extrae sólidos finamente divididos es necesario una agitación mecánica controlada, para prevenir la sedimentación.

Si es excesiva la agitación puede conducir a una desintegración de las partículas sólidas.

D.1.6. Equilibrio entre el solvente y el soluto

Es importante una adecuada relación entre solvente y materia prima a ser extraída. Proporciones altas dan lugar a extractos muy diluidos y con proporciones bajas no hay buena difusión ni se logra obtener todo el soluto presente.

El equilibrio es alcanzado cuando el soluto se disuelve totalmente y la concentración de la solución que se forma es uniforme (Fernández, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.1.7. Numero de lavados

Es necesario determinar el número de lavados a que debe ser sometida la materia prima hasta obtener un extracto con una concentración suficientemente apropiada (Fernandez, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.2. Métodos de extracción

D.2.1. Maceración

Consiste en exponer el sólido a la acción del solvente hasta obtener que éste penetre la estructura y disuelva las porciones solubles a la temperatura ambiente y tiempo conveniente, teniendo en cuenta que los sólidos tienen que estar sumergidos.

Si el tiempo de maceración es prolongada debe usarse conservadores para evitar alteraciones microbianas (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.2.2. Agitación mecánica o difusión

Este método consiste en colocar la muestra con el solvente en un recipiente de vidrio y mediante un agitador mecánico se pone en contacto el solvente con la materia prima para obtener el colorante deseado (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.2.3. Cocciones

Son preparados líquidos que se obtienen hirviendo con agua sustancias vegetales.

La muestra se coloca en un recipiente de vidrio, se agrega al solvente y se somete a ebullición por diferentes tiempos. La temperatura de extracción debe ser tal que no afecte a la estructura del colorante (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

D.2.4. Lixiviación o percolación

Este método de extracción consiste en quitar y recuperar un componente soluble de un sólido, mediante el tratamiento de éste con un disolvente (líquido).

El líquido puede ser una mezcla heterogénea de varios componentes ya sean sólidos o líquidos en disolución, ó una mezcla homogénea como una solución sólida o una sal doble.

Los sólidos a lixiviar tienen diferentes formas físicas por lo que es necesario su desintegración para formar una mayor superficie de contacto con el disolvente.

Las fuerzas físicas que tienen efecto importante en la lixiviación son: gravedad, viscosidad, adherencia, fricción, ósmosis, capilaridad y solución (Araujo, 1995; citado por Huaroto, 2005).

E. Purificación

Es necesaria la purificación de los extractos para eliminar materiales extraños como otras sustancias fenólicas, pectina, etc., que pueden influenciar en la estabilidad y/o análisis de dichos pigmentos.

La purificación de antocianinas para propósitos analíticos ha sido llevada a cabo primariamente mediante técnicas cromatográficas y tradicionalmente por cromatografía en papel.

Varios métodos son descritos en la literatura para la purificación preliminar de antocianinas presentes en soluciones que contienen altas concentraciones de azúcar, tales como solvente de extracción; precipitación con acetato de plomo, mercurio y zinc; el empleo de columnas de poliamida y resinas de intercambio iónico.

E.1. Precipitación con acetato de plomo

La precipitación de antocianinas como sales de plomo es el método más viejo usado en la separación de antocianinas de los otros constituyentes vegetales y es aun frecuentemente usado para la purificación preliminar y concentración de antocianinas. Para tal propósito se ha usado varias sales o pseudosales de plomo bivalente.

Las antocianinas no son sólo el único grupo de compuestos presentes en los extractos vegetales que son capaces de formar pequeñas sales de plomo solubles. Los compuestos que poseen un grupo carboxílico libre (orgánicos, fenólicos, grasos, aminoácidos y proteínas) u otros grupos nucleofílicos, tales como un grupo hidroxilo fenólico (flavonoides, taninos, etc.) también precipitan con acetato de plomo. Ya que el acetato de plomo precipita numerosos constituyentes vegetales, así como la antocianina, este método no es adecuado para la purificación absoluta de antocianinas, pero sin embargo, es bastante adecuado para la purificación preliminar de antocianinas presentes en extractos vegetales acuosos o etanólicos.

La reacción entre el plomo y las antocianinas no son perfectamente comprendidas actualmente, pero se conoce que debido al carácter anfotérico de la antocianina, la reacción entre el plomo y la antocianina es dependiente del pH. La presencia de grupos hidroxilo libres adyacentes a la molécula de antocianina es favorable para la formación de sales de plomo insolubles. Consecuentemente, los glicósidos de cianidina, delphinidina, y petunidina son precipitados a un pH más bajo que con la pelargonidina, peonidina y malvidina. Esto indica que el grupo hidroxilo fenólico de antocianinas conteniendo un grupo O-hidroxilo libre es más ácido que aquellos que carecen tal grupo del extremo. Esta diferencia en la reactividad entre la antocianina es utilizada para propósitos de identificación usando acetato de plomo como agente cromogénico.

En análisis de vinos y jugos de uva, son comúnmente usadas el método de precipitación fraccionada de antocianinas usando ya sea acetato de plomo básico o acetato de plomo neutro, o la subsiguiente regulación del pH.

