

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN EL EXTRACTO FERMENTADO DE *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) FRENTE A LOS EXTRACTOS FERMENTADOS DE *Zea mays L.* (MAIZ MORADO) Y *Vaccinium corymbosum L.* (ARÁNDANO)

Tesis presentada por los Bachilleres:

Fernandez Gallardo, Allem Brajan

Puma Jihuanca, Robinson Henry

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Ing. Córdova Barrios, Cinthia

Arequipa- Perú

2021

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL



DE: **FERNANDEZ GALLARDO, Allem Brajan**
PUMA JIHUALLANCA, Robinson Henry

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"COMPARACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE, CITOTOXICIDAD Y EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS DE LA *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA VARIEDAD BLACK & BLUE) FRENTE A *Zea maíz* (MAIZ MORADO) y *Vaccinium myrtillus* (ARANDANO)"

DICTAMINADORES: 1) **Dr. Jose Villanueva Salas** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Sr. Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMAS:   (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA 17/10/16

ASESOR: **Ing. Cinthia Córdova Barrios**


DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"COMPARACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS DE *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) FRENTE A *Zea mays* L. (MAIZ MORADO) Y *Vaccinium corymbosum* L. (ARANDANO)"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.
Atentamente

FIRMA  FECHA 14/11/16

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas** 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**
2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrentes, luego de lo cual habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, y debiendo cambiar el título a: **"COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN EL EXTRACTO FERMENTADO DE *Tropaeolum tuberosum* (MASHUA) FRENTE A LOS EXTRACTOS FERMENTADOS DE *Zea mays* L. (MAIZ MORADO) Y *Vaccinium corymbosum* L. (ARÁNDANO)"**, consideramos que el presente trabajo de investigación se encuentra APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA 28/01/2021

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

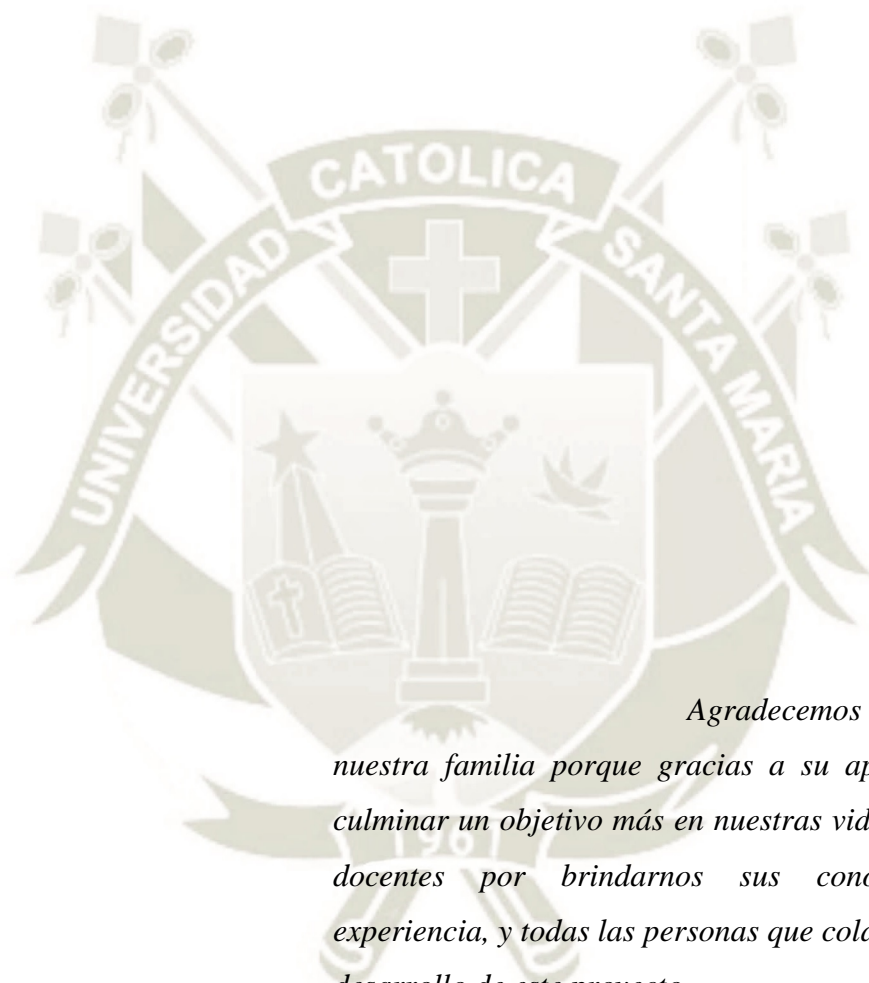
FECHA

Dedicatorias

*A nuestros padres, porque fueron el el cimiento para la construcción de nuestra vida profesional, sentando las bases de responsabilidad y deseo de superación.
A nuestros docentes por su dedicación en nuestra formación como profesionales.*



Agradecimiento



Agradecemos a Dios, a nuestra familia porque gracias a su apoyo se logró culminar un objetivo más en nuestras vidas, a nuestros docentes por brindarnos sus conocimientos y experiencia, y todas las personas que colaboraron en el desarrollo de este proyecto.

En especial a nuestros amigos, porque sin ellos nos hubiéramos graduado antes.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se comparó la capacidad antioxidante y el contenido de antocianinas en los extractos fermentados de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

Se determinó la influencia del pH, temperatura y tiempo de fermentación en la Mashua, Maíz morado y Arándano. Se observó que todas las variables puestas en estudio tuvieron influencia en la cantidad de antocianinas totales extraídas.

La extracción de las antocianinas en los fermentados se realizó a las 3 materias primas aplicando iguales condiciones y parámetros; para esto, se preparó inóculos con *Saccharomyces cerevisiae*, se ajustó la concentración de sólidos solubles a 12 brix y se procedió a preparar los extractos durante 72 h, primero se evaluó los parámetros de pH y temperatura dando como resultados óptimos para las tres materias primas un pH entre 2-3 y la temperatura de 30°C, un aumento o disminución en estos rangos produjo disminución en la extracción de antocianinas. Luego para la evaluación del tiempo de extracción se tomaron los parámetros óptimos de pH y temperatura; se procedió a evaluarlos en el tiempo; dando como resultado óptimo las 72 horas.

Posteriormente se realizaron ensayos para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, para esto se tomó los extractos fermentados con mayor contenido de antocianinas totales de la Mashua, Maíz morado y Arándano. Se procedió a realizar los ensayos a diferentes concentraciones y se encontró que la Mashua posee 180.342 mg/eq Trolox en 100 g de muestra a diferencia del Maíz morado con 179.397 mg/eq Trolox en 100 g de muestra y el Arándano con 98.896 mg/eq Trolox en 100 g de muestra.

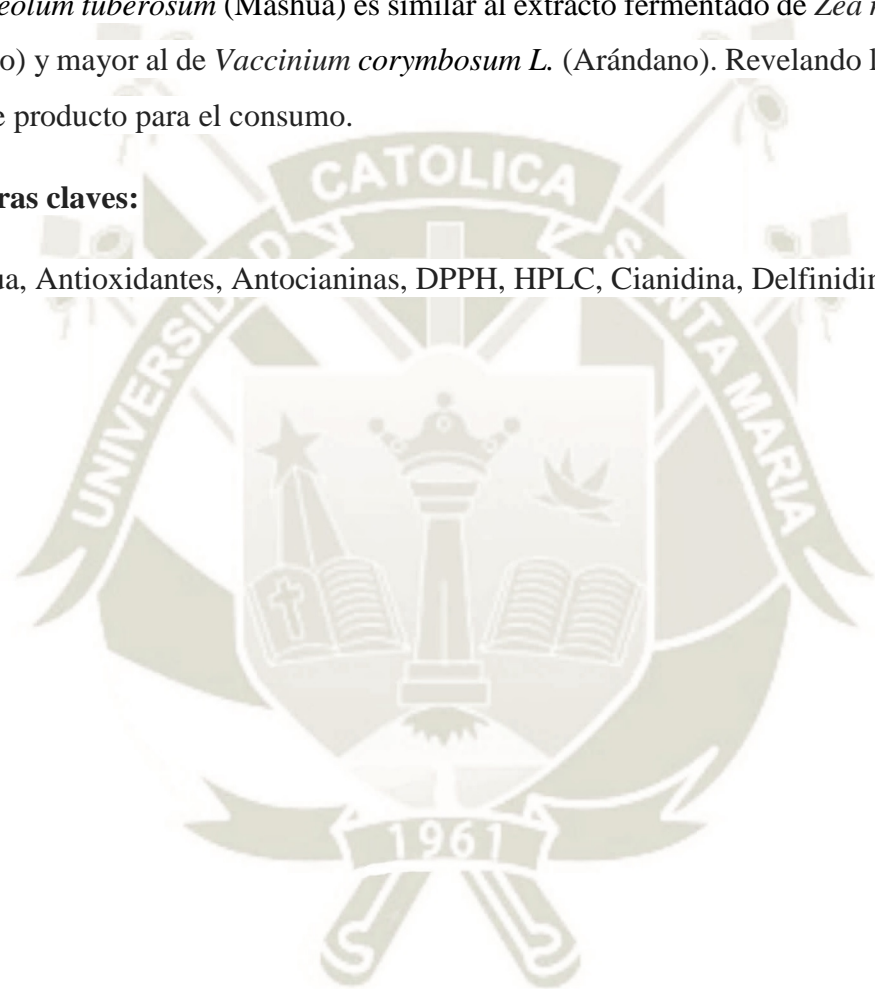
Luego se procedió a la identificación de antocianinas por HPLC, primero se purificó cada uno de los extractos fermentados con mayor contenido de antocianinas totales, utilizando polivinilpolipirrolidona (PVPP) seguido de cartuchos sep-pack C-18, una vez purificados se llevó al rotavapor para disminuir el volumen, a estos extractos metanólicos se les dió un tratamiento específico para posteriormente ser analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia; las muestras fueron analizadas por comparación con estándares de Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido dando como resultado un tiempo de retención de 6.127 min y 5.757 min respectivamente para cada estándar. Se encontró la

presencia de las antocianinas antes mencionadas en las muestras de Mashua y Arándano, pero en el maíz morado sólo se encontró la Cianidina-3-glucósido. La concentración de Delfinidina-3-glucósido fue de 0.0195 mg/g y 0.0475 mg/g de Mashua y el Arándano respectivamente; la concentración de Cianidina-3-glucósido fue de 0.0298 mg/g, 0.1973 mg/g y 0.0311 mg/g de Mashua, Maíz morado y Arándano respectivamente.

En tanto, se observa que la capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) es similar al extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado) y mayor al de *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano). Revelando la importancia de este producto para el consumo.

Palabras claves:

Mashua, Antioxidantes, Antocianinas, DPPH, HPLC, Cianidina, Delfinidina.



ABSTRACT

In the present research work, the antioxidant capacity and anthocyanin content of the ferments of *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) were compared with *Zea mays* L. (Purple corn) and *Vaccinium corymbosum* L. (Blueberry).

The influence of pH, temperature and fermentation time in the Mashua, Purple Corn and Blueberry was determined. It was observed that all the variables put into study had an influence on the amount of total anthocyanins extracted.

The extraction of anthocyanins in the ferments was carried out to the 3 raw materials applying the same conditions and parameters, for this, inocula with *Saccharomyces cerevisiae* were prepared, the concentration of soluble solids was adjusted to 12 brix and the extracts were prepared for 72 h, first the pH and temperature parameters were evaluated, giving as optimal results for the three raw materials a pH between 2-3 and the temperature of 30 ° C, an increase or decrease in these ranges produced a decrease in the extraction of anthocyanins. Then, for the evaluation of the extraction time, the optimal parameters of pH and temperature were taken; they were evaluated over time; giving as optimal result 72 hours.

Subsequently, tests were carried out to determine the antioxidant activity by the DPPH method, for this the ferments with the highest content of total anthocyanins of Mashua, Purple Corn and Blueberry were taken. The tests were carried out at different concentrations and it was found that Mashua has 180.342 mg / eq Trolox in 100 g of sample, unlike Purple Corn with 179.397 mg / eq, Trolox in 100 g of sample and Blueberry with 98.896 mg / eq Trolox in 100 g sample.

Then the anthocyanins were identified by HPLC, first each of the ferments with the highest total anthocyanin content was purified, using polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) followed by sep-pack C-18 cartridges, once purified they were taken to a rotary evaporator to decrease volume, these methanolic extracts were given a specific treatment to later be analyzed by high efficiency liquid chromatography; The samples were analyzed by comparison with Cyanidin-3-glucoside and Delphinidin-3-glucoside standards, resulting in a retention time of 6,127 min and 5,757 min respectively for each standard. The presence of the aforementioned anthocyanins was found in the Mashua and Cranberry samples, but only Cyanidin-3-glucoside was found in purple corn. The concentration of Delphinidin-3-glucoside was 0.0195 y 0.0475 mg/g for Mashua and

Blueberry respectively; Cyanidin-3-glucoside concentration was 0.0298 mg/g, 0.1973 mg/g y 0.0311 mg/g for Mashua, Purple corn and Blueberry respectively.

Meanwhile, it is observed that the antioxidant capacity of the fermented extract of *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) is similar to the fermented extract of *Zea mays* L. (Purple corn) and higher than that of *Vaccinium corymbosum* L. (Blueberry). Revealing the importance of this product for consumption.

Keywords:

Mashua, Antioxidants, Anthocyanins, DPPH, HPLC, Cyanidin, Delphinidin



INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo y la producción de alimentos con alto valor nutritivo, y el mayor interés de las personas por el cuidado de la salud, hace que se busquen alimentos que no solo contengan cantidades adecuadas de nutrientes esenciales, sino que a su vez contengan sustancias fisiológicamente activas que cumplan, al igual que los nutrientes esenciales una función en beneficio de la salud, contribuyendo a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades y elevar la calidad de vida.

Los compuestos fenólicos y especialmente los flavonoides y antocianinas, muestran una gran capacidad para captar radicales libres que son causantes del estrés oxidativo, y a su vez se le atribuye un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas¹. Estos compuestos fenólicos aparecen como parte de una amplia gama de alimentos funcionales.

La pigmentación en los vegetales es una contribución de los compuestos fenólicos y está reconocida a través de las antocianinas que son responsables de los colores azules, rojo, violeta y púrpura de la mayoría de los vegetales entre ellas las frutas, los tubérculos y los granos.

Tropaeolum tuberosum (Mashua) es un tubérculo nativo de nuestro país de menor consumo nacional, debido al desconocimiento de su valor nutricional y su aporte en la seguridad alimentaria. La mashua negra es un tubérculo de color negro azulado con alto contenido de compuestos fenólicos entre ellos las antocianinas, que le proporcionan ese color particular. Estudios realizados recientemente demostraron que la mashua negra tiene 8 a 10 veces mayor actividad antioxidante que la mashua de color amarillo sugiriendo así que los compuestos fenólicos juegan un rol importante en el poder antioxidante de este tubérculo².

La mashua negra no es muy conocida como sí lo son el *Zea mays L.* (Maíz morado) y el *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) con demostrada presencia de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. El maíz morado oriundo de América tiene mayor contenido de antocianinas en la tusa o coronta que representa el 15 % de la mazorca el resto está constituido por el grano, por otra parte, el fruto del arándano también es rico en compuestos fenólicos en especial las antocianinas.