Considerando la inestabilidad de antocianinas en el método alcalino, es imprudente incrementar el pH a un nivel alto o de usar acetato de plomo básico. De acuerdo a Fuleki

(1968), citado por Fernández (1995), el acetato de plomo podría causar alguna degradación de las antocianinas, particularmente en un medio en la cual no es altamente ácido. Asimismo, observó que la precipitación con acetato de plomo presenta el mismo riesgo usando un álcali, la degradación en este caso es debido al exceso del reactivo alcalino y al tiempo de exposición.

Fuleki (1968), citado por Fernández (1995), reportó que usando acetato de plomo neutro y amonio para precipitar pigmentos obtuvo un 92.5% de recuperación de antocianinas híbridas del vino rojo.

Fuleki (1968c), citado por Fernández (1995), halló que la malvidina-3-glucosido y los pigmentos acilados de la uva fueron parcialmente precipitados por el acetato de plomo neutro y en menor cantidad la peonidina 3-glucosido. Algunas pérdidas de los pigmentos acilados inestables sucedieron cuando la precipitación fue llevada a cabo con acetato de plomo básico o en un medio ligeramente básico. El almacenamiento de los pigmentos en su forma compleja de plomo concluyó con una pérdida completa de antocianinas aciladas.

F. Concentración

Es el proceso en el cual se separa por ebullición una parte del líquido contenido en una disolución o suspensión. Los fines principales de esta operación, según Brennan et al. (1970) citado por Fernández (1995) son:

- a) Como una operación intermedia de un proceso, por ejemplo, antes del secado por atomización, secado en tambor, cristalización, etc.
- b) La disminución del volumen de líquido para reducir los costos del almacenamiento, embalaje y transporte.
- c) Para aumentar la concentración de sólidos solubles de los productos alimenticios, a fin de facilitar la preservación.

En el caso de pigmentos naturales, durante la evaporación, se deben mantener baja la temperatura de ebullición y utilizar tiempos de residencia cortos de la solución en la zona de calefacción. Las temperaturas de ebullición se disminuyen reduciendo la presión de trabajo del evaporador. Con ello es posible obtener diferencias de temperaturas satisfactorias con un medio de calefacción a temperaturas equivalentemente más bajas.

Varios son los tipos de evaporadores que se pueden adquirir en el mercado. Su clasificación se da en función a la forma, configuración de la superficie de calefacción, y, en función de los medios empleados para proveer la circulación con agitación del líquido.

Para productos sensibles al calor, los evaporadores rotatorios o de película barrida son los que cada día tienen mayor aplicación.

ASPECTO METODOLÓGICO

3.1. Tipo de estudio

La investigación será de manera descriptiva, explicativa con metodología cuantitativa en cuanto al análisis de antocianinas y a la evaluación estadística.

3.2. Diseño de la Investigación

El esquema experimental para obtener néctar de granada con camu camu y esteviósido, se observa en la Figura 4.

3.3. Población o Universo

La población o universo en cuanto a la materia prima es la granada variedad Wonderfull, proveniente de Ica.

3.4. Unidad de análisis y Muestra

La unidad de análisis es la granada variedad Wonderfull, se tomará una muestra representativa para realizar su análisis.

3.5. Instrumentos de recopilación de datos. (Cuantitativos y/o cualitativos)

Análisis de contenido de antocianinas de acuerdo a cada condición de trabajo.

3.5.1. Métodos de control

- a) **Humedad.** Método de AOAC (1995)
- b) **Determinación de grasa (Extracto etéreo).** Método Soxhlet recomendado por la AOAC (1995)
- c) **Ceniza.** Por incineración de la muestra recomendado por la AOAC (1995).
- d) **Proteína.** A través del método semimicro Kjeldahl, considerando 6.25 como factor de conversión del nitrógeno a proteína (AOAC, 1995).
- e) **Fibra Cruda.** Según hidrólisis ácida y alcalina recomendado por la AOAC (1995).
- f) **Carbohidratos.** Se obtiene por simple diferencia con relación a los otros componentes.
- g) **pH.** Método potenciométrico recomendado por la AOAC (1995)
- h) **Determinación del Rendimiento.** Se determinará en función a la cantidad de antocianinas totales (Tacys) recuperadas en las pruebas evaluadas respecto a la cantidad de antocianinas totales iniciales

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Tacys recuperadas}}{\text{Tacys iniciales}} \times 100$$

- i) **Determinación de la pureza.** Se determinará en función a la cantidad de antocianinas totales en el extracto entre la cantidad de sólidos totales presentes en el mismo.

$$\text{Pureza}(\%) = \frac{\text{Tacys recuperadas}}{\text{sólidos totales}} \times 100$$

- j) **Determinación de la actividad peroxidasa.** Se realizará en la materia fresca acondicionándose el método empleado por Hemeda y Klein (1990), citado por Quispe (2003), el cual consiste en los siguientes pasos:

Preparación de la fuente enzimática (Extracto crudo)

El fruto se colocará en una canastilla metálica perforada y calentada en un baño de agua a diferentes temperaturas por intervalos de tiempo. Apenas transcurrido el tiempo de calentamiento se enfriará con agua a 0°C.