El arándano a pesar de ser una de las especies de reciente introducción en la fruticultura mundial, ha tenido un gran crecimiento debido a sus cualidades. En el Perú a partir del 2008 se empieza a plantar un creciente número de hectáreas de arándanos, y para el 2016 sierra exportadora estima una producción de 20000 toneladas, El maíz morado también tiene una producción creciente en el Perú superando las 1500 toneladas en Arequipa y a nivel nacional supera las 20000 toneladas según sierra exportadora; ambos cultivos (arándano y maíz morado) son ampliamente conocidos y producidos a nivel nacional, aportando beneficios a los productores, En cambio el cultivo de mashua negra no supera las 10 hectáreas de producción, siendo un cultivo con alto potencial debido a sus propiedades, su rusticidad y la poca tecnificación que requiere; por eso es necesario difundir más investigaciones para promoverla.



ÍNDICE

DICTAMEN APROBARORIO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

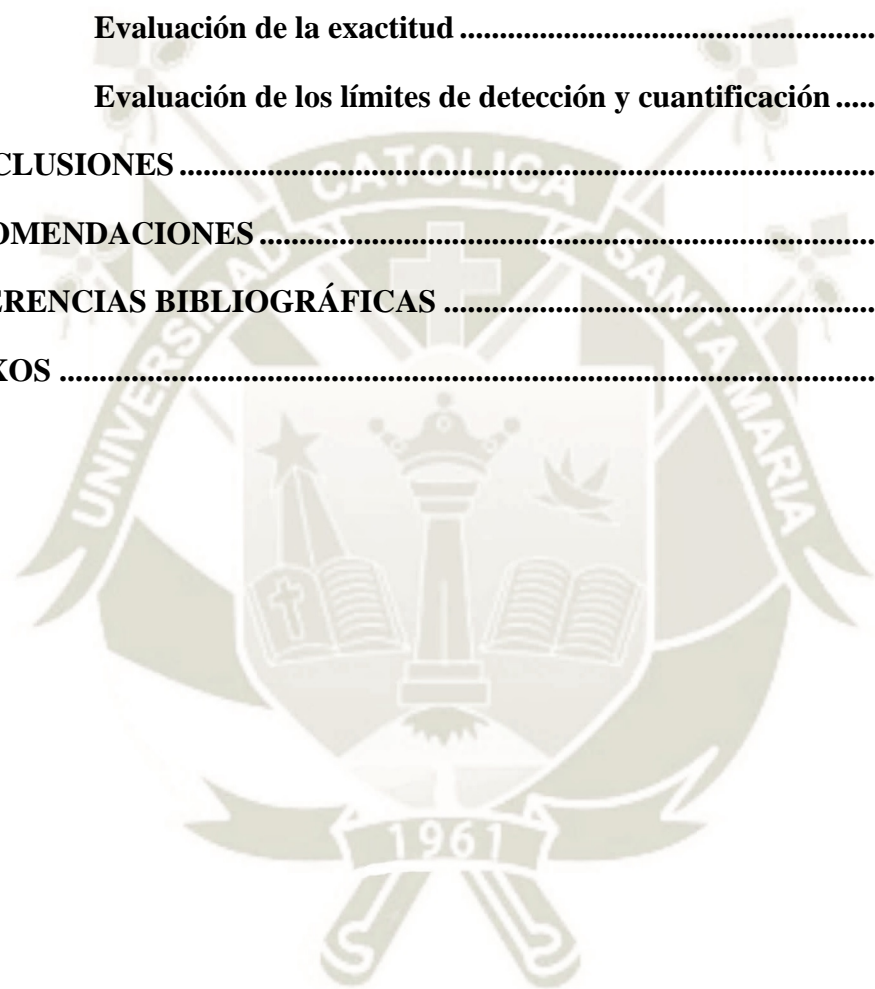
INTRODUCCIÓN

| | |
|--|----|
| CAPITULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO | 1 |
| 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 2 |
| 1.1 Determinación del problema | 2 |
| 1.2 Enunciado del problema | 2 |
| 1.3 Descripción del problema | 2 |
| 1.4 Justificación..... | 2 |
| 2. OBJETIVOS..... | 3 |
| 2.1 Objetivo general..... | 3 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 3 |
| 3. MARCO TEÓRICO | 4 |
| 3.1 Tropaeolum tuberosum (Mashua). | 4 |
| 3.1.1 Descripción | 4 |
| 3.1.2 Taxonomía | 5 |
| 3.1.3 Valor Nutricional | 6 |
| 3.1.4 Origen | 7 |
| 3.1.5 Usos e Importancia | 7 |
| 3.2 Zea mays L. (Maíz morado)..... | 8 |
| 3.2.1 Descripción | 8 |
| 3.2.2 Taxonomía | 9 |
| 3.2.3 Valor nutricional..... | 11 |

| | | |
|--|---|-----------|
| 3.2.4 | Origen | 11 |
| 3.2.5 | Usos e importancia..... | 12 |
| 3.3 | Vaccinium corymbosum L. (Arándano)..... | 13 |
| 3.3.1 | Descripción | 13 |
| 3.3.2 | Taxonomía | 14 |
| 3.3.3 | Valor nutricional..... | 15 |
| 3.3.4 | Origen | 15 |
| 3.3.5 | Usos e importancia..... | 16 |
| 3.4 | Fenoles | 16 |
| 3.4.1 | Estructura química de los fenoles..... | 17 |
| 3.4.2 | Fenoles como antioxidantes..... | 17 |
| 3.4.3 | Biosíntesis de compuestos fenólicos..... | 18 |
| 3.4.4 | Tipos de fenoles | 18 |
| 3.4.5 | Clasificación de los flavonoides en base a sus variaciones estructurales | 19 |
| 3.5 | Antocianinas..... | 20 |
| 3.5.1 | Estructura química | 20 |
| 3.5.2 | Biosíntesis de antocianinas..... | 22 |
| 3.5.3 | Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas..... | 23 |
| 3.5.4 | Antocianina como colorante y antioxidante | 25 |
| 3.6 | Estrés oxidativo..... | 27 |
| 3.7 | Radicales libres | 27 |
| 3.7.1 | Producción de radicales libres de oxígeno | 28 |
| 3.7.2 | Reactividad de los radicales libres | 28 |
| 3.7.3 | Daño molecular inducido por radicales libres | 28 |
| 3.8 | Antioxidantes | 29 |
| 3.8.1 | Niveles de la acción antioxidante | 30 |
| 3.8.2 | Propiedades funcionales | 31 |
| 3.8.3 | Actividad antioxidante por DPPH..... | 31 |
| 3.9 | HPLC | 32 |
| 4. | HIPÓTESIS | 42 |
| CAPITULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL | | 43 |
| 1. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 44 |

| | | |
|-------------------------------|---|----|
| 1.1 | Lugar de ejecución | 44 |
| 1.2 | Materiales | 44 |
| 1.2.1 | Material biológico | 44 |
| 1.2.2 | Material de laboratorio | 44 |
| 1.2.3 | Reactivos e insumos | 44 |
| 1.2.4 | Equipos | 45 |
| 1.2.5 | Otros..... | 45 |
| 1.3 | Métodos | 45 |
| 1.3.1 | Obtención y preparación de la materia prima | 45 |
| 1.3.2 | Obtención de los extractos fermentados de antocianinas..... | 46 |
| 1.3.3 | Evaluación del efecto del pH y la temperatura en la extracción de antocianinas..... | 47 |
| 1.3.4 | Evaluación del tiempo de fermentación en el contenido de antocianinas..... | 48 |
| 1.3.5 | Actividad antioxidante | 48 |
| 1.3.6 | Purificación de antocianinas | 49 |
| 1.3.7 | Identificación de las antocianinas por HPLC..... | 50 |
| 1.3.8 | Desarrollo de parámetros para el análisis por HPLC. | 51 |
| CAPITULO III RESULTADOS | | 54 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 55 |
| 1. | Extracción de antocianinas | 55 |
| 1.1 | Evaluación del contenido de antocianinas totales (AT) en los extractos fermentados en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano) a diferente pH y temperatura. | 55 |
| 1.2 | Evaluación del contenido de antocianinas totales (AT) en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano) por días de fermentación..... | 61 |
| 2. | Evaluación de la capacidad antioxidante..... | 64 |
| 2.1 | Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos fermentados de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano). | 64 |
| 2.2 | Evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox..... | 66 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Evaluación de antocianinas por HPLC | 68 |
| 3.1 Evaluación de los tiempos de retención | 68 |
| 3.2 Evaluación de la linealidad | 68 |
| 3.3 Evaluación de la precisión | 71 |
| 3.3.1 Repetibilidad | 71 |
| 3.3.2 Repetibilidad intermedia..... | 71 |
| 3.4 Evaluación de la exactitud | 72 |
| 3.5 Evaluación de los límites de detección y cuantificación | 75 |
| CONCLUSIONES | 77 |
| RECOMENDACIONES | 79 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 80 |
| ANEXOS | 93 |



Índice de Figuras

| | |
|---|-----------|
| Figura N°1: <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua)..... | 4 |
| Figura N°2: Colores y formas de la <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) | 5 |
| Figura N°3: <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) | 9 |
| Figura N°4: <i>Vaccinium Corymbosum L.</i> (Arándano) | 13 |
| Figura N°5: La molécula del fenol. | 17 |
| Figura N°6: Núcleo principal de la estructura de los flavonoides. | 20 |
| Figura N°7: Cianidina-3-glucósido, R=H o Cianidina-3,5-diglucosido, R=glucosa | 20 |
| Figura N°8: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas | 21 |
| Figura N°9: Biosíntesis de antocianinas | 23 |
| Figura N°10: Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde R1= H o glúcido, R2 y R3= H o metilo | 24 |
| Figura N°11: Diferencia de un radical libre y un átomo normal. | 28 |
| Figura N°12: Molécula de DPPH | 32 |
| Figura N°13: Molécula de Trolox | 32 |
| Figura N°14: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) a diferente pH y temperatura..... | 56 |
| Figura N°15: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) a diferente pH y temperatura. | 56 |
| Figura N°16: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano) a diferente pH y temperatura. | 57 |
| Figura N°17: Contenido de antocianinas totales en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) por días de fermentación..... | 62 |
| Figura N°18: Contenido de antocianinas totales en <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) por días de fermentación..... | 62 |
| Figura N°19: Contenido de antocianinas totales en <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano) por días de fermentación..... | 63 |
| Figura N°20: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) | 65 |
| Figura N°21: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado). | 65 |

| | |
|--|-----------|
| Figura N°22: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano)..... | 65 |
| Figura N°23: Capacidad antioxidante de Trolox | 66 |
| Figura N°24: Linealidad de la Cianidina-3-glucósido..... | 69 |
| Figura N°25: Linealidad de la Delfinidina-3-glucósido. | 70 |
| Figura N°26: <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua)..... | 73 |
| Figura N°27: <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado). | 74 |
| Figura N°28: <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano). | 75 |



Índice de Tablas

| | |
|---|-----------|
| Tabla N°1: Clasificación taxonómica de la <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón (Mashua) National Center for Biotechnology Information (NCBI)..... | 6 |
| Tabla N°2: Composición de la <i>Tropaeolum tuberosum</i> Ruiz & Pavón (Mashua) | 6 |
| Tabla N°3: Clasificación taxonómica del <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado) | 9 |
| Tabla N°4: Composición del <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado) | 11 |
| Tabla N°5: Clasificación taxonómica del <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano) | 14 |
| Tabla N°6: Composición del <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano) | 15 |
| Tabla N°7: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas | 21 |
| Tabla N°8: Color y distribución de las principales antocianinas en algunas frutas y vegetales comunes | 22 |
| Tabla N°9: Contenido de antocianinas totales en frutas y vegetales comunes | 22 |
| Tabla N°10: Antioxidantes enzimáticos. | 29 |
| Tabla N°11: Funciones fisiológicas de algunos antioxidantes.¹³ | 30 |
| Tabla N°12: Contenido de Antocianinas totales (AT) en los extractos fermentados de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano) a diferente pH y temperatura. | 55 |
| Tabla N°13: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) | 58 |
| Tabla N°14: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua)..... | 59 |
| Tabla N°15: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado) | 59 |
| Tabla N°16: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en <i>Zea maíz</i> L. (Maíz morado)..... | 60 |
| Tabla N°17: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano)..... | 60 |
| Tabla N°18: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano)..... | 61 |
| Tabla N°19: Contenido de antocianinas totales en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays</i> L. (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum</i> L. (Arándano) por días de fermentación..... | 61 |

| | |
|---|----|
| Tabla N°20: Capacidad antioxidante de los extractos fermentados de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua), <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado) y <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano). | 64 |
| Tabla N°21: Porcentajes de captación de radicales libres con respecto a concentraciones de trolox. | 66 |
| Tabla N°22: Porcentaje de actividad antioxidante de las diferentes muestras expresado en mg/eq Trolox en 100g de muestra. | 67 |
| Tabla N°23: Capacidad antioxidante en los extractos fermentados de <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Zea mayz L.</i> (Maiz morado) | 67 |
| Tabla N°24: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua) y <i>Zea mayz L.</i> (Maiz morado). | 68 |
| Tabla N°25: Tiempos de retención de la Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido. | 68 |
| Tabla N°26: Linealidad de la Cianidina-3-glucósido | 69 |
| Tabla N°27: Linealidad de la Delfinidina-3-glucósido. | 69 |
| Tabla N°28: Estadística de regresión lineal de la Cianidina-3-glucósido..... | 70 |
| Tabla N°29: Estadística de regresión lineal de la Delfinidina-3-glucósido | 70 |
| Tabla N°30: Repetibilidad en Cianidina-3-glucósido..... | 71 |
| Tabla N°31: Evaluación de la repetibilidad en Delfinidina-3-glucósido. | 71 |
| Tabla N°32: Repetibilidad en Cianidina-3-glucósido..... | 72 |
| Tabla N°33: Repetibilidad en Delfinidina-3-glucósido. | 72 |
| Tabla N°34: Exactitud en <i>Tropaeolum tuberosum</i> (Mashua). | 73 |
| Tabla N°35: Evaluación de la exactitud en <i>Zea mays L.</i> (Maíz morado)..... | 73 |
| Tabla N°36: Evaluación de la exactitud en <i>Vaccinium corymbosum L.</i> (Arándano). | 74 |
| Tabla N°37 Concentraciones de antocianinas tanto del HPLC como de la extracción | 75 |
| Tabla N°38: Límites de detección y cuantificación | 76 |



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Determinación del problema

En los últimos años la exposición a diferentes agentes oxidantes como sustancias químicas presentes en los alimentos, la radiación ultravioleta, la contaminación ambiental, etc., nos lleva a darle importancia al rol que cumple la alimentación en la calidad de vida de las personas, es por ello la necesidad de consumir antioxidantes de origen natural ya que estos poseen la capacidad de capturar radicales libres y previenen la oxidación celular.

Existe una escasa investigación de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

1.2 Enunciado del problema

Encontrar fuentes naturales con alto contenido de antioxidantes y la importancia del consumo de estos para usarlos como agentes de prevención de ciertas enfermedades y mejorar la salud y la calidad de vida.

1.3 Descripción del problema

Tropaeolum tuberosum (Mashua) es un tubérculo que presenta un alto rendimiento productivo y rusticidad, que hacen de este un producto agrícola ideal para su siembra en zonas altoandinas donde muchas veces el agricultor no tiene acceso a la tecnificación. Entre sus variedades; algunas presentan tonalidades oscuras que sugieren la presencia de antocianinas, que son conocidos agentes antioxidantes.

Actualmente se da mucha importancia al consumo de antioxidantes provenientes de productos naturales, que se usan como agentes para la prevención de ciertas enfermedades y mejorar la calidad de vida.

Por lo tanto, es necesario estudiar diversas fuentes de antocianinas; que tengan alto rendimiento, facilidad en el proceso de extracción, facilidad de transporte y almacenamiento y que sean de masiva producción; generando rentabilidad al productor, ya que productos como la mashua contienen antocianinas que no solamente son importantes para el consumo, sino para uso industrial.

1.4 Justificación

- Se ha demostrado que los antioxidantes sintéticos no son inocuos para la salud.
- El mercado actual se orienta al consumo de productos orgánicos o derivados de estos.
- La escasa investigación que existe en tubérculos andinos como *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Comparar la capacidad antioxidante y contenido de antocianinas en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del pH, temperatura y tiempo de fermentación en el contenido de antocianinas totales de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).
- Evaluar y comparar la capacidad antioxidante en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) por el método del DPPH.
- Identificar y cuantificar las antocianinas en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) por el método del HPLC.
- Comparar la relación entre contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano)

3. MARCO TEÓRICO

3.1 *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

3.1.1 Descripción

Tropaeolum tuberosum (Mashua) es un tubérculo que se cultiva en los Andes centrales del Perú, Bolivia, Ecuador, Venezuela, Colombia y el norte de Argentina. Se encuentra distribuido entre los 2800 y 4200 msnm³ y recientemente se está cultivando experimentalmente en Nueva Zelanda y el noroeste del pacífico para evaluar su potencial de cultivo en todo el mundo⁴.

Es una planta anual, herbácea, de partes glabras, con un crecimiento inicial erecto que luego se torna semiprostrado y ocasionalmente trepador⁵. Su altura es de 20 a 80 cm, con tallos cilíndricos de 3 a 4 mm de espesor. El follaje tiene un color que varía de amarillo verdoso a verde oscuro; las hojas están alternadas y varían en su forma considerablemente teniendo de 3 a 5 lóbulos, miden de 4 a 6 cm de longitud por 5 a 7 cm de ancho como se muestra en la Figura N°1. La flor es zigomorfa formado por 5 sépalos unidos en la base con una corola de 5 pétalos y de 5 a 8 estambres, la floración varía de 9 a 48 días. El fruto es un esquizocarpo, que cae individualmente en la madurez y forma una semilla botánica abundante; el ciclo de cultivo de la mashua varía entre 6 a 9 meses dependiendo de la variedad^{6,7}.



Figura N°1: *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

Fuente: Registro de investigación

Tubérculo

Los tubérculos de la mashua son cónicos, cónico alargados y alargados. El color es variado, existen al menos 9 colores: blanco amarillento, amarillo pálido, amarillo, amarillo naranja, naranja, rojo grisáceo, rojo grisáceo oscuro, púrpura grisáceo y negro⁸, como se muestra en la Figura N°2. Posee “ojos” yemas hendidas, largas de 2.5 cm que le dan la apariencia de surcos casi circulares por lo que adquiere un perfil ondulado. El tamaño varía de 5 a 15 cm de largo y de 3 a 6 cm de ancho⁷.

Al corte transversal el tubérculo presenta la epidermis, con células de paredes externas gruesas que le dan un aspecto lustroso, su parénquima es rico en almidón con una endodermis bien desarrollada⁷.



Figura N°2: Colores y formas de la *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

Fuente: Registro de investigación

3.1.2 Taxonomía

La Tabla N°1 muestra la clasificación de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) según el National Center for Biotechnology Information (NCBI).

El centro internacional de la papa (CIP) conserva 113 accesiones de mashua, que fueron colectadas en diferentes comunidades de Perú, Bolivia y Argentina¹⁵.

En campañas consecutivas desde el 2008 hasta el 2013 se obtuvieron 107 accesiones de mashua todas colectadas en Perú, donde se pueden distinguir 91 agrupamientos morfológicos (morfotipos). 77 de los 91 morfotipos están representados por una sola accesión, mientras que los 14 morfotipos restantes están representados únicamente por 2

o 3 accesiones, todas las accesiones del banco de germoplasma del CIP son únicas, lo que sugiere una alta diversidad en el cultivo¹⁵.

Tabla N°1: Clasificación taxonómica de la *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) National Center for Biotechnology Information (NCBI)

| Clasificación | Descripción |
|---------------|----------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Tracheobionta |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Rosidae |
| Orden | Geraniales |
| Familia | Tropaeolaceae |
| Género | Tropaeolum L |
| Especie | Tropaeolum tuberosum |

Fuente: National Center for Biotechnology Information (NCBI)

3.1.3 Valor Nutricional

En la Tabla N°2 se presenta el valor nutricional de la *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)⁹.

Tabla N°2: Composición de la *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua)⁹

| Componente | En 100g de Mashua | Componente | En 100 g de Mashua |
|---------------------|-------------------|-----------------|---------------------------|
| Agua | 79.2- 93.8 g | Tiamina | 0.1 mg |
| Calorías | 52 kcal | Riboflavina | 0.12 mg |
| Proteína | 1.5 g | Niacina | 0.67 mg |
| Grasas | 0.7 g | Ácido Ascórbico | 0.1 mg |
| Carbohidratos | 11 g | Lisina | 35 - 69 mg/g de Proteína |
| Fibra | 1.0 g | Treonina | 22 - 46 mg/g de Proteína |
| Minerales (cenizas) | 0.8 g | Valina | 25 – 88 mg/g de Proteína |
| Calcio | 12 mg | Isoleucina | 25 - 44 mg/g de Proteína |
| Potasio | 1.5 mg | Leucina | 35 - 56 mg/g de Proteína |
| Hierro | 1.0 mg | Tirosina | 13 - 62 mg/g de Proteína |
| Fósforo | 0.7 mg | Triptófano | 5 – 12 mg/g de Proteína |
| Vit A | 10 µg | Cisteina | 1.4 - 29 mg/g de Proteína |

La mashua contiene una elevada cantidad de aminoácidos entre ellos la lisina, que es un aminoácido muy limitante en muchos cereales y leguminosas¹⁰.

El contenido de carbohidratos es aproximadamente 6 veces mayor al contenido de proteínas, además posee altos niveles de calcio, fosforo y hierro¹¹.

3.1.4 Origen

Poco se sabe sobre los orígenes de la mashua, se cree que los tubérculos andinos como la *oxalis tuberosa* (Oca) y el *ullucus tuberosum* (Olluco) ya eran consumidos desde hace más de 7500 años, la primera evidencia arqueológica de la mashua data de 650 – 1350 A. C. en los sedimentos de la cueva de Huachumachay, ubicados en el valle de Jauja ¹².

La mashua recibe diferentes denominaciones de acuerdo al país y al idioma, en quechua: añu, apiñu, apiñamama, cubio, ubios, mashua, mashwa. En aymara: apilla, isaña, isaño, kayacha, miswha⁹.

3.1.5 Usos e Importancia

Como alimento se suele consumir cocido luego de ser expuesto al sol por varios días para que los oxalatos de calcio se conviertan en azúcares, también suele utilizarse como alimento para cerdos de engorde¹³.

En la medicina tradicional se le atribuye propiedades anafrodisiacas, y contra enfermedades del riñón, en hígado, también como depurativo, para detener hemorragias, curar enfermedades venéreas y cicatrizante de heridas^{6,14}. La Mashua negra se utiliza como desinflamante de la próstata.

Muchos de los usos medicinales de la Mashua se dan por la presencia de los isotiocianatos, al ser considerado como un antiafrodisiaco muchos hombres no lo consumen por temor a que cause impotencia, estudios realizados en ratas macho que fueron alimentados con mashua mostraron una disminución del 45% en los niveles de testosterona/dihidrotestosterona¹⁷.

La Mashua también posee propiedades antioxidantes debido al contenido de carotenos y compuestos fenólicos. En un estudio reciente se comparó el potencial antioxidante de ciertos cultivos andinos como papas de color, olluco y oca y se mostró que los tubérculos de Mashua presentaron mayor capacidad antioxidante; más aún los tubérculos de mashua de color púrpura presentaron una capacidad antioxidante 8 a 10 veces mayor que los

tubérculos de Mashua de color amarillo, por lo que se sugiere que los compuestos fenólicos están relacionados con la mayor capacidad antioxidante de la Mashua^{1,19,20}.

El área de siembra de la mashua es mucho menor al de otros tubérculos, pero no por eso deja de ser muy importante, pues forma parte de la seguridad alimentaria de muchas familias de los andes, al ser una especie rustica puede crecer bien a bajas temperaturas y suelos pobres, sin el uso de fertilizantes. Debido a su rusticidad, es resistente a nematodos, insectos y varias plagas, como el gorgojo de la *Premnotrypes ssp* en la papa. Por esa razón habitualmente se siembra como cerco perimétrico para la protección de otros cultivos^{9,15}.

No existen datos estadísticos sobre la producción de mashua, pero se estima que el Perú tiene mayor superficie de producción, superando las 7000 Ha, Bolivia 100 ha y apenas 50 Ha en Ecuador, en Bolivia el rendimiento en campos de agricultores oscila entre 30-60Tn/Ha, lo que demuestra su alto potencial productivo e importancia^{9,16}, y siendo Perú y Bolivia los mayores productores de mashua.

3.2 *Zea mays* L. (Maíz morado)

3.2.1 Descripción

El *Zea mays* L. (Maíz variedad morado), es una planta oriunda de América que constituyó uno de los principales alimentos de las numerosas tribus indígenas en la época precolombina y se le atribuyen diversas propiedades medicinales²¹.

El Maíz morado es una de las muchas variedades de la especie de *Zea mays*, es una monocotiledónea anual de 60-80 cm de altura como se muestra en la Figura N°3, sus raíces son fasciculadas cuya misión es aportar un perfecto anclaje a la planta, está compuesto por tres tipos de raíces: raíces primarias emitidos por la semilla formando parte de las raíces seminales; raíces principales que se forman a partir de la corona y las raíces aéreas o adventicias que nacen en el último lugar de los nudos de la base de tallo^{22,23}. Su tallo es simple, robusto y sin ramificaciones, con entrenudos muy cortos y nudos que se originan de las raíces aéreas y el grosor del tallo disminuye de abajo hacia arriba con una inflorescencia masculina que corona la planta^{22,23}. Tiene hojas largas, de gran tamaño, lanceoladas, alternas; se encuentran abrazadas al tallo y por el haz presenta vellosidades con extremos afilados y cortantes²⁴. Las flores son una inflorescencia monoica con inflorescencia masculina y femenina separada dentro de la misma planta; la inflorescencia masculina presenta una panícula de coloración amarilla que posee una cantidad muy elevada de polen, de 20 a 25 millones de granos, en cambio, la

inflorescencia femenina marca un menor contenido de granos de polen entre 800 y 1000 granos²². El fruto es una cariósipide, tiene una sola semilla que está pegada al pericarpio, es muy rica en almidón, en el caso del maíz morado es amiláceo, por lo que también es muy blando²².



Figura N°3: *Zea mays* L. (Maíz morado)

Fuente: Portal sierra exportadora

3.2.2 Taxonomía

La Tabla N°3 describe la ubicación taxonómica del *Zea mays* L. (Maíz morado) reportado por Takhtajan²².

Tabla N°3: Clasificación taxonómica del *Zea mays* L. (Maíz morado)²²

| Clasificación | Descripción |
|---------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Liliopsida |
| Subclase | Lilidae |
| Orden | Poales |
| Familia | Poaceae |
| Subfamilia | Panicoideae |
| Tribu | Andropogoneae |
| Genero | <i>Zea</i> |
| Especie | <i>Zea</i> maíz L |

En el banco de germoplasma del programa cooperativo de investigación de maíz (PCIM) existen 55 grupos raciales, dentro de ellos se tiene 5 razas primitivas que se caracterizan

por ser precoces y de tipo reventón , donde tenemos: en sierra (confite puntiagudo, confite morocho, confite puneño y kcully); en selva (enano); además, se tiene 20 razas derivadas de las primitivas que se caracterizan por ser de precocidad media y generalmente amilácea, donde tenemos: en costa (mochero, alazán, pagaladroga, rabo de zorro, morocho, chaparriño); en sierra (paro, huayleño, chullpi, ancashino, huancavelicano, shajatu, piscorunto, Cuzco cristalino amarillo, Cuzco blanco, granada, uchuquilla) en selva (piricinco, sabanero); 10 razas de segunda derivación que se caracterizan por presentar mayor grado de especialización, mayor rendimiento, mayor desarrollo vegetativo y son generalmente amiláceos, donde tenemos en costa (chancayano, huachano); en sierra (perla, cuzco gigante, san jerónimo huancavelicano, arequipeño); en selva (chimlos, marañón); 6 razas introducidas, en costa (Arizona, colorado, pardo); en selva (chuncho, alemán, cuban yellow); 12 razas incipientes que se caracterizan por ser especializadas y restringidas a algunos valles, donde tenemos: en costa (coruca, jora, tumbesino, chancayano amarillo, morochillo); en sierra (morocho cajabambino, amarillo huancabamba, allajara, huarmaca, morado canteño, huanuqueño, blanco ayabaca) y dos razas no definidas, en sierra (sarco) en selva (perlilla)²⁵.

Las variedades de Maíz morado provienen de una raza ancestral denominada Kculli, que está dentro de las 5 razas ancestrales y aun se cultiva en el Perú²⁵.

Las variedades tradicionales más conocidas de maíz morado son:

Arequipeño: De granos morados dispuestos en hileras regulares en la mazorca, el color de la tusa es menos intenso que en otras variedades, la forma de la mazorca es similar a la variedad Cuzco, pero más pequeña; es más precoz que otras variedades²⁷.

Cuzco morado: Es de granos grandes, dispuestos en mazorcas de 8 hileras muy bien definidas, tardía, la variedad está relacionada a la raza Cuzco gigante; el cultivo se da en zonas de altitud intermedia en los departamentos de Cuzco y Apurímac²⁷.

Morado Canteño: Sus características son muy similares a la raza Cusco Morado, es más precoz, derivada de la raza Cuzco; se cultiva especialmente en las partes altas del valle de Chillón departamento de Lima hasta los 2500 msnm²⁷.

Negro de Junín: Es de granos negros, grandes, dispuestos irregularmente en una mazorca corta y redondeada, precoz, es similar en su forma a la raza San Jerónimo Huancavelicano²⁷.

Morado de Caraz: Es más chico que las variedades de origen cuzqueño, de precocidad intermedia, puede adaptarse a la costa, muestra mayor rendimiento y presenta la coronta más pigmentada; es una variedad derivada de las razas Ancashino y Alazán, se cultiva en la localidad de Caraz Callejon de Huaylas.

Huancavelicano: Se encuentra en alturas mayores que otras variedades, en la sierra centro y sur hasta Arequipa²⁷.

Existen variedades mejoradas del maíz morado como:

PMV-581: Variedad mejorada por la Universidad Nacional Agraria la Molina, es la única en producción, fue obtenida a través de la variedad morado de Caraz, adaptada a la costa y sierra baja, con resistencia a roya y cercospora; de periodo vegetativo intermedio²⁵. También tenemos la PMV-582: Variedad mejorada por la Universidad Nacional Agraria la Molina²⁵, INIA -601 (INIA Negro Cajamarca): Variedad mejorada por el INIA Cajabamba. INIA-615 Negro Canaán: variedad mejorada por el INIA²⁸.

3.2.3 Valor nutricional

En la Tabla N°4 se muestra el valor nutricional del *Zea mays L.* (Maíz morado), donde destaca el contenido de carbohidratos y fibra en el grano, la coronta destaca en fibra y carbohidratos²⁹.