Al fruto tratado térmicamente se le quitará la cascara, la que será mezclada con 4 volúmenes de agua destilada en una licuadora por 2 a 3 minutos.

Luego esta solución se filtrará a través de un paño de tela. La solución se centrifugará a 2000 rpm por 20 a 30 minutos, separando el sobrenadante que se utilizará como fuente enzimática.

Preparación de la solución sustrato:

Se mezclarán 10 ml de solución de guayacol (1%), 10 ml de peróxido de hidrógeno (0.3%) y 100 ml de Buffer fosfato de sodio (0.1M y pH 6.5). La solución preparada se aireará por 2 minutos y se dejará reposar en la oscuridad por 10 minutos.

Análisis espectrofotométrico

Se mezclarán 2.9 ml y 1.6 ml del extracto crudo, para la medición espectrofotométrica a 470 nm y 25°C en el espectrofotómetro cada 5 segundos, determinándose la actividad enzimática para cada tratamiento. La presencia de la actividad de la enzima peroxidasa se evidenciará por la aparición del color ladrillo como consecuencia de la reacción del sustrato (Guayacol) con la fuente enzimática. La actividad residual o remanente se obtendrá de dividir la actividad enzimática obtenida en el tratamiento entre la actividad enzimática inicial multiplicada por 100.

Actividad enzimática

$$\text{residual (\%)} = \frac{\text{Actividad enzimática obtenida en el tratamiento}}{\text{Actividad enzimática inicial}} \times 100$$

k) Determinación de antocianinas totales e índice de degradación

Para la cuantificación de antocianinas totales se utilizará el método de pH diferencial recomendado por Fuleki y Francis (1968 b), citado por Fernández (1995).

Las soluciones buffer empleadas para el ajuste del pH serán:

- Buffer a pH 1.0: KCl 0.2N-HCl 0.2N (25:67)
- Buffer a pH 4.5: Acetato de sodio 1M: HCl 1N: Agua (100:60:90)

El método consiste en diluir la muestra que se va a analizar en las soluciones buffer a pH 1.0 y 4.5. Dejándose reposar por 2 horas en oscuridad, procediéndose luego a su lectura a 525 nm y 700 nm. Utilizándose como blanco el agua destilada.

La determinación de las antocianinas totales se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$TacyS/100g \text{ muestrab.s.} = \frac{\Delta D.O \times Vd \times Vt}{W \times Fbs \times Va \times E^{1\%}_{1cm}} \times 100$$

Donde:

TacyS= Miligramos de antocianinas que hay en una cantidad de muestra

$\Delta D.O = (\text{Abs pH } 1_{525 \text{ nm}} - \text{Abs pH } 1_{700 \text{ nm}}) - (\text{Abs pH } 4.5_{525 \text{ nm}} - \text{Abs pH } 4.5_{700 \text{ nm}})$

Diferencia de la absorbancia a pH 1.0 medido a 525nm y 700 nm respecto a la absorbancia a pH 4.5 medido en ambas longitudes.

Vd= Volumen en ml en la cual el extracto es diluido para su medición de absorbancia.

Vt= Volumen total en ml, empleado para la extracción del pigmento de la cantidad de la muestra utilizada.

Va= Volumen de alícuota del extracto obtenido en ml utilizado para ser disuelto en un volumen de buffer (Vd) para su posterior lectura de absorbancia.

W= cantidad de muestra (g) utilizada para la extracción del pigmento en una cantidad de solvente empleado (Vt).

Fbs= Fracción de materia seca en la muestra.

$E^{1\%}_{1cm} = 77.5$ es el coeficiente de extinción molecular promedio de cianidinas del arándano en medio acuoso, reportado por Fuleki y Francis (1968b), citado por Fernandez (1995).

Índice de degradación

El índice de degradación indica el grado de deterioro de las antocianinas presente en las muestras. Fue empleado por Fuleki y Francis (1968b), citado por Fernández (1995) en el estudio realizado en el arándano y es obtenido por la división de las lecturas de absorbancia.

$$I.D. = \frac{D.O._{pH 1.0} / 87.3}{\Delta D.O. / 77.5}$$

Donde:

I.D. = Es una constante, que directamente expresa la degradación del pigmento. No presenta límites máximos ni mínimos como rango de tolerancia.

$\Delta D.O.$ = Diferencia entre la densidad óptica total determinada a pH 1.0 y pH 4.5, leídas a 525 nm y 700 nm respectivamente.

$D.O._{pH\ 1.0}$ = lectura de la absorbancia leída a 525 nm al cual se le resta la lectura realizada a 700 nm de una muestra diluida con el buffer a pH = 1.0.

$E_{1cm}^{1\%} = 87.3$. Coeficiente de extinción molecular promedio de las cianidinas del arándano a pH 1.0, reportado por Fuleki y Francis (1968b) citado por Fernández (1995).

$E_{1cm}^{1\%} = 77.5$. Coeficiente de extinción molecular promedio de las cianidinas del arándano en medio acuoso, reportado por Fuleki y Francis (1968b), citado por Fernández (1995).

II) Índices representativos del color

Serán determinados según metodología utilizada por Díaz et. Al. (1979, citado por Fernández (1995).

Degradación del color

El método consiste en dividir la absorbancia medida a una longitud de onda de 530 nm entre la absorbancia medida a una longitud de onda de 420 nm del extracto de antocianina, medida en una solución de etanol (95%): HCl (1.5N) a pH 1.0. Cuando más alto es el valor de este cociente más aceptable es el color y viceversa.

Intensidad del color

El método consiste en la suma de la absorbancia medidas a una longitud de onda de 530 nm y la absorbancia medida a una longitud de onda de 420 nm del extracto de antocianina, medidos en el solvente antes mencionado.

l) Determinación del espectro de máxima absorción

Se evaluará la longitud de onda de máxima absorción mediante un barrido espectrofotométrico, para lo cual se empleó la metodología utilizada por Harborne (1958), citado por Quispe (20013), el cual consiste en disolver la muestra en una solución de metanol conteniendo 0.01% HCl concentrado, procediéndose a dar lecturas de D.O. para determinar el pico de máxima absorción cuyo rango de valores máximos esta entre 0.8-1.3 de la región visible. Se procederá a realizar el barrido espectrofotométrico que abarcará la región ultravioleta y visible del espectro de absorción.

m) Determinación de la cinética de degradación

Para el estudio de la estabilidad se utilizará la metodología dada por Labuza (1979), citado por Quispe (2003), el cual nos permite determinar la constante de velocidad de degradación y el tiempo de vida media del extracto concentrado de colorante ante los efectos de los factores evaluados.

$$\pm \partial A / \partial t = K(A)^n$$

Donde:

$\pm \partial A / \partial t$ = Ganancia o pérdida de una característica medible a través del tiempo.

K= Constante de la velocidad de degradación (1/t).

A= Concentración inicial de la característica medible

n=Orden de la reacción.

$$t_{1/2} = Ln(0.5) / K$$

$t_{1/2}$ = Tiempo de vida media (t)

3.6. Metodología Experimental

La presente investigación tiene como objetivo:

- Determinación de los parámetros de extracción de las antocianinas presentes en la cascara de Granada.

3.6.1. Determinación de los parámetros de extracción del colorante antocianina a partir de la cáscara de granada

En la Figura se muestra el flujo general de operaciones para obtener el extracto concentrado de antocianinas de la cascara de granada, que se describe a continuación:

a. Materia prima

Se utilizará la cáscara de granada, al cual se le evaluará inicialmente el contenido de antocianinas totales utilizando el método del pH diferencial de Fuleki y Francis (1968 b); mencionado por Fernández (1995) y citado en la metodología.

b. Selección

Esta operación se realizará manualmente con el fin de descartar las granadas que presenten signos de deterioro, dañados o con indicios de pudrición.

c. Lavado

El lavado se realizará manualmente con agua potable, para la eliminación de tierra e impurezas.

d. Inactivación enzimática

La fruta entera se pasará por vapor húmedo a presión atmosférica por 1, 2 y 3 minutos.

Luego se enfrían con agua helada a 4 °C. Luego se evalúa la actividad enzimática residual de la peroxidasa.

e. Pelado

Se pelaran las granadas sacando una fina capa con un cuchillo o pelador.

f. Secado

Esta operación tiene el objetivo de disminuir el contenido de humedad de la materia prima para facilitar el proceso de extracción del colorante y poder conservar sus características durante su almacenamiento.

g. Molienda

El objetivo de esta operación es reducir el tamaño de partículas para mejorar el rendimiento de extracción por aumento del contenido interfacial entre soluto y solvente al aumentar la velocidad de extracción. Se realizará en un molino de martillos.

h. Licuado

Se realizará una prueba con la cáscara no deshidratada, el objetivo de esta operación es reducir el tamaño de partículas para mejorar el rendimiento de extracción por aumento del contacto interfacial entre soluto y solvente al aumentar la velocidad de extracción. Se realizará en una licuadora.

i. Extracción

Esta operación tiene como fin separar la antocianinas de la cascara de granada, empleando como parámetros de extracción:

- Tamaño de partícula
- Tipo de ácido empleado en la extracción
- Concentración de ácido en el solvente extractivo
- Relación materia prima/solvente
- Temperatura y tiempo de extracción

En esta operación se realiza una combinación de métodos: lixiviación, maceración y agitación de las muestras.

Evaluación del tipo de ácido en el solvente extractivo

Los ácidos a estudiar fueron: ácido cítrico, ácido málico y ácido sulfúrico. Este último se utilizará como un patrón de comparación. Estos serán disueltos en medios a un pH 2, donde 5 gramos de muestra será macerado en el solvente bajo la proporción de 1/20 por 12 horas con agitación constante y a temperatura ambiente.

La selección del mejor tratamiento se realizará sobre la base del mayor contenido de antocianinas totales, conjuntamente se determinará el porcentaje de pureza en los extractos obtenidos.

Concentración del ácido

Se realizará con el ácido cítrico y málico en un rango de pH de 1 a 3

ACIDO CITRICO								
% Acido	0	0.1	0.5	1	2	3	4	5
pH								

ACIDO MÁLICO								
% Acido	0	0.1	0.5	1	2	3	4	5
pH								

La selección del mejor tratamiento se realizará sobre la base del mayor contenido de antocianinas totales, conjuntamente se determinará el porcentaje de pureza en los extractos obtenidos.