Tabla N°4: Composición del *Zea mays L.* (Maíz morado)²⁹

| Componente | En 100 g de grano de maíz | En 100 g de la coronta |
|-----------------|---------------------------|------------------------|
| Humedad | 11.40 % | 11.20 % |
| Calorías | 496.40 Kcal | 694.73 Kcal |
| Proteína | 6.70 % | 3.74 % |
| Cenizas totales | 1.70 % | 3.29 % |
| Carbohidratos | 76.90 % | 57.44 % |
| Fibra | 1.80 % | 24.01 % |
| Grasa | 1.50 % | 0.32 % |

3.2.4 Origen

Mesoamérica (regiones montañosas de México y Guatemala) es el centro primario de origen del maíz, y el segundo centro de diversificación está ubicado en los Andes centrales³⁰.

Debido a diversos hallazgos, en cerámicos, lítica, así como el estudio de sedimentos y depósitos de restos vegetales en contextos arqueológicos, se cree que el maíz fue domesticado hace aproximadamente 8000 años en Mesoamerica (México y Guatemala). Su evolución es producto de la interacción de los procesos biológicos y ecológicos con los intereses del hombre y su dinámica cultural³¹.

Excavaciones hechas en Perú entre los años 2007 y 2011 en sitios arqueológicos de paredones y Huaca prieta en la Libertad, se encontraron 293 muestras de microfósiles (entre mazorcas, tusas, granos, hojas, tallos) con una antigüedad que va entre 6500 y 6570 años y que a diferencia del único tipo de maíz silvestre descubierto en México (teosintle) en el Perú se hallaron tres tipos de razas conocidas (confite morocho, confite chavinense y Kculli) precursoras de más de 50 tipos existentes en el Perú³².

Las variedades de maíz morado provienen de la raza Kculli, esta se cruzó con otras razas, transfiriendo sus colores característicos a las razas derivadas como el Huayleño, Cuzco, San Jerónimo, Huancavelicano, Arequipeño²⁶.

3.2.5 Usos e importancia.

La mazorca del Maíz morado (tusa y grano) está constituida por 85 % de grano y 15% de coronta (tusa). Contiene antocianinas que se encuentra en mayor cantidad en la coronta y en menor proporción en el pericarpio del grano, utilizado frecuentemente en la preparación de la chica morada y en postres como la mazamorra morada³³.

El maíz morado es un antioxidante natural que retarda el envejecimiento de las células, principalmente por acción de la cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido³⁴. Se determinó que entre los pigmentos la cianidina-3-glucósido está en mayor porcentaje que el resto de pigmentos, representado por un 44 %^{35,36}.

Las condiciones geográficas y climáticas de las que goza el Perú, hacen propicio el cultivo de maíz morado, y esto nos permite ser ofertantes exclusivos de un producto al que se le atribuyen propiedades benéficas para la salud. Bajo un esquema de manejo adecuado del cultivo, la exportación de Maíz morado y sus derivados presenta un fuerte potencial de crecimiento a mediano plazo que se sustenta en la creciente tendencia mundial a consumir productos distintos a los tradicionales, además de poseer propiedades nutritivas y benéficas para la salud³⁷.

3.3 *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano)

3.3.1 Descripción

El *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) constituye una especie nativa del hemisferio norte, perteneciente a la familia de las ericáceas. El arándano alto se caracteriza por ser una planta leñosa, perenne, que alcanza una altura de 3 a 5 metros en estado adulto, con una vida comercial del orden de los 20 años, encontrándose en algunos huertos variedades con más de 30 años aun en producción^{38,39,40}.

Posee hojas alternas, de margen entero, de unos 5 cm de longitud, caducas, de forma lanceolada y color verde pálido. Su sistema radical es fibroso y superficial, tiene raíces finas y fibrosas que se caracterizan por la ausencia de pelos absorbentes. Las flores son pedunculadas, axilares o terminales, de color blanco, sépalos persistentes, formada por 4-5 pétalos fusionados, 8 a 10 estambres que están insertados en la base de la corola⁴¹.

El Fruto: Es una baya casi esférica, que puede variar en tamaño de 0.7-1.8 cm de diámetro, contiene 5 lóculos que son delineados por una pared de células simples, lo que constituye el endocarpo. Los frutos a medida que maduran, pasan por distintos grados de color hasta llegar al tono azul característico al final de la maduración, como se muestra en la figura N°4; las semillas en su interior pueden variar entre 20 a 100 cuyo número está relacionado con el tamaño del fruto^{38,40}.



Figura N°4: *Vaccinium Corymbosum* L. (Arándano)

Fuente: Registro de investigación

3.3.2 Taxonomía

La Tabla N°5 describe Taxonómicamente el *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) según Cronquist⁴⁴.

Tabla N°5: Clasificación taxonómica del *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano)⁴⁴

| Clasificación | Descripción |
|---------------|--------------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Pterophytas |
| Clase | Dicotiledonea |
| Subclase | Dilleniidae |
| Orden | Ericales |
| Familia | Ericaceae |
| Subfamilia | Vaccinioidea |
| Tribu | Vaccinieae |
| Genero | Vaccinium |
| Especie | <i>Vaccinium corymbosum</i> L. |

Existen 30 especies del género *Vaccinium*, pero solo un pequeño grupo tienen importancia comercial. Existen 3 especies que tienen importancia económica: el *Vaccinium angustifolium* (Arándano bajo) o “lowbush”, el *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano alto) o “highbush” y el *Vaccinium ashei* Reade (Arándano ojo de conejo) o “rabbiteye”⁴¹.

V. angustifolium; *V. myrtilloides* (Lowbush). Se encuentra principalmente en forma silvestre, ha sido un gran aporte en la obtención de clones mejorados de arándano alto, este arándano requiere de mayores horas de frío acumuladas que los otros arándanos^{41,45}.

V. corymbosum (Highbush): Es nativo del noroeste de Norte América, representa el 75% del total de arándano que se cultiva a nivel mundial^{41,45}.

V. ashei (Rabbiteye): Es nativo del sureste de Estados Unidos, este tipo de arándano requiere de polinización cruzada por ser parcialmente auto-estéril, posee mayor cantidad de frutos y estos tienen mayor duración post cosecha^{41,45}.

3.3.3 Valor nutricional

En la Tabla N°6 se presenta el valor nutricional del *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano)^{39,42}. Es bajo en calorías, grasas y sodio, mientras que posee un alto contenido en fibra y es rico en minerales como el potasio magnesio y manganeso.

Tabla N°6: Composición del *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano)^{39,42}

| Componente | En 100 g de Arandano | Componente | En 100 g de Arandano |
|---------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| Agua | 82 – 85 g | Zinc | 0.11 mg |
| Calorías | 55 Kcal | Cobre | 0.06 mg |
| Proteína | 0.7 g | Manganeso | 0.27 mg |
| Grasas | 0.37 g | Ácido Ascórbico | 13 mg |
| Carbohidratos | 14 g | Tiamina | 0.05 mg |
| Fibra | 1.3 g | Rivoflavina | 0.05 mg |
| Sodio | 6 mg | Niacina | 0.35 mg |
| Calcio | 6 mg | Acido pantoténico | 0.09 mg |
| Potasio | 86 mg | Ácido fólico | 6.2 mg |
| Hierro | 0.16 mg | Vitamina B6 | 0.03 mg |
| Fósforo | 10 mg | Vitamina A | 97 IU |
| Magnesio | 4.7 mg | | |

3.3.4 Origen

El arándano es originario de Norteamérica, su uso como alimento se remonta a pueblos primitivos que habitaban el área de dispersión natural de las ericáceas⁴⁵. Los nativos de Norteamérica utilizaban estos frutos silvestres en su dieta, antes de la llegada de los colonizadores al nuevo mundo. Actualmente la cosecha de estos frutos se mantiene como una importante industria en el este de Canadá y en el Noreste de Estados Unidos. Los Arándanos del tipo rabbiteye fueron los primeros en cultivarse a finales del siglo XIX en el sur de los Estados unidos. El arándano del tipo highbush (*V. corymbosum L.*) fue producido en el siglo XX originado con la investigación pionera de F.V. Coville y Elizabeth White a comienzos de 1900⁴⁶.

El arándano alto o highbush se originó de cruzamientos de una serie de especies de *vaccinium*, dando así una planta tetraploide⁴⁷. Una década después de la introducción de

la primera variedad mejorada, había menos de 80 Ha cultivadas de arándano highbush, incrementándose entre 1950 a 1965 alcanzando 8100 Ha en producción⁴⁶.

3.3.5 Usos e importancia

El arándano se utiliza en la elaboración de mermeladas o jaleas, tortas y postres, como ingrediente de bebidas alcohólicas y como colorante. El jugo de arándano se utiliza en salsas para la cocina⁴⁸.

Por su bajo contenido en calorías es importante en la dieta, tiene propiedades antiinflamatorias y ayuda a reducir el azúcar en la sangre. El consumo del fruto del arándano está asociado con un efecto protector cardiovascular, prevención del cáncer y otras enfermedades⁴⁹.

El arándano es rico en polifenoles en particular antocianinas, flavonoles, catequinas y ácidos fenólicos, los cuales son compuestos con muchos efectos positivos para la salud, debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres^{2,50}. También tiene propiedades astringentes, antisépticas, antidiarreicas, hipoglucemiantes, debido a su contenido de antocianinas, se relaciona al arándano con la prevención de enfermedades neurodegenerativas como el alzheimer^{51,52,53}.

Recientemente Perú se ubica entre los más importantes proveedores de arándanos, iniciando con cifras marginales en el 2010 con 6 Tn, incrementándose en el 2013 con exportaciones de 1513 Tn y en el 2015 alcanzando volúmenes de 10210 Tn, en 5 años el Perú se ha constituido como el tercer país exportador en importancia en Sudamérica después de Chile y Argentina. La producción está concentrada en la región La Libertad con aproximadamente un 90% del total producido, le siguen Ancash, Arequipa, Cajamarca, Ica, Lima y Lambayeque con volúmenes poco significativos⁵⁴.

3.4 Fenoles

Son compuestos químicos que se encuentran distribuidos tanto en frutas como vegetales, en su mayoría deriva de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina⁵⁵. Los compuestos fenólicos están relacionados con la calidad sensorial de los alimentos de origen vegetal, actualmente estos compuestos son de gran interés nutricional por su contribución a la mejora de la salud humana⁵⁶.

La mayoría de las frutas y vegetales deben su color a sus correspondientes pigmentos, que son sustancias con función biológica muy importante en el tejido. Hay una gran

cantidad de pigmentos relacionados con las frutas y vegetales, entre ellos las clorofilas, los carotenoides, las antocianinas, los flavonoides, los taninos y otros⁵⁷.

3.4.1 Estructura química de los fenoles

Químicamente los compuestos fenólicos son sustancias que poseen un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo que incluyen sus derivados funcionales, como se muestra en la Figura N°5 (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles va desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello, la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es la forma de glicósidos, siendo solubles en agua y en solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos. Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: D-glucosa, D-galactosa, D-arabinosa, L-ramnosa, D-xilosa y ácidos D-glucorónico y D-galacturónico⁵⁸.



Figura N°5: La molécula del fenol.⁵⁸

3.4.2 Fenoles como antioxidantes

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales, desde un punto de vista nutricional esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer⁵⁹.

El comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos podría estar relacionado con la capacidad que posee de quelar metales, manteniendo o incrementando su capacidad catalítica, o reduciéndolo⁶⁰.

Los fenoles en las plantas desempeñan importantes funciones morfológicas y fisiológicas:

- Juegan un papel muy importante en el crecimiento y reproducción.
- Al acumularse en las capas más superficiales de los vegetales, captan las radiaciones UV.
- Pero su función más característica es establecer relaciones químicas entre la planta y su entorno: son componentes de esencias y pigmentos de las flores y frutos, así como de sabores o texturas desagradables^{61,62}.

3.4.3 Biosíntesis de compuestos fenólicos

Estos compuestos se sintetizan a partir de dos principales rutas metabólicas: la ruta del shikimato la cual origina directamente fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos y la ruta del acetato, la cual produce fenoles simples y quinonas⁶⁰.

El grupo más importante de los compuestos fenólicos son los flavonoides, incluyendo flavonas, isoflavonas y antocianidinas, estas se forman vía condensación del fenilpropano (C6 – C3), con la participación de 3 moléculas de malonil coenzima A, permitiendo la formación de chalconas, estas subsiguientemente se ciclan en condiciones ácidas. Por lo que los flavonoides tienen la estructura básica de los difenilpropanoides (C6 – C3 – C6) los cuales son dos anillos aromáticos unidos a 3 carbonos que van a formar un anillo heterocíclico oxigenado. El estado oxidativo de esta cadena de 3 carbonos, son las que van a determinar las clases de flavonoides. Los flavonoides incluyen antocianinas (glucósidos o acilglucósidos de las antocianidinas), flavanoles (catequinas), flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavonoles y sus derivados.

Los compuestos fenólicos se pueden agrupar en diferentes clases dependiendo de su estructura química básica, se describirá a continuación a aquellos con interés nutricional⁶⁵

3.4.4 Tipos de fenoles

3.4.4.1 Fenoles, ácidos fenólicos y fenil acéticos

Dentro de este grupo tenemos el fenol, cresol, timol y resorcinol que están distribuidos en todo tipo de especies vegetales. Igualmente, los ácidos fenólicos tales como el gálico, vinílico, p-hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina, estos también podemos encontrar en abundancia en plantas superiores y helechos⁶⁶.

3.4.4.2 Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles

Los ácidos cinámicos (caféico, ferúlico, p-cumárico y sináptico) se encuentran presentes mayormente en forma de derivados y muy raramente libres.

Los cromonoles son poco conocidos, y se forman a partir de las antocianidinas ante incrementos del pH del medio.

Las cumarinas e isocumarinas se encuentran generalmente en forma de glicósido⁶⁷.

3.4.4.3 Lignanos y neolignanos

Son metabolitos que presentan bajo peso molecular y se forman por el acoplamiento oxidativo de unidades de p-hidroxifenilpropano, las cuales se unen mediante puentes de hidrógeno.

El término lignano se aplica cuando el compuesto está formado a partir de uniones entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno la molécula resultante se denomina neolignano⁶⁸.

3.4.4.4 Taninos

Son compuestos fenólicos hidrosolubles que presentan un peso molecular que va entre los 500D y 3000D. Estos compuestos presentan un gran número de grupos hidroxilo, entre otros grupos funcionales (1 a 2 por 100D), es por esto que pueden unirse a proteínas y a otras moléculas⁶⁹.

3.4.4.5 Flavonoides

Constituyen el grupo más importante dentro de esta clasificación estas se dividen en varias subclases con más de 5,000 compuestos. Son sustancias polifenólicas de bajo peso molecular que comparten el esqueleto común de difenilpiranos; dos anillos bencenos unidos a través de un anillo pirona heterocíclico. Esta estructura básica permite una multitud de sustituciones y variaciones en el anillo pirona dando lugar a flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonoides, catequinas, chalconas, dihidrochalconas, antocianidinas⁷⁰. En la Figura N°6 se muestra el núcleo principal de la estructura de los principales flavonoides presentes en la naturaleza.

3.4.5 Clasificación de los flavonoides en base a sus variaciones estructurales

Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3.

Flavonas: con H en la posición 3.

Flavonoles: con OH en la posición 3.

Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3.

Flavononas: con H en la posición 3.

Flavonoles: con OH en la posición 3.

Chalconas: con anillo C abierto.

Isoflavonoides: con anillo B en la posición 3 (3-fenil-gamma-croma).

Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

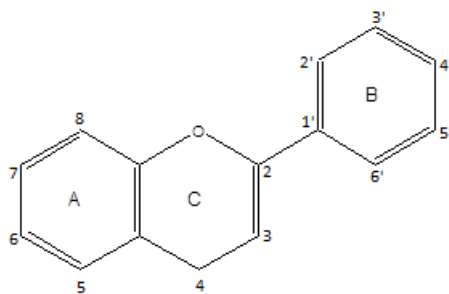


Figura N°6: Núcleo principal de la estructura de los flavonoides.⁷¹

3.5 Antocianinas

3.5.1 Estructura química

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides y su estructura básica es un núcleo de flavón, como se muestra en la Figura N°7, el cual presenta dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos. El nivel de hidroxilación y metilación en el anillo “B” de la molécula nos va a determinar el tipo de antocianidina, que es la aglicona de la antocianina, como se muestra en la Figura N°8 y en la Tabla N°7.

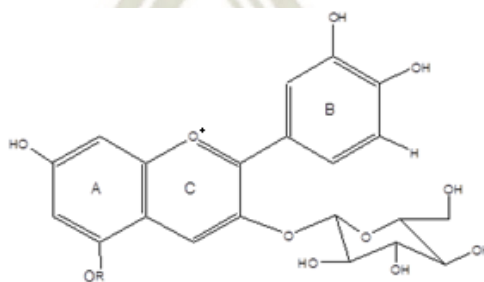


Figura N°7: Cianidina-3-glucósido, R=H o Cianidina-3,5-diglucosido, R=glucosa⁷³

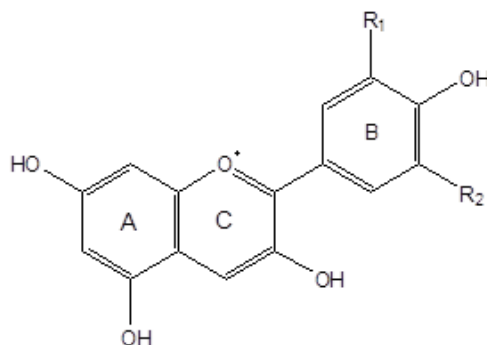


Figura N°8: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas⁷⁴

Se han descrito doce diferentes antocianidinas, de las cuales las más comunes en plantas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, las tres son más frecuentes en frutos. En las plantas las antocianidinas no se acumulan como tal, sino en su forma glucosilada; esto es, unidas a algún azúcar y en cuyo caso se denominan antocianinas siendo una de las más abundantes la cianidina 3-glucósido⁷².

Tabla N°7: Estructura básica y sustituyentes de las antocianinas⁷⁴

| Aglicona | Sustituyente | | λ max (nm) |
|---------------|--------------|------|--------------------|
| | R1 | R2 | Espectro visible |
| pelargonidina | H | H | 494 (naranja) |
| Cianidina | OH | H | 506 (naranja-rojo) |
| Delfinidina | OH | OH | 508 (azul-rojo) |
| Peonidina | OCH3 | H | 506 (naranja-rojo) |
| Petunidina | OCH3 | OH | 508 (azul-rojo) |
| Malvidina | OCH3 | OCH3 | 510 (azul-rojo) |

La incorporación de estas antocianinas mejora la apariencia de los alimentos además de ser muy benéficas para nuestra salud. Muchos estudios nos dan evidencia científica que los extractos ricos en antocianinas pueden mejorar la visión, actuar como antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. También juegan un papel en las propiedades antidiabéticas como; control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores⁷⁵.

El color de estas va a depender del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula. Un aumento en la hidroxilación produce desplazamientos hacia tonalidades azules mientras que un aumento en las metoxilaciones produce coloraciones rojas⁷⁴.

Color y distribución de las principales antocianinas en algunas frutas y vegetales comunes

En la Tabla N°8 se muestra el color y distribución de las principales antocianinas en frutas y vegetales comunes.

Tabla N°8: Color y distribución de las principales antocianinas en algunas frutas y vegetales comunes⁷⁶

| Compuesto | Color | Fruto y vegetal |
|---------------|--------------|---|
| Delfinidina | Rojo azulado | Uva concordia, mirtillo, grosella negra |
| Cianidina | Rojo naranja | Fresa, mora, cereza, col roja, sauco, frambuesa |
| Pelargonidina | Naranja | Fresa, maíz |
| Malvidina | Rojo azulado | Uva, mirtillo |
| Peonidina | rojo | Cereza, arandino |

Contenido de antocianinas totales en frutas y vegetales comunes

En la Tabla N°9 se muestra el contenido de antocianinas en las principales frutas y vegetales.

Tabla N°9: Contenido de antocianinas totales en frutas y vegetales comunes⁷⁷

| Fruto | Contenido de antocianinas totales mg/100g |
|----------------|---|
| Manzana | 83 – 326 |
| Mora | 83 – 326 |
| Grosella negra | 130 – 400 |
| Mirtillo | 25 – 495 |
| Col roja | 25 |
| Cereza | 4 – 450 |
| Saucu | 450 |

3.5.2 Biosíntesis de antocianinas

Los precursores de las antocianinas son bien conocidos. 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. El ácido shikímico da paso a la fenilalanina por acción de una fenilalanina amonía liasa (PAL), y después de una pérdida de Np 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. 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 antocianina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida por una deshidratación como se muestra en la Figura N°9. 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 acilaciones⁷⁸.

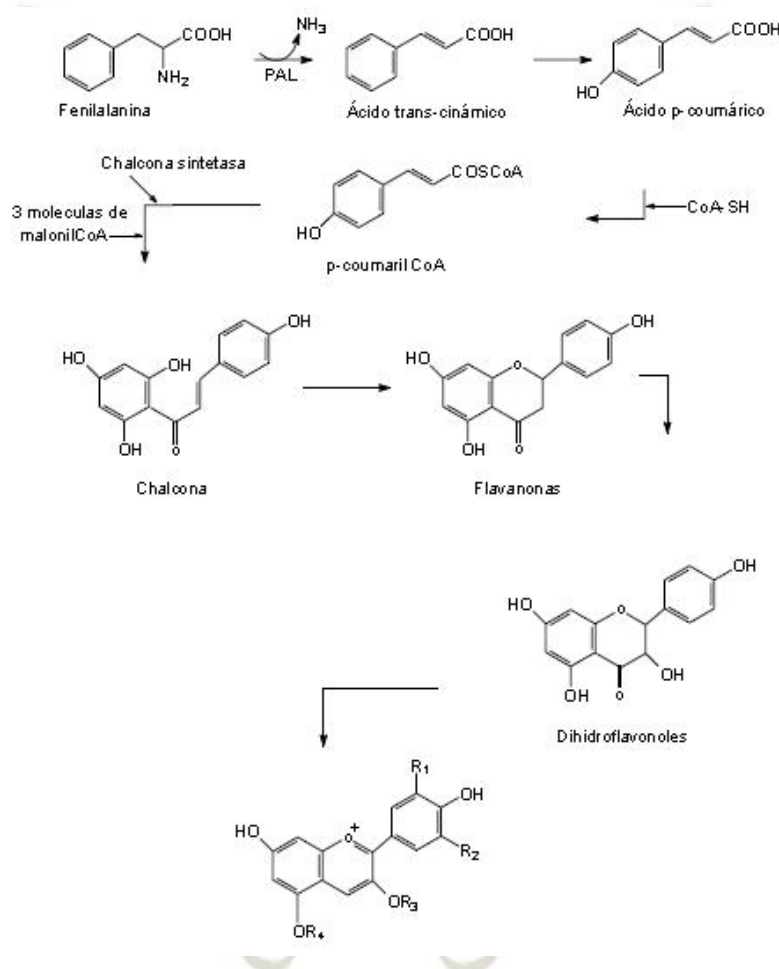


Figura N°9: Biosíntesis de antocianinas⁷⁹

3.5.3 Factores que determinan la estabilidad de las antocianinas

Las antocianinas ofrecen ventajas sobre los colorantes artificiales, sin embargo, su incorporación a alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos es limitada debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento⁸⁰.

Los factores más relevantes que afectan a la estabilidad de las antocianinas son:

3.5.3.1 pH:

Dependiendo del pH las antocianinas pueden encontrarse en distintas formas químicas, es decir que este factor influye en su estructura y por lo tanto en su estabilidad como se muestra en la Figura N°10. A pH 1 predomina el catión flavilio que es de color rojo y es la forma más estable de las antocianinas, a pH entre 2 y 4 ocurre la pérdida de un protón y adición de agua, encontrándose las antocianinas bajo las formas quinodales de color azul. A pH 5 y 6 se observan pseudobase carbinol, que no presenta coloración y chalcona de color amarillo ambas bastante inestables. A pH 7 o más se produce la degradación rápida de las antocianinas por oxidación con el aire. Además esta reacción se ve afectada por la presencia de sustituyentes presentes en el anillo B⁸¹.

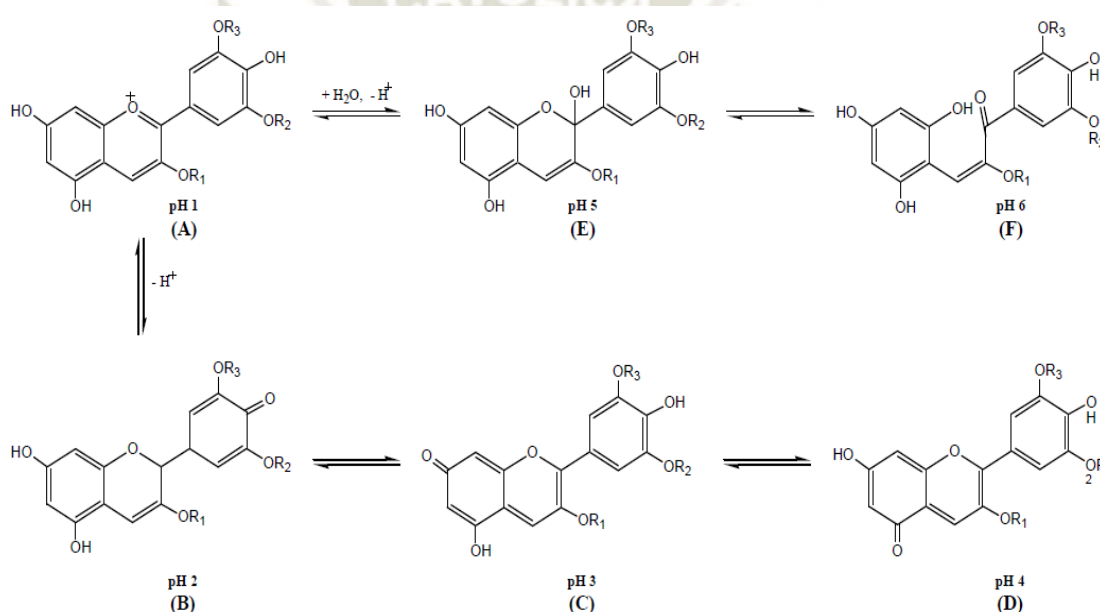


Figura N°10: Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH. Dónde

R1= H o glúcido, R2 y R3= H o metilo⁸³

3.5.3.2 Temperatura

También podemos señalar a la temperatura como otro de los factores críticos que influyen en la degradación de antocianinas⁸⁶. Son resistentes a procesos térmicos de altas temperaturas pero que tengan 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 térmica⁸⁷. Incrementos de temperatura provocan pérdidas del azúcar glicosilante, con la consecuente producción de chalconas incoloras⁷⁴.

3.5.3.3 Luz

La luz es un factor que acelera la degradación de las antocianinas. En estudios se ha demostrado 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 polihidroxiladas, isoflavonas y auronas sulfonadas⁷⁹.

3.5.4 Antocianina como colorante y antioxidante

El consumidor actual además de preferir un producto sano elige un producto con un valor estético, es por eso que el color es una característica que el consumidor percibe primero y que tiene una gran influencia en la elección de un producto.

Existen 2 tipos de colorantes: naturales y sintéticos. Los colorantes sintéticos presentan algunas ventajas sobre los colorantes naturales, estos proporcionan una mayor intensidad de coloración haciendo así que se necesite una menor cantidad de colorante, además de ser más estables tanto a luz como al pH y la temperatura⁹⁶. Pero también presentan importantes desventajas que están relacionadas íntimamente con gastroenteritis e hiperactividad en niños señalando que estas sólo se dan en algunas personas⁹⁷. Es necesario decir que los colorantes sintéticos presentan problemas de toxicidad a altas dosis por lo que su empleo es restringido y muy observado por organismos reguladores⁹⁶. Actualmente, existe preocupación de las personas en la ingesta de colorantes sintéticos y es por eso que el interés de los colorantes naturales ha tomado un mayor empuje. Si bien los colorantes sintéticos poseen mejores características funcionales, existe una marcada tendencia al consumo de productos naturales libres de compuestos químicos y aun mejor con potenciales efectos beneficiosos⁹⁸. Es por este aumento de mercado que se está buscando desarrollar investigaciones dirigidas a la producción de pigmentos que sean obtenidos de materias primas de origen animal, mineral y en especial de origen vegetal; ya que este tipo de colorantes presentan una menor toxicidad y producen un menor impacto sobre el medio ambiente⁹⁹. Sin embargo, son más caros, menos potentes y menos estables¹⁰⁰.

Los colorantes en la naturaleza están formados por dos grupos químicos: cromóforo y auxocromo. El cromóforo, usualmente es un anillo aromático y está asociado a la propiedad colorante. Tiene enlaces insaturados como $-C=C$, $=C=O$, $-C-S$, $=C-NH$, $-CH=N$, $-N=N-$ y $-N=O$, cuyo número define la intensidad del color. Los grupos auxocromos son sustituyentes del cromóforo que intensifican la intensidad del color¹⁰¹.

Una de las propiedades de las antocianinas es la de conferir los colores rojo, azul y violeta en vegetales, granos de cereales, flores y frutos¹⁰². De hecho, el empleo de antocianinas como colorantes se encuentra contemplado en la lista de colorantes alimentarios autorizados en la Unión Europea⁹⁶.

Podemos enumerar diferentes fuentes de antocianinas como las uvas, arándanos, etc. Que podrían ser utilizadas como colorantes alimenticios¹⁰³. Dichos recursos naturales que pueden ser usados como pigmentos representan una fuente industrial importante ya que estos podrían ser usados como aditivos tanto en alimentos como en productos farmacéuticos y cosméticos dándole competencia a los colorantes sintéticos. Sin embargo, queda mucho por investigar, por ejemplo, es necesario profundizar sobre su estabilidad en matrices específicas, la relación entre su estructura y la actividad biológica de metabolitos bioactivos, los efectos sinérgicos y las dosis efectivas⁷⁴.

Cabe resaltar que este tipo de pigmentos antocianinicos presentan propiedades farmacológicas y esto ha aumentado el interés en ellos. 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. Evidenciando así los efectos terapéuticos de las antocianinas que están relacionados con su actividad antioxidante¹⁰⁴. En conclusión, las antocianinas y sus propiedades bioactivas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano⁷⁴.

Las Antocianinas presentan actividad antioxidante que les permite reaccionar con radicales libres. Estos últimos, entre los que se encuentran los radicales $\text{OH}\cdot$ (hidroxilo) y $\text{O}_2\cdot$ (superóxido), son capaces de atacar a proteínas, carbohidratos, grasas y ADN del cuerpo, ejerciendo un efecto oxidativo que daña las células¹⁰⁵. 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 vida¹⁰⁵. Este tipo de actividad oxidante de los radicales libres puede ser controlada, o incluso prevenida, por una serie de sustancias denominadas antioxidantes.

Por lo tanto, la obtención de un producto rico en antocianinas podría tener un impacto positivo, dado que:

- Se obtendría un colorante natural, el cual podría suplir a los colorantes sintéticos.
- Se dispondría de una fuente de antioxidantes de origen natural.
- Se ofrecería una alternativa de industrialización de diferentes productos que no puedan introducirse, por distintos motivos, en el mercado de consumo en fresco, contribuyendo a una mejor rentabilidad al productor.