Relación materia prima: solvente

Las proporciones serán: 1: 2; 1:6; 1:10; 1:15; 1:20. Esta prueba se realizará manteniendo constante los parámetros antes mencionados y a la temperatura ambiente. Se cuantificará las antocianinas totales para escoger el mejor tratamiento.

Temperatura y tiempo de extracción

Se evaluarán diferentes tratamientos, combinaciones de temperaturas y tiempos de extracción, manteniendo constante los parámetros seleccionados en las pruebas anteriores.

El esquema experimental se muestra en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Esquema Experimental para evaluar la temperatura y tiempo de extracción

Tiempo (hora)	Contenido de antocianinas totales (Tacy/100 gr b.s.)			
	T=22°C	T=30°C	T=40°C	T=50°C
1	A ₁₁	A ₂₁	A ₃₁	A ₄₁
4	A ₁₂	A ₂₂	A ₃₂	A ₄₂
8	A ₁₃	A ₂₃	A ₃₃	A ₄₃
12	A ₁₄	A ₂₄	A ₃₄	A ₄₄

La selección de la mejor combinación de temperatura y tiempo para ambos ácidos se efectuará sobre la base del mayor contenido de antocianinas totales, reflejado en un mayor rendimiento de extracción.

j. Filtración

Esta operación tiene por finalidad eliminar residuos sólidos u otras partículas presentes. La separación de las impurezas presentes en el extracto se realizará

mediante la operación de filtración con papel Whatman N°1 con la ayuda de una bomba de vacío.

k. Centrifugación

Esta operación permite eliminar las impurezas suspendidas que pasan el filtro debido probablemente al almidón u otros sólidos presentes. Se procederá a centrifugar el extracto a 4000 rpm por 20 minutos.

l. Concentración

El extracto obtenido será sometido a una concentración al vacío en una rotavapor a una temperatura de 60°C, llegando a un nivel de sólidos comprendido entre 55 °Brix y 60°Brix.

m. Envasado y Almacenado

Los extractos obtenidos serán guardados en frasco de vidrio oscuro (ámbar) y bajo refrigeración, para luego ser utilizado en las pruebas que permitan la caracterización del extracto.

3.7. Análisis estadístico

Se aplicará el Diseño Completamente al Azar (DCA), para la evaluación de la concentración de ácidos y relación materia prima: solvente. Para el caso de la temperatura y tiempo de extracción se efectuará el diseño factorial 4Ax4B, utilizando un nivel de significación del 0.05%.

En el caso de encontrarse diferencias significativas se procederá a realizar la prueba de comparación de promedios de Duncan.

3.8. Ética de la investigación (de ser necesario y si afecta a aspectos morales, éticos)

No afecta aspectos morales o éticos

4. ASPECTO TÉCNICO ADMINISTRATIVO

4.1. Recursos requeridos

4.1.1. Materia prima e insumos

- Granada (*Punica granatum*) variedad Wonderful, proveniente de Ica. Perú.

4.1.2. Reactivos

- Agua destilada (Aquality S.A.)
- Etanol de 95°G.L. (Montana)
- Ácido cítrico comercial (Montana)
- Acido málico (Fudaroma)
- Buffer a pH 1.0: KCl 0.2N-HCl 0.2N (25:67)
- Buffer a pH 4.5: Acetato de sodio 1M: HCl 1N: Agua (100:60:90)

- Ácido sulfúrico
- NaOH
- Hexano

4.1.3. Equipos

- Espectrofotómetro
- Refractómetro
- Potenciómetro
- Balanza analítica
- Balanza halógena para humedad.
- Agitador magnético
- Estufa
- Baño María, con regulación de temperatura y velocidad
- Rotavapor
- Molino de cuchillas
- Secador de bandejas con aire caliente
- Mufla
- Equipo Soxhlet
- Equipo Kjeldahl

Materiales y empaques

- Frascos de color ámbar
- Bolsas laminadas

Materiales de laboratorio de vidrio: pipetas, beaker, fiola, baguetas, etc

RESULTADOS:

1. Extracción del colorante antocianina a partir de la cáscara de granada

En la Figura se muestra el flujo general de operaciones para obtener el extracto concentrado de antocianinas de la cáscara de granada, que se describe a continuación:

n. Materia prima

Se utilizó la cáscara de granada variedad Wonderful

o. Selección

Esta operación se realizó manualmente con el fin de descartar las granadas que presenten signos de deterioro, dañados o con indicios de pudrición.

p. Lavado

El lavado se realizó manualmente con agua potable, para la eliminación de tierra e impurezas.

q. Pelado

Se pelaron las granadas sacando una fina capa con un cuchillo o pelador.

r. Reducción de tamaño

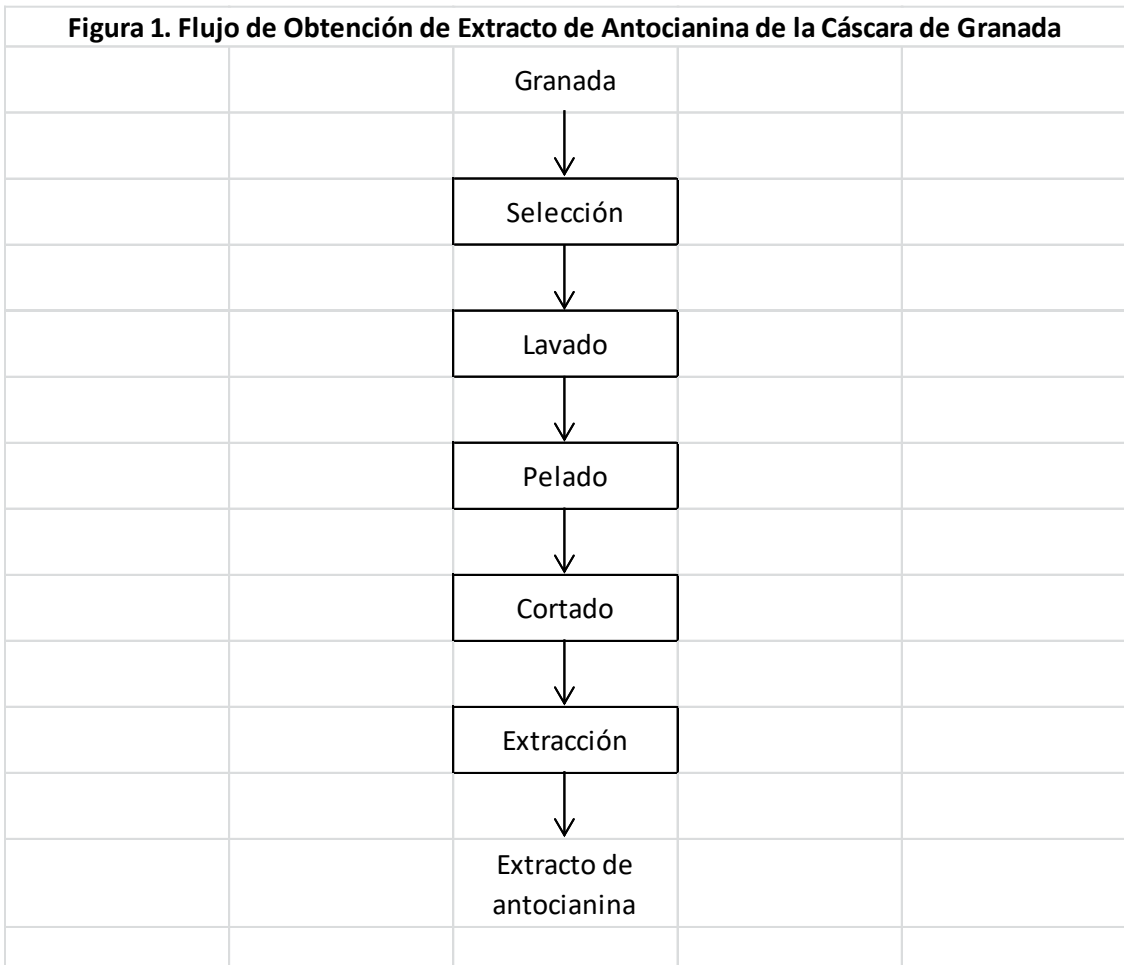
El objetivo de esta operación es reducir el tamaño de partículas para mejorar el rendimiento de extracción por aumento del contenido interfacial entre soluto y solvente al aumentar la velocidad de extracción. Se realizó con cuchillo, el tamaño es de 1cm x 1cm. No se hizo muy fino porque dificultaría el filtrado posterior.

s. Extracción

Esta operación tiene como fin separar las antocianinas de la cáscara de granada, empleando como parámetros de extracción:

- Tamaño de partícula
- Tipo de ácido empleado en la extracción
- Concentración de ácido en el solvente extractivo
- Relación materia prima/solvente
- Temperatura y tiempo de extracción

En esta operación se realiza una combinación de métodos: lixiviación, maceración y agitación de las muestras.



2. COMPOSICIÓN PROXIMAL DE LA CÁSCARA DE GRANADA

Se determinó el %Humedad, %Materia Seca y % Cenizas como se observan en el Cuadro 1 y Cuadro 2.

Cuadro 1. %Humedad y Materia Seca de la Cáscara de Granada						
N°	PLACA	MUESTRA	PLACA + MUESTRA	PLACA + MUESTRA DESECADA	% HUMEDAD	% Materia Seca
	(g)	(g)	(g)	(g)	bh	
1	36.4687	5.0015	41.4702	37.8994	71.39	28.61
2	36.7643	5.0000	41.7643	38.2149	70.99	29.01
3	36.5839	5.0010	41.5849	38.058	70.52	29.48
PROMEDIO					70.97	29.03

Cuadro 2. % Cenizas de la Cáscara de Granada						
N°	CRISOL	MUESTRA	CRISOL + MUESTRA	CRISOL + CENIZAS	% CENIZAS bh	%CENIZAS bs
	(g)	(g)	(g)	(g)		
1	25.976	2.5064	28.4824	25.6537	-12.86	-44.95
2	25.6237	2.5316	28.1553	25.6545	1.22	4.19
3	25.4429	2.5020	27.9449	25.4731	1.21	4.09
PROMEDIO					1.21	4.14

3. PRUEBAS PRELIMINARES

Se realizaron pruebas preliminares (Figura 2), con el fin de hallar la mejor proporción entre cáscara y solvente y se observó de manera visual la mayor pigmentación de color, dando como resultado la relación 1:5 (cáscara: solvente) como la de mejor coloración. Se utilizó 2 tipos de solventes:

1. solución de ácido cítrico pH=2 T°50°C
2. solución alcohólica al 70% y pH=2 T° ambiente

Y nos quedamos con la solución de ácido cítrico a pH=2 y T° 50°C ya que mostró igual coloración que la de alcohol, solo que los costos serían menores.