3.6 Estrés oxidativo

En bioquímica se considera oxidación a todo proceso en el que ocurre pérdida de electrones, captación de oxígeno o una cesión de hidrógeno (deshidrogenación) y reducción a aquel otro en el cual se captan electrones o se pierden oxígenos. Todo proceso de oxidación va siempre acompañado de otro de reducción. Son reacciones de óxido-reducción o reacciones redox entre pares conjugados¹³⁰.

El oxígeno que es imprescindible para la vida, puede ser también fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que dañan las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) y alteran los procesos celulares (funcionalidad de las membranas, producción de enzimas, respiración celular, inducción génica, etc.).¹³¹

Un exceso de RL (moléculas o porciones de ellas, que presentan al menos un electrón desapareado en su orbital más externo y son extraordinariamente reactivos) rompe el equilibrio produciendo el llamado estrés oxidativo. Se producen durante las reacciones metabólicas, mientras las células del organismo transforman los alimentos en energía especialmente en situaciones de hiperoxia, ejercicio intenso e isquemia y también por exposición a determinados agentes externos como las radiaciones ionizantes o luz ultravioleta, polución ambiental, humo del tabaco, etc.¹³²

De los RLO inorgánicos los más importantes son el oxígeno molecular O_2 , el radical-anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($HO\cdot$) y su precursor inmediato el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De los secundarios u orgánicos, el radical peroxilo ($ROO\cdot$), el hidroperóxido orgánico ($ROOH$) y los lípidos peroxidados.¹³³

3.7 Radicales libres

Un radical libre es una molécula o fragmento molecular que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital externo. También pueden ser radicales libres los iones metálicos y el átomo de hidrogeno como se muestra en la Figura N° 11.

Su vida es muy breve (del orden del milisegundo o menos), aunque los núcleos asimétricos contribuyen a la formación de radicales de larga vida¹⁰⁶.

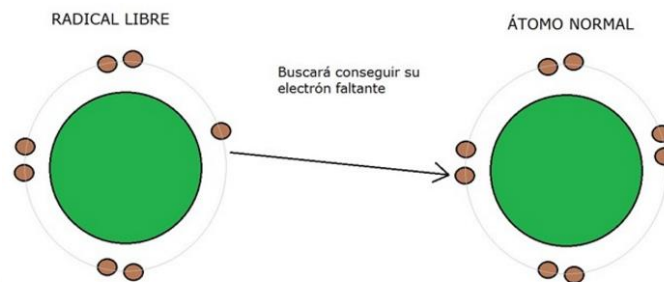


Figura N°11: Diferencia de un radical libre y un átomo normal.¹⁰⁶

3.7.1 Producción de radicales libres de oxígeno

Estas se forman de manera ilimitada durante el metabolismo celular normal, por lo que entre las fuentes endógenas de radicales libres del oxígeno se pueden mencionar las cadenas de transporte de electrones mitocondrial y microsomal, reacciones catalizadas por oxidasas y oxigenasas, reacciones de auto oxidación de metales, actividad de células fagocíticas (granulocitos, macrófagos, células endoteliales) y transporte de oxígeno por la hemoglobina¹⁰⁷.

3.7.2 Reactividad de los radicales libres

Los radicales libres presentan reactividades diferentes, algunos presentan estabilidad, pero la mayoría de estos son muy reactivos o inestables, es por este hecho que normalmente presentan una vida corta. Por ejemplo, el radical hidroxilo siendo el más reactivo de los radicales oxigenados su radio de acción es de masomenos 30 Å°.

Estos radicales libres pueden tener una actividad de tanto oxidantes como reductores por ejemplo la peroxidación lipídica que es una reacción en cadena. Aunque el primer radical libre presenta efectos locales este va a producir radicales secundarios derivados de él que van a producir efectos distantes, y es posible que cuando dos de estos radicales actúen entre si se forme una molécula estable dando por terminado esta reacción en cadena¹⁰⁸.

3.7.3 Daño molecular inducido por radicales libres

Estos radicales libres pueden ejercer efectos útiles o nocivos: dentro de los nocivos podemos señalar numerosos efectos por causar daño lipídico, proteico, en carbohidratos y otros.

Dentro de sus efectos útiles podemos mencionar los producidos por los fagocitos que ayudan en la destrucción de organismos invasores¹⁰⁹.

3.8 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”¹¹⁰.

Se han clasificado en dos principales sistemas, el sistema enzimático y no enzimático. Cuando estos sistemas antioxidantes fracasan se produce un exceso de radicales libres.¹³⁴

El sistema de antioxidantes no enzimático o exógeno está determinado por una serie de compuestos llamados depuradores de radicales libres, los cuales intervienen logrando retrasar la producción y acción de los radicales libres. Algunos antioxidantes no enzimáticos de las células son el glutatión, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, los bioflavonoides, la vitamina E (alfa tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), la vitamina A, los carotenoides, acetil-L- carnitina, coenzima Q10, curcumina, Nacetil-cisteína (NAC), resveratrol, selenio, vitamina B; mientras que los minerales selenio, cobre, zinc y magnesio forman parte de la estructura molecular de algunas de las enzimas antioxidantes. Las vitaminas C y E, los carotenoides, el selenio y flavonoides son las moléculas químicas antioxidantes más conocidas.¹³⁵

El sistema de defensa correspondiente a las enzimas antioxidantes o endógenas incluye a enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GSH-PX), tioredoxina reductasa y glutatión reductasa. La superóxido dismutasa es una metaloenzima ampliamente encontrada en células procariontes y eucariontes, que permite la dismutación del ión superóxido en peróxido de hidrógeno y cuya acumulación se evita por el sistema de catalasa/glutatión peroxidasa, transformándolo en oxígeno no molecular, agua y glutatión oxidado.¹³⁶ En las Tablas N°10 y 11 se muestran algunos antioxidantes enzimáticos y las funciones fisiológicas de algunos antioxidantes.

Tabla N°10: Antioxidantes enzimáticos.¹³⁶

| Antioxidantes Enzimáticos | | |
|----------------------------------|---|--|
| Antioxidante | Ubicación celular | Función fisiológica |
| Superóxido dismutasa | Citoplasma (SOD-1) Mitocondria (SOD-2) Extracelular (SOD-3) | Dismutación de radicales superóxido |
| Glutatión peroxidasa | Citoplasma y mitocondria | Elimina peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos |
| Catalasa | Citoplasma y mitocondria | Elimina peróxido de hidrogeno |

Tabla N°11: Funciones fisiológicas de algunos antioxidantes.¹³⁴

| Antioxidante | Función fisiológica |
|---------------------|---|
| Vitamina E | Capta los radicales libres en membrana evitando la lipoperoxidación |
| Vitamina C | Efecto eliminador de radicales y recicla la vitamina E. Ambas vitaminas C y E trabajan como antioxidantes |
| Glutación | Tiene varios efectos en la defensa antioxidante celular |
| Ácido lipoico | Antioxidante eficaz y sustituto eficaz del glutación |
| Carotenoides | Antioxidante de lípidos |
| Ubiquinonas CoQ10 | Efectos de gran utilidad como antioxidantes |

3.8.1 Niveles de la acción antioxidante

Los antioxidantes capaces de neutralizar a los radicales libres o sus acciones, actúan a diferentes fases. Actúan a niveles de prevención, interceptación y reparación.

- **La acción preventiva** evita la formación de los radicales libres de oxígeno (ROS). Estos incluyen a la SOD, que cataliza la dismutación O_2^* a H_2O_2 y la catalasa que lo transforma en agua¹¹².
- La acción de interceptación de los radicales libres es principalmente por secuestro del radical, los radicales peroxilo son los principales afectados en esta etapa. Los efectores incluyen a varios antioxidantes como las vitaminas A y E, glutación, otros compuestos con grupo tiol, carotenoides, flavonoides, entre otros¹¹².
- La acción de reparación y reconstitución están comprometidos sistemas enzimáticos principalmente¹¹².

La deficiencia de electrones de las antocianinas las hace muy reactivas frente a los radicales libres presentes en el cuerpo es por esta configuración que pueden ser potentes antioxidantes naturales¹⁰². Una de las propiedades principales de las antocianinas para mejorar la salud está asociada íntimamente a la actividad antioxidante o secuestrar radicales libres en sistemas biológicos¹¹³. Pueden donar hidrógenos o electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática¹¹⁴.

En este momento hay un gran interés en aumentar los antioxidantes naturales en el consumo humano, para lograr esto, una buena idea es enriquecer los alimentos con antioxidantes¹¹⁵.

Por las características que presentan las antocianinas como el hecho de ser hidrosolubles, estas podrían incorporarse en alimentos acuosos¹⁰³. Pero también hay que tener en cuenta,

que hay factores que afectan la actividad antioxidante de los productos, por ejemplo: el grado de madurez de la cosecha, condiciones de almacenamiento, condiciones de transporte, tipos de procesamiento, etc¹¹⁶.

3.8.2 Propiedades funcionales

Una de las características de las antocianinas que favorecen a su interés es que, durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo de los mamíferos, estas permanecen intactas, además de presentar propiedades farmacológicas y terapéuticas¹¹⁷. Estas son muy consideradas en la reducción de enfermedades cardíacas, efectos anticancerígenos y antitumorales, también en la mejora de la agudeza visual las cuales están relacionadas con la capacidad antioxidante como las provenientes de las antocianinas del vino¹¹⁸. Gracias a esto podemos decir que la paradoja francesa tiene base en las antocianinas presentes en el vino el cual está asociada al alto consumo de vino en Francia y al bajo riesgo de enfermedades coronarias¹¹⁹. Estudios demostraron que hubo una supresión de tumores en ratas de laboratorio al suministrarle papas purpuras dulces y repollo morado¹²⁰. Se reportó que hubo efectos antitumorales con el uso de extractos de frijoles rojos de soya que contenían cianidina conjugada con glucosa y ramnosa¹²¹. Para el estudio de la actividad anticancerígena se suministraron fracciones de antocianina de vino tinto las cuales produjeron supresión de células cancerígenas de colon humano¹²². En cuanto a la actividad antiinflamatoria se encontraron en extractos concentrados de antocianinas efecto inhibitorio de la producción de óxido nítrico en macrófagos activados¹²³. En cuanto a la actividad antidiabética de las antocianinas. Se realizaron estudios que revelaron que 79% de los pacientes diabéticos consumidores de extracto de bayas rojas mostraron alivio en los síntomas de retinopatía diabética¹²⁴. También, se reportó mejoramiento de la agudeza visual como resultado del consumo extractos de frutas ricas en antocianinas por parte de ratas con deficiencia ocular, y también se reportó un efecto antiinflamatorio y de aumento de la agudeza visual¹²⁵.

3.8.3 Actividad antioxidante por DPPH

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, una de ellas es la técnica que utiliza el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH.¹³⁷

Este radical libre es susceptible a reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.

Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de la absorbancia en función del tiempo.¹³⁸

Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida ulteriormente por una reacción lenta, lo que podría ocurrir debido a un proceso de dimerización de los productos de la reacción o a reacciones de los productos de ésta.¹³⁹

Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta cambia al color amarillo o transparente, como se muestra en la Figura N° 12. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para cuantificar la actividad antioxidante que poseen distintas sustancias.¹⁴⁰

Los resultados se pueden expresar como porcentaje de captación y mg /Equivalentes de Trolox (cuando es comparado con estándares Figura N° 13).

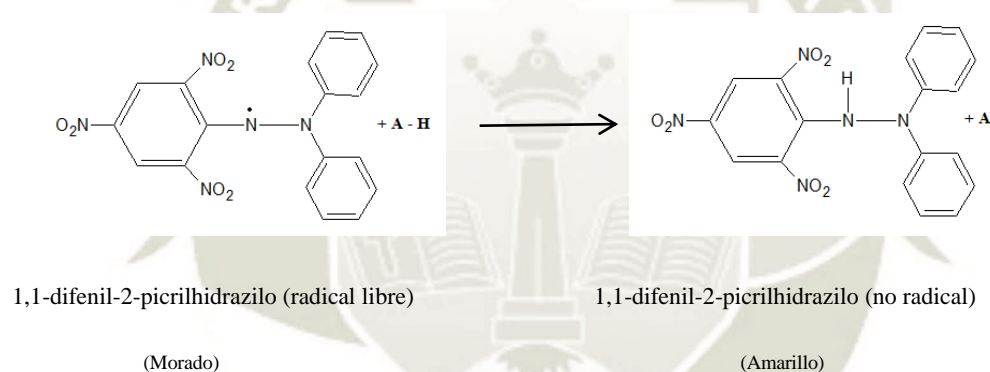


Figura N°12: Molécula de DPPH¹⁴⁰

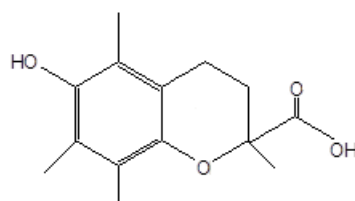


Figura N°13: Molécula de Trolox

3.9 HPLC

La HPLC o Cromatografía Líquida de Alta Performance ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década del 70's hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, ya sea este dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial, biológico o bromatológico.

Básicamente, los equipos de HPLC pueden clasificarse integrados y modulares. En los primeros, cada una de sus partes están reunidas en sus gabinetes y su intercambio o conexión con otros componentes de la misma o diferente marca es difícil. Permiten en cambio un mejor aprovechamiento del espacio, menos cables, tuberías y conexiones expuestas y quizá menor riesgo frente a operadores ocasionales o poco experimentados. En los segundos, los módulos son instrumentos individuales que no solo permiten armar el equipo según la necesidad del analista sino aumentar su complejidad según esa necesidad varíe¹⁵³.

Reservorio de la fase móvil

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse “dentro de la caja negra” de un equipo integrado o externamente e un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones¹⁵³.

Puede emplearse como reservorio de fase móvil cualquier frasco de laboratorio de buena calidad, con una tapa adecuada para prevenir el riesgo de partículas ambientales al sistema, Es incluso una práctica corriente el empleo del mismo envase comercial en que se expenden los solventes, a cuya tapa se practican algunos orificios, al menos uno para el tubo de salida y otro para venteo, y simplemente se intercambia el frasco del solvente al agotarse el que está en uso¹⁵³.

Tuberías

La fase móvil empleada en el HPLC debe circular por tuberías que conectan al reservorio de solventes con la bomba, la bomba con el inyector, éste con uno o más detectores conectados en serie, y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Es evidente que estas tuberías deberán ser inertes, y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistente a altas presiones. Así, se emplean tubos de acero inoxidable o poliméricas, siendo las tuberías de acero 316 y la de teflón las más comúnmente utilizadas. Las tuberías de acero se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión, y los materiales poliméricos para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior¹⁵³.

Uniones

Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Una unión consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión “macho”, consiste en una férula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo que se ajusta a la unión “hembra”, presente en un conector o componente de un módulo, dejando un volumen interno libre al solvente prácticamente nulo. Al fabricar una unión, la férula queda fijada a la tubería al realizar el primer ajuste y luego no se puede mover¹⁵³.

Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- Deben ser inertes a fases móviles y muestras
- Deben cerrar herméticamente
- No deben contribuir en forma notable al ensanchamiento de banda extracolumnar por la presencia de volúmenes muertos

Bomba

La bomba de HPLC impulsa la fase móvil proveniente del reservorio del solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Existen bombas capaces de entregar caudales muy pequeños, del orden de microlitros/minuto para la cromatografía analítica convencional hasta valores mucho mayores para las separaciones semipreparativas y preparativas, básicamente existen dos tipos de bombas: las de pistón y las de desplazamiento continuo¹⁵³.

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con el solvente son acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón.

Las bombas de HPLC presentan las siguientes características.