Figura 2. Diseño Experimental de las Pruebas Preliminares

			1ra Etapa, 15 min	2da Etapa, 15 min	Tratamientos
			400 rpm	400 rpm	
			Piel de granada: Solución	Piel de granada: Solución	
			1:5	1:5	T1
		Sol. Ác. cítrico pH=2, T°= 50 °C	1:10	1:10	T2
Piel de granada fresca					
			2da Etapa, 30 min	2da Etapa, 30 min	
			400 rpm	400 rpm	
			1:5	1:5	T3
		Sol. Alcohol 70% con Ac. cítrico pH=2, T°=amb	1:10	1:10	T4

4. PRUEBAS DEFINITIVAS

Se realizaron las Pruebas Definitivas como se observa en la Figura 3, con el fin de hallar medir la cantidad de antocianinas presentes en los 18 tratamientos. Para ello se utilizó los siguientes parámetros constantes:

- Proporción de cáscara: solvente (1:5)
- Etapas de extracción: 2
- pH=2
- RPM=400

Las siguientes variables:

- Dos tipos de soluciones: ácido cítrico y ácido málico
- Temperatura: 50°C, 40°C, 30°C
- Tiempo: 15 min, 30 min y 60 min

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 3. Diseño Experimental de las pruebas Definitivas

			1ra Etapa 400 rpm	2da Etapa 400 rpm	T° (°C)	Tiempo (min)	Tratamientos
			Piel de granada: Solución	Piel de granada: Solución			
Piel de granada fresca	Sol. Ácido cítrico pH=2	50	1:5	1:5	50	15	T1
						30	T2
						60	T3
		40	1:5	1:5	40	15	T4
						30	T5
						60	T6
		30	1:5	1:5	30	15	T7
						30	T8
						60	T9
	Sol. Ácido málico pH=2	50	1:5	1:5	50	15	T10
						30	T11
						60	T12
		40	1:5	1:5	40	15	T13
						30	T14
						60	T15
		30	1:5	1:5	30	15	T16
						30	T17
						60	T18

6. CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN LOS TRATAMIENTOS

Según Gorriti *et al.* 2009, utilizó la siguiente fórmula para hallar las antocianinas en maíz morado, la cual se aplicó para hallar las antocianinas de la cáscara de granada.

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

Dónde:

$\Delta A = (A_{510} - A_{700}) \text{ pH } 1.0 - (A_{510} - A_{700}) \text{ pH } 4.5$

PM (Peso Molecular) = 449.2 g/mol para cianidina-3-glucósido

FD = Factor de dilución

L = longitud de paso de celda en cm

$\epsilon = 26900$ coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido

1000 = Factor de conversión de g a mg

Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 5.

Cuadro 3. Lectura de las Absorbancias de los Tratamientos Definitivos

Long. Onda nm	pH	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
510	1	0.47	0.626	0.725	0.464	0.495	0.656	0.381	0.331	0.333	0.408	0.55	0.445	0.396	0.469	0.615	0.312	0.24	0.408
	4.5	0.177	0.378	0.373	0.214	0.471	0.566	0.177	0.143	0.155	0.26	0.335	0.16	0.209	0.233	0.265	0.164	0.112	0.202
700	1	0.04	0.056	0.08	0.026	0.043	0.056	0.03	0.019	0.038	0.038	0.071	0.048	0.035	0.037	0.053	0.019	0.028	0.034
	4.5	0.04	0.084	0.095	0.053	0.095	0.134	0.04	0.026	0.046	0.08	0.083	0.039	0.043	0.051	0.05	0.012	0.023	0.043

Cuadro 4. Diferencias de Absorbancias para hallar el contenido de antocianinas

pH	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
A pH1	0.43	0.57	0.645	0.438	0.452	0.6	0.351	0.312	0.295	0.37	0.479	0.397	0.361	0.432	0.562	0.293	0.212	0.374
A pH4.5	0.137	0.294	0.278	0.161	0.376	0.432	0.137	0.117	0.109	0.18	0.252	0.121	0.166	0.182	0.215	0.152	0.089	0.159
ΔA	0.293	0.276	0.367	0.277	0.076	0.168	0.214	0.195	0.186	0.19	0.227	0.276	0.195	0.25	0.347	0.141	0.123	0.215

Cuadro 5. Concentración de Antocianinas en los Tratamientos Definitivos

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
Concentración de antocianinas en el extracto (mg/L)	24.464	23.044	30.642	23.128	6.346	14.027	17.868	16.281	15.530	15.864	18.953	46.089	16.281	20.874	28.973	5.886	10.270	17.951
Concentración de antocianinas en la cáscara de granada (mg/100 g de granada)bh	24.464	23.044	30.642	23.128	6.346	14.027	17.868	16.281	15.530	15.864	18.953	46.089	16.281	20.874	28.973	5.886	10.270	17.951
Concentración de antocianinas en la cáscara de granada (mg/100 g de granada)bs	84.268	79.378	105.550	79.666	21.858	48.317	61.547	56.083	53.494	54.645	65.286	158.757	56.083	71.901	99.798	20.276	35.375	61.835

CONCLUSIONES

Con el tratamiento 12, con solución de ácido málico a pH= 2, con proporción de piel de granada y solución de 1:5, con un tiempo de 50°C y un tiempo de 60 minutos, se obtuvo mayor concentración de antocianinas 158.8 mg/100 g de piel de granada en base seca y 46.1 mg/100 mg de piel de granada en base húmeda, semejante a las fresa y frambuesas rojas.

RECOMENDACIONES

Teniendo en cuenta que la piel de granada es desechada, se recomienda su utilización para extracción de antocianinas con el tratamiento obtenido ya que se aprovecharía al máximo su extracción de antocianinas.

BIBLIOGRAFIA

1. A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemist). 1995. Oficial Methods of Analysis. 16th Edition Vol2. USA., 1995.
2. Arrazola, G.; Herazo, I. y Alvis, A. 2014. Microencapsulación de Antocianinas de Berenjena (*Solanum melongena* L.) mediante Secado por Aspersión y Evaluación de la Estabilidad de su Color y Capacidad Antioxidante Información Tecnológica. Vol. 25(3), 31-42 (2014). Colombia.
3. Betalleluz Pallardel, I.M. (2006). Estudio de las antocianinas y evaluación de su estabilidad en extractos de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón). Tesis para optar el grado de Mag Sc. En Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina. 99 p.
4. Braverman, J., 1980. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Impreso en El Manual Moderno. Mexico. 358 p.
5. Calín, A. y Carbonell, A. La fruta granada cultivada en España. Universidad Miguel Hernández. España. Revisado de <http://www.besana.es/sites/default/files/zumodegranada.pdf> en mayo del 2014.
6. Çam M., Jihad N. ; Erdogan F., 2014. Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. LWT - Food Science and Technology 55 (2014) 117e123. Elsevier. Turkey.
7. Chandrasekhar, J.; Madhusudhan, M.C; Raghavarao, K.S.M.S. 2012. Extraction of anthocyanins from red cabbage and purification using adsorption. Food and Bioproducts Processing, Volume 90, Issue 4, October 2012, Pages 615-623. India.
8. Fennema, O. 1996. Química de los alimentos. Impreso Zaragoza Acribia. España. 1067 p.
9. Fernández Fernández, N.A. 1995. Estudio de la extracción y pre purificación de antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.). Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru).125 p.

10. Gorriti, A.; Quispe, F.; Arroyo, J; Córdova, A.; Jurado, B.; Santiago, I. y Taype, E. 2009. Extracción de Antocianinas de las corontas de Zea mays L. "Maíz Morado". Ciencia e Investigación 12(2):64-74. Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Lima Perú.
- 11.
12. Hayouni E.A.; Miled K.; Boubaker, S. ; Bellasfar Z. ;Abedrabba M.; Iwaski , H.; Oku H.; Matsui, T.; Limam, F.; Hamdi, M. 2011. Hydroalcoholic extract based-ointment from Punica granatum L. peels with enhanced in vivo healing potential on dermal wounds. Phytomedicine 18 (2011) 976–984. Elsevier. Tunes.
13. Huaroto, R.B.2005. Obtención de un extracto concentrado de antocianinas a partir de la cáscara de uvina. Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). 112 p.
14. Lock, O. 1997 Colorantes naturales. Impreso en Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima (Peru). 274 p
15. Markakis, P. 1974. Anthocyanins and their stability in food. Crit. Rev. Food Technol, 4, 437-456.
16. Quispe, R.A. 2003. Estudio de la extracción de antocianinas del camote morado (Ipomoea batatas (L.) lam). Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima (Peru). 150 p.
17. Ramos, M.; Jordán, O.y Bravo, N. (2012). Fitoquímicos en Alimentos. Licopeno, antocianinas, batalaínas y taninos. Diogo Impresiones. Lima -Perú . 133 p.
18. Tabaraki, R.; Heidarizadi, E. ; Benvidi, A. 2012.Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (Punica granatum L.) peel antioxidants by response surface methodology. Separation and Purification Technology (98) 16–23. Elsevier. Iran
19. Ventura, J. 2012. Elaboración de una jalea adicionada con fitoquímicos de cáscara de *Punica granatum* L. con posible utilidad para el control de la diabetes mellitus. Tesis para optar el grado de Doctora en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapala. Mexico D.F.
20. Vishal J.; Muruganathan ,G. ; Deepak, M. ; Viswanatha, G.L.; Manohar , D. 2011. Isolation and Standardization of Various Phytochemical Constituents from Methanolic Extracts of Fruit Rinds of Punica granatum. Chinese Journal of Natural Medicines Vol 9 (6): 0414–0420. Elsevier. India