- Caudal. - Los equipos convencionales operan con caudales entre 0.1 y 10 mL/min y trabajan con presiones de hasta 6000 psi¹⁵³.
- Exactitud del caudal. - La exactitud en la medición del caudal se refiere a la divergencia entre el caudal de trabajo establecido y el caudal real entregado, esto es muy importante para la determinación de los tiempos de retención.

- Ruido. - Se refiere a las variaciones denominadas pulsaciones que presentan las bombas del tipo recíprocante, y que conducen a variaciones en el caudal de solventes entregados en intervalos cortos de tiempo¹⁵³.
- Deriva. - La deriva es un cambio continuo en la entrega de solvente que se produce en intervalos de tiempo muy largos. La deriva en el caudal conduce a diferencias en las áreas de los picos durante operaciones automáticas en periodos de tiempo muy largos¹⁵³.
- Sistema de corte. - es conveniente que la bomba posea sistemas de corte de caudal cuando se superen valores límites de presión tanto superior como inferior. Este sistema de corte evita, en el primer caso, que excesos en la presión del sistema cromatográfico puedan dañar los componentes más sensibles como columnas y celda de los detectores¹⁵³.

Bombas recíprocantes. - En la actualidad la mayor parte de los equipos cromatográfico utilizan bombas con pistones de tipo recíprocante. Existe varios tipos de bomba recíprocantes: de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba tándem, y bomba a pistón diafragma¹⁵³.

Bomba jeringa. - La bomba jeringa es, a diferencia de las bombas recíprocantes, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el disolvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia adelante del pistón. El recorrido del pistón, y el volumen desplazado es, en los casos en los que se aplica, suficiente para efectuar un número determinado de ensayos completos, sin necesidad de recargar su cámara¹⁵³.

Sistema de gradientes

El HPLC isocrático es capaz de separar un número limitado de picos, típicamente de 10 o 12, para sistemas más complejos, o cuando la polaridad de los complejos a separar es muy diferente, es posible que la modalidad isocrática no sea capaz de resolverlos. En estos casos el analista puede optar por dos alternativas: la corrida multidimensional, o la utilización de una gradiente de solventes¹⁵³.

El gradiente de solventes es comparable a la programación de temperaturas en cromatografía gaseosa. En GC se vería la temperatura en función al tiempo. En HPLC se varía la composición de la fase móvil, comenzando la elución con un solvente débil y aumentando progresivamente la proporción del componente fuerte, esta variación puede

seguir un perfil lineal cóncavo, convexo o una mezcla de estos perfiles en un mismo cromatograma. El gradiente de solvente se gradúa por el intervalo de variación, es decir, por la velocidad de cambio del solvente débil al fuerte¹⁵³.

Inyectores

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características¹⁵³.

- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida al sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.
- En casos especiales se puede requerir que opere a altas temperaturas.

Detectores

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite “ver” y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica¹⁵³.

- Deben reunir algunas características como
- Tener un amplio rango dinámico de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal.
- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar.
- Responder a todos los solutos.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- Poseer una buena relación señal/ruido.
- No destruir la muestra.
- Tener una constante de tiempo baja.

Detectores generales

Detectores de índice de refracción. - Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el solvente puro y el solvente que contiene la muestra. Es un detector universal y no destructivo. Como contrapartida es muy poco sensible, lo cual limita su campo de acción y es muy afectado por cambios de temperatura. Existen tres tipos diferentes de detectores de índice de refracción: Fresnel, Deflexión, Interferométrico¹⁵³.

Detectores selectivos

Detector UV. - Es el detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradiente de solventes, Con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. El detector UV opera en el rango de 190 a 350 nm y en algunos equipos se puede extender a la zona visible del espectro (350 a 700nm), recibiendo así el nombre de detector UV/Visible¹⁵³.

Existen dos tipos de detectores UV: los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable¹⁵³.

- Detectores de onda fija o fotométrico. - este detector opera a longitudes de onda prefijadas, determinadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión.
- Detector de ondas variables o espectrofotométrico. - Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo, es mucho más versátil que el detector de onda fija.

Detector de fluorescencia. - se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas.

La selectividad se debe a dos factores:

- Existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y la reacción de derivatización implica la presencia de un grupo funcional.
- Se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión.

Detector electroquímico. - Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector UV, y altamente selectivo. La selectividad se debe, no solo a que detecta compuestos capaces a ser oxidados y reducidos, sino que pueden reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado¹⁵³.

Bases de la separación

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor del cual se monta un equipo

de mayor o menor complejidad, en el caso más simple, el cromatógrafo líquido está constituido por¹⁵³:

- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: detector
- Un sistema de registro de datos.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Un gráfico el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo.
- Un eluido o eluato, el flujo proveniente de la columna.

Bases de la separación. - Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacciones entre cada uno de estos componentes. Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, interacciones dipolares y electrostáticas, son las responsables de la mayor y menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria. Así, el componente más afín a la fase estacionaria se retiene más y tarda más en eluir, y el más afín a la fase móvil se retiene menos y eluye antes¹⁵³.

Solventes

La fase móvil en HPLC cumple un rol fundamental, ya que puede por sí misma modificar completamente la selectividad de las separaciones en fase normal y es, a su vez, el verdadero motor de las separaciones de fase reversa. De hecho, esta es la principal diferencia que existe entre GC y la HPLC. La única herramienta para modificar la selectividad de una separación es la columna y, por ello, suele utilizarse una columna para cada tipo de separación¹⁵³.

Propiedades de los solventes. -

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad.
- Compatibilidad con el detector utilizado.
- Adecuado punto de ebullición.

- Baja viscosidad.
- Seguridad.
- Alto grado de pureza.

Solventes de fase reversa

- Agua
- Metanol
- Acetonitrilo
- Tetrahidrofurano
- dioxano

Solventes de fase normal

- Éteres
- Hidrocarburos alógenos
- Hidrocarburos alifáticos

Para la preparación de las fases móviles se deben tener en cuenta: pH y pH aparente, la filtración de la fase móvil como tratamiento preventivo, desgasificación; ya que el gas disuelto en la fase móvil puede producir varios inconvenientes¹⁵³.

Cromatografía de fase ligada

Actualmente el método dominante es la cromatografía de fase ligada que puede clasificarse en fase normal y fase reversa, de acuerdo a la polaridad relativa de la fase móvil y de los grupos funcionales químicamente ligados a la matriz¹⁵³.

Cromatografía en fase reversa: La difusión de la fase reversa se debe a un factor clave: la silicagel, es un material fuertemente higroscópico. El agua adsorbida, que forma capas simples o múltiples alrededor de la partícula y llega a tapar sus poros, es responsable de la pérdida de actividad de la fase estacionaria en fase normal, o al menos, conduce a mecanismos mixtos de retención: por una parte, fenómenos de adsorción debidos a los silanoles superficiales de la fase estacionaria y por otra, a mecanismos de partición entre la fase móvil y el agua retenida sobre la fase estacionaria¹⁵³.

Las ventajas de la cromatografía en fase reversa son:

- Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase.
- La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.

- La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre.
- La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- El modificador inorgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios.
- El orden de elución es predecible, en función a la hidrofobicidad del analito.
- Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema luego de un cambio de fase móvil.

Cromatografía en fase normal. - Esta se realiza sobre fases estacionarias hidrofílicas como la sílice o alúmina y con solventes de mediana a baja polaridad como fase móvil. Es un método apropiado para la separación de solutos de polaridad mediana a alta y es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares. De hecho, es importante que la cromatografía en fase normal es el único modo de HPLC que puede separar eficientemente isómeros posicionales con sustituyentes polares. Por el contrario, la cromatografía en fase normal resulta ser poco apropiada para la separación de homólogos o sustancias cuyas diferencias estructurales se encuentran en la zona no polar de la molécula¹⁵³.

Cromatografía de intercambio iónico. - En esta, la fase estacionaria contiene grupos funcionales iónicos y retiene el soluto, de características iónicas, pero de signo opuesto, intercambiándolo por un proceso reversible con iones de la fase móvil¹⁵³. El proceso se denomina de intercambio iónico si el analito tiene carga negativa y catiónico si el analito tiene carga positiva.

Cromatografía de exclusión molecular. - Se utiliza para el análisis de compuestos de peso molecular mayor a 2000, los cuales, de hecho, suelen presentar problemas en los otros modos cromatográfico. Sin embargo, también se puede emplear para el análisis de compuestos de bajo peso molecular, en particular para la separación de metil y propilparahidroxibenzoatos¹⁵³.

La cromatografía de exclusión molecular separa sustancias en base a su tamaño efectivo en solución, Como el tamaño efectivo de una molécula en solución y su peso molecular son parámetros proporcionales, esta modalidad cromatográfica suele utilizarse tanto para la determinación del peso molecular y como la distribución de pesos moleculares¹⁵³.

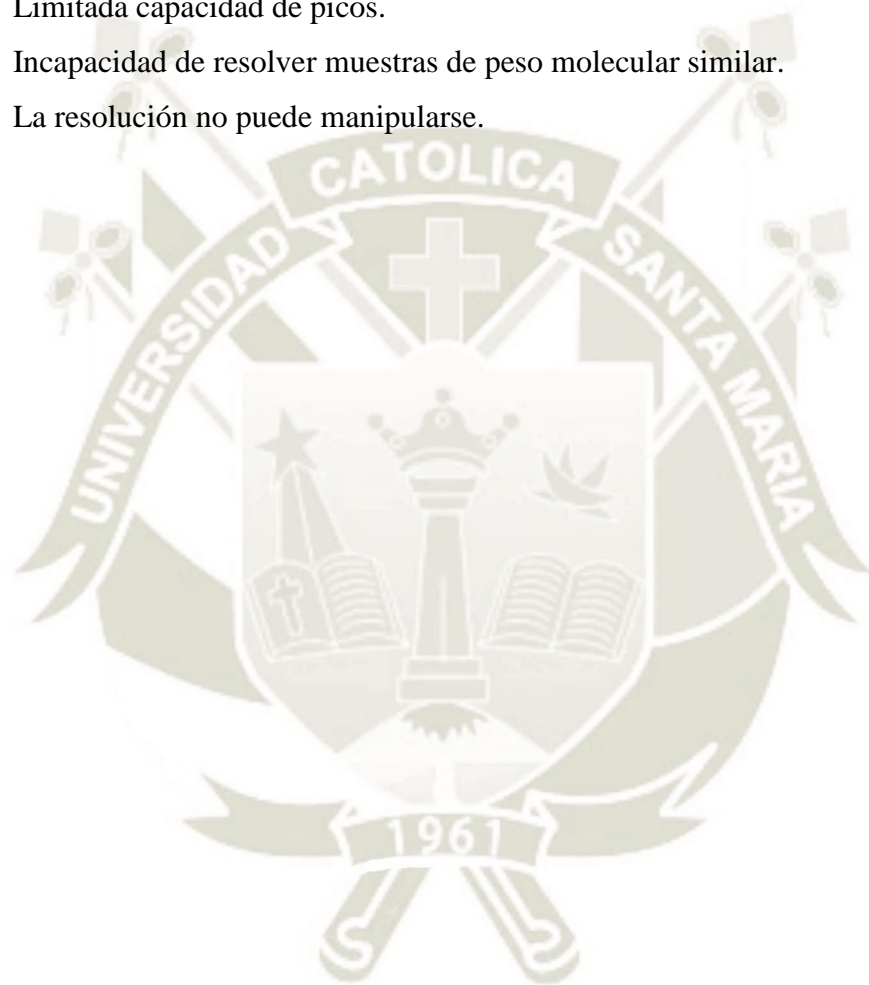
Entre sus ventajas tenemos:

- Separación por dimensiones moleculares.

- Picos angostos.
- Tiempo de separación corto y predecible.
- Elución predecible.
- No hay pérdida de muestra.
- No hay desactivación de la columna

Presenta también algunas desventajas:

- Limitada capacidad de picos.
- Incapacidad de resolver muestras de peso molecular similar.
- La resolución no puede manipularse.



4. HIPÓTESIS

Si la pigmentación oscura en los vegetales es característica de la presencia de antocianinas con propiedades antioxidantes es posible que el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) presente capacidad antioxidante.





1. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Lugar de ejecución

La parte experimental de la tesis se realizó en los laboratorios H-101, H-301 y H-202 de la Universidad Católica de Santa María

1.2 Materiales

1.2.1 Material biológico

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)
- *Vaccinium corymbosum* L (Arándano)
- *Zea mays* L (Maíz morado)

1.2.2 Material de laboratorio

- Baguetas
- Beakers de 250 mL
- Fiolas de 25 mL y 50 mL
- Gradilla
- Matraces de 25 mL, 50 mL, 250 mL y 1000 mL
- Micropipeta de 200 μ L
- Mortero
- Papel aluminio
- Papel filtro #1
- Papel indicador de pH
- Picetas
- Pipetas de 1 mL y 10 mL
- Probeta de 100 mL
- Propipeta
- Puntas de micropipeta
- Tubos de ensayo 15 x 125 mm
- Tubos para centrifuga de 15 mL

1.2.3 Reactivos e insumos

- Acetato de sodio (0.4 M) MQ200 MERCK
- Acetonitrilo (ACN) MS Fisher Chemical
- Acido acético MQ200 MERCK
- Acido cítrico TraceSELECT Fluka
- Acido clorhídrico (0,02 M) MQ200 MERCK
- Acido clorhídrico concentrado HCl MQ200 MERCK
- Acido Trifluoracetico (TFA) 99% ACROS ORGANIC

- Agua acidificada
- Agua destilada
- Agua ultra pura
- Buffer citrato
- Buffer fosfato
- Cartucho C-18 de fase reversa QUIMLAB
- Cloruro de potasio (0.025 M) MQ200 MERCK
- DPPH
- Estándar de antocianinas 1: (Definidina-3-glucósido) CARBOCIL
- Estándar de antocianinas 2: (Cianidina-3-glucósido) CARBOCIL
- Fosfato de amonio MQ200 MERCK
- Metanol acidificado
- Metanol grado analítico DIPROQUIM
- PVPP QUIMLAB
- Sacarosa

1.2.4 Equipos

- Balanza analítica OHAUS Pioneer.
- Balanza OHAUS Scout Pro.
- Centrifuga GEMMY INDUSTRIAL PLC Series.
- Cocinilla eléctrica MAGEFESA MGF 8022.
- Equipo de baño termostático VICKING Modelo Masson.
- Equipo de Vacío
- Espectrofotómetro SPECTRUM SP 1105.
- HPLC (MERK Hitachi)
- Potenciómetro JENWAY 3510.
- Refractómetro SD SDS100
- Refrigeradora BOSCH.
- Rotavapor BUCHI RII.

1.2.5 Otros

- Cinta Masking Tape
- Contenedor de aluminio
- Frascos ámbar
- Lapicero
- Licuadora
- Termostatos

1.3 Métodos

1.3.1 Obtención y preparación de la materia prima

En el presente trabajo de investigación se comparó el contenido de antocianinas y la capacidad antioxidante en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

procedente de Huancayo frente a los extractos fermentados de *Zea mays L.* (Maíz morado) procedente del valle de Majes, región Arequipa y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) procedentes de la región La Libertad.

La preparación de la materia prima fue a partir de cosechas recientes, en buen estado y en su forma fresca; se realizó el lavado de la materia prima en bandejas con agua potable y luego se dejó escurrir poco a poco por acción de la gravedad para evitar su maltrato; después se inició la etapa de trituración con la ayuda de un mortero hasta reducirlo a fracciones pequeñas para posteriormente ser pesadas.

1.3.2 Obtención de los extractos fermentados de antocianinas.

Para la extracción de antocianinas de la Mashua, Maíz morado y Arándano primero se preparó un inóculo y posteriormente se realizó la fermentación.

1.3.2.1 Preparación del inóculo

Se preparó un inóculo, para cada materia prima (Mashua, Maíz morado y Arándano). Para esto se colocó 15 g de materia prima triturada, se ajustó la concentración de azúcares a 12 Brix mediante la adición de sacarosa y se le agregó 0.05 g de Fosfato de amonio como fuente de Nitrógeno y Fósforo, luego se inoculó 0.05 g de *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada y se procedió a incubación a 30 °C por 24 h; se realizó el mismo procedimiento para cada materia prima.

Luego de obtener los inóculos, se procedió a la preparación de los extractos de antocianinas y la evaluación del efecto del pH y temperatura.

1.3.2.2 Preparación de los extractos fermentados de antocianinas a diferentes pH y temperaturas.

Se evaluó 5 diferentes pH y 5 diferentes temperaturas para cada materia prima (Mashua, Maíz morado y Arándano). Para esto se preparó 250 mL de buffers Citrato (pH 2, pH 3, pH 4, pH 5 y pH 6) a continuación a cada buffer se le agregó 40 g de la materia prima previamente triturada, se les ajustó la concentración de sólidos solubles a 12 Brix mediante la adición de sacarosa y se homogenizó por agitación durante 30 min; cada mezcla (buffer + materia prima) fue distribuida en 5 frascos de vidrio color ámbar para la evaluación de las temperaturas (15°C, 21°C, 30°C, 35°C y 45°C) y a cada uno se le agregó 1.2g del inóculo preparado anteriormente; obteniéndose así 25 frascos con los extractos para la evaluación del pH y la temperatura. Se realizó el mismo procedimiento para cada

materia prima, obteniéndose un total de 75 extractos que fueron llevados a incubación por 3 días. Este procedimiento se realizó por triplicado.

1.3.3 Evaluación del efecto del pH y la temperatura en la extracción de antocianinas

Finalizado el tiempo de incubación, se procedió cuantificar las antocianinas totales por el método del pH diferencial¹²⁶. Una alícuota de una solución acuosa de antocianinas fue ajustada a pH 1 y otra a pH 4.5. La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción es proporcional al contenido de antocianinas¹²⁷.

Para esto se centrifugó cada uno de los extractos a 12000 rpm por 20 min en una Centrifuga GEMMY INDUSTRIAL PLC Series, se descartó el residuo y se conservó el sobrenadante. Se preparó 500 mL de tampón pH 1 de Cloruro de potasio 0.025 M ajustado con Ácido clorhídrico y 500 mL de tampón pH 4.5 de Acetato de sodio 0.4 M ajustado con Ácido acético. Seguidamente se tomó una alícuota de 100 uL del sobrenadante al que se le agregó 5 mL del tampón pH 1 y se midió la absorbancia a 510 nm (que es la longitud de onda de máxima absorción de antocianinas) en un espectrofotómetro (SPECTRUM SP 1105), además para efectuar la corrección de la medida por la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes se midió la absorbancia a 700 nm, el mismo procedimiento se realizó con el tampón pH 4.5 y para cada uno de los 75 extractos. Cabe señalar que se utilizó como blanco los buffers anteriores para cada tipo de muestra.

La concentración de antocianinas se expresó en mg de cianidina-3-glucosido/100 mL de extracto calculada de acuerdo a la siguiente ecuación¹²⁸:

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

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

DONDE:

AT: Antocianinas totales

ΔA : Cambio en la absorbancia

PM: Masa molecular de cianidina-3-glucosido, 449,2 g/mol

FD: Factor de dilución

ε : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucosido 25900

l: Longitud de paso de celda

1000: Factor de conversión de gramos a miligramos

1.3.4 Evaluación del tiempo de fermentación en el contenido de antocianinas

Una vez obtenido el pH óptimo y temperatura óptima en la extracción, se procedió a analizar la variable tiempo, para esto se preparó previamente cada inóculo como se describe en el punto 3.3.2.1 y posteriormente se prepararon cada uno de los extractos (Mashua, Maíz morado y Arándano) como se describe en el punto 3.3.2.2 con la diferencia que en esta ocasión se trabajó con el pH y temperatura óptimos para cada uno de los extractos antes mencionados, obteniéndose 3 extractos; para la determinación del contenido de antocianinas totales (AT) se procedió igual manera que en el punto 3.3.3 para cada uno de los extractos. Se evaluó la extracción de antocianinas cada día durante 4 días. Este ensayo se realizó por triplicado.

1.3.5 Actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante se realizó por el método de captación del radical DPPH. Se preparó una solución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) a una concentración de 20 mg/L en metanol grado analítico y se cubrió con papel aluminio para evitar su degradación¹²⁹.

Se utilizó cada uno de los extractos fermentados (Mashua, Maíz morado y Arándano) con mayor contenido de antocianinas totales (AT) y con cada uno de estos se preparó una solución madre de 12 g/L en metanol grado analítico, a partir de esta solución se preparó 4 diluciones: 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L para cada uno de los extractos.

Posteriormente de cada dilución se retiró 0.8 mL y se llevó a un tubo de ensayo cubierto con papel aluminio y se añadió 1.6 mL de solución DPPH, se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (SPECTRUM SP 1105). A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de la actividad antioxidante. Se preparó un blanco con metanol y un blanco muestra con 0.8 mL de muestra y 1.6 mL de metanol; también se midió la absorbancia del DPPH a una concentración de 20 mg/L. Con estos datos se procedió a evaluar la actividad antioxidante de las tres muestras (Mashua, Maíz morado y Arándano).

Para la preparación de los estándares de Trolox, se procedió de la misma forma, es decir, se colocó en un tubo 0,8 mL de la solución estándar con 1,6 mL de la solución de DPPH.

La capacidad antioxidante se expresó en porcentaje de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%CA = 1 + \frac{abs(m) - abs(b)}{abs(DPPH)}$$

DONDE

%CA = Porcentaje de capacidad antioxidante

Abs (m) = Absorbancia de la muestra

Abs (b) = Absorbancia del blanco muestra

Abs (DPPH) = Absorbancia del DPPH.

1.3.6 Purificación de antocianinas

La purificación de los extractos fermentados (Mashua, Maíz morado y Arándano) con mayor contenido de antocianinas, se realizó en 2 fases sólidas: polivinilpolipirrolidona (PVPP) y el cartucho Sep-pack C-18 de fase reversa, además se utilizó metanol acidificado al 0.01%, agua acidificada al 0.01% y papel filtro.

Con la ayuda de un matraz kitasato, una bomba de vacío y un embudo buchner se procedió a realizar la purificación de los extractos fermentados; para esto se colocó el papel filtro en el embudo buchner y se cubrió con el PVPP hasta una altura de 0.4 cm, posteriormente se acondicionó al PVPP filtrando al vacío 5 mL de agua acidificada, seguido de 5 mL de metanol acidificado; una vez acondicionado, se agregó 10 mL de extracto fermentado y también agua acidificada, se homogenizó y se filtró al vacío; se descartó el filtrado y se conservó la torta, posteriormente se agregó a la torta metanol acidificado y se filtró al vacío; este procedimiento se realizó 4 veces hasta obtener un volumen adecuado del extracto metanólico y se llevó a un rotavapor BUCHI RII a 39°C para su concentración.

Al igual que el PVPP el cartucho Sep-pack C-18 tiene que acondicionarse; para esto se filtró a través del cartucho 5 mL de agua acidificada seguido de 5 mL de metanol acidificado; una vez acondicionado, se filtró el extracto metanólico a través del cartucho seguido de agua acidificada, con la finalidad de arrastrar los compuestos de alto carácter hidrofílico (ácidos, azúcares), finalmente se filtró metanol acidificado y se conservó el filtrado. Este procedimiento se realizó 4 veces hasta obtener un volumen adecuado del

extracto metanólico y se llevó a un rotavapor BUCHI RII a 39°C hasta casi sequedad y luego se resuspendió en 10 mL de metanol acidificado.

El procedimiento descrito es una de las técnicas empleadas con mayor frecuencia por diversas investigaciones de identificación de antocianinas.

1.3.7 Identificación de las antocianinas por HPLC

Se realizó la identificación de dos tipos de antocianinas: cianidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido en Mashua, Maíz morado y Arándano. Para esto se realizó un tratamiento a los estándares y a las muestras.

Tratamiento de los estándares: Los estándares (cianidina-3-glucósido y delphinidina-3-glucósido) se obtuvieron del laboratorio Carbocil; estos se encontraban en fase sólida con un aspecto arenoso. Se procedió a suspenderlos a 500 ppm con metanol acidificado al 0.02% con HCl y se mantuvieron a -20°C.

Tratamiento de las muestras: A partir de los extractos metanólicos resuspendidos en metanol acidificado se tomó 1 mL de cada una de estas y se colocó en un tubo de ensayo para secarlas por aireación.

Las antocianinas fueron separadas utilizando un sistema HPLC Merk Hitachi D-7000. Se utilizó una columna de fase reversa Chromolith RP-18e. La fase móvil A estuvo compuesta por Acetonitrilo: Ácido trifluoroacético (TFA) (99.98: 0.02) y la fase móvil B estuvo compuesta por Agua: TFA (99.95: 0.05). El gradiente de los solventes en las corridas fue de 5% a 20% de A en los primeros 2 min, seguido por una disminución a 5% de A en 7 min y finalmente mantenerlo por 2 min en 5% de A. El tiempo total de la corrida fue de 11 min. El flujo utilizado fue de 1 mL/min. Las corridas se llevaron a temperatura ambiente y se inyectó 20 µL de muestra. Las antocianinas eluidas fueron monitoreadas a 520 nm. Las muestras y las fases móviles fueron filtradas y desgasificadas previas a la inyección al HPLC. Las antocianinas fueron identificadas comparando los tiempos de retención y sus espectros de absorción frente a estándares previamente identificados.

Para el análisis de estándares por HPLC se tomó 40 µL de estándar suspendido en metanol acidificado y se enrasó a 2 mL en una fiola con fase móvil (15% de A: 85% de B), se homogenizó, se filtró a través de un Millipore tipo GV de 22 µm y se inyectó 20 µL en el HPLC.

Posteriormente se procedió a analizar las muestras purificadas y secas; estas fueron resuspendidas en fase móvil (15% de A : 85% de B) a diferentes proporciones para cada una de ellas; para la Mashua, se sacó 1 mL de muestra purificada y se resuspendió con 800 μ L de fase móvil; para el Maíz morado, se sacó 1 mL de muestra purificada y se resuspendió en 4000 μ L de fase móvil; para el Arándano, se sacó 1 mL de muestra purificada y se resuspendió en 800 μ L de fase móvil; se homogenizó y se filtró a través de un Millipore tipo GV de 22 μ m y se inyectó 20 μ L en el HPLC. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

1.3.8 Desarrollo de parámetros para el análisis por HPLC.

1.3.8.1 Determinación de los tiempos de retención

Para la determinación de los tiempos de retención de la cianidina-3-glucósido y de la delphinidina-3-glucósido, se inyectó estándares de referencia consecutivamente, para así identificar cada uno de ellos y determinar que estos coincidan.

La inyección de estos estándares se hizo en forma de mix a una concentración de 10 ppm cada una, estos se hicieron por triplicado.

1.3.8.2 Linealidad

La linealidad del método define la habilidad de este para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito.

La linealidad se determinó empleando estándares de referencia en un rango de 5 concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10 ppm), estos se prepararon a partir de una solución madre de 10 ppm de la siguiente manera:

Solución 8 ppm: en una fiola de 2 mL se le agregó 1600 μ L de solución madre y se enrasó con fase móvil (15% de A: 85% de B).

Solución 6 ppm: en una fiola de 2 mL se le agregó 1200 μ L de solución madre y se enrasó con fase móvil (15% de A: 85% de B).

Solución 4 ppm: en una fiola de 2 mL se le agregó 800 μ L de solución madre y se enrasó con fase móvil (15% de A: 85% de B).

Solución 2 ppm: en una fiola de 2 mL se le agregó 400 μ L de solución madre y se enrasó con fase móvil (15% de A: 85% de B).

Estas soluciones se analizaron por HPLC y se generó sus curvas de linealidad, este ensayo se realizó por triplicado.

1.3.8.3 Precisión

La precisión es medida mediante la repetibilidad y precisión intermedia:

Repetibilidad. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la muestra en las mismas condiciones operativas (un mismo analista, mismos equipos y reactivos, etc.) en un mismo laboratorio y en un tiempo corto.

Precisión intermedia. Estudia la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (diferentes analistas, equipos, días, etc.) y en un mismo laboratorio.

La repetibilidad se evaluó en 5 niveles de concentración (2, 4, 6, 8 y 10 ppm) y cuatro réplicas de cada nivel. Para la reproducibilidad se evaluó dos analistas, dos días diferentes y solvente nuevo.

1.3.8.4 Exactitud

La “exactitud” expresa la cercanía de un resultado al valor verdadero (ISO 3534-1). La validación de un método busca cuantificar la exactitud probable de los resultados evaluando tanto los efectos sistemáticos como los aleatorios sobre los resultados. La evaluación práctica de este parámetro se fundamenta en la comparación de la media de los resultados de un método con relación a valores conocidos, es decir, se determina contra un valor de referencia.

La evaluación de este parámetro se determinó mediante el porcentaje de recuperación del agregado de estándar (concentración conocida) a una muestra, la cual consiste en añadir a la muestra una cantidad conocida de patrón, para calcular el porcentaje de recuperación.

Se aplicó la ecuación:

$$\% \text{ de recuperación} = (C \text{ fortificada} - C \text{ sin fortificar}) * 100 / C \text{ añadido}$$

1.3.8.5 Límites de cuantificación y de detección

El límite de detección se define como el menor contenido que puede medirse con una certeza estadística razonable (Asociación de químicos analíticos oficiales, 2003). Se determina mediante el análisis de muestras con cantidades o concentraciones conocidas de analito

El límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. También se define por diversas convenciones, como la concentración del analito correspondiente al valor del blanco de muestra más 5, 6 o 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Algunas veces también se conoce como “límite de determinación”.

LOQ es un valor indicativo y no deberá usarse en la toma de decisiones.

Se realizó mediante el método de curvas de calibración a baja concentración.

El límite de detección se calcula mediante la siguiente fórmula

$$\text{Lim detección} = \frac{|3Sb|}{B}$$

Donde:

Sb: desviación estándar

B: valor de la pendiente

Para el límite de cuantificación se utilizó la siguiente fórmula

$$\text{Lim cuantificación} = \frac{|10Sb|}{B}$$

Donde:

Sb: desviación estándar

B: valor de la pendiente



CAPITULO III RESULTADOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de antocianinas

1.1 Evaluación del contenido de antocianinas totales (AT) en los extractos fermentados en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) a diferente pH y temperatura.

| Variables | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
|---------------------|----|--|-------------|----------|
| Temperatura (°C) | pH | Mashua | Maíz morado | Arándano |
| 15 | 2 | 159.6831 | 159.4743 | 29.9188 |
| | 3 | 154.2559 | 164.0665 | 13.8462 |
| | 4 | 100.4716 | 158.4307 | 36.9463 |
| | 5 | 69.3004 | 185.8447 | 17.7426 |
| | 6 | 74.3796 | 221.6777 | 6.2621 |
| 21 | 2 | 167.8934 | 240.6031 | 34.4414 |
| | 3 | 176.3820 | 179.0260 | 40.2861 |
| | 4 | 139.0878 | 180.6263 | 13.5678 |
| | 5 | 115.5006 | 91.5656 | 19.8995 |
| | 6 | 103.6027 | 143.1234 | 18.0905 |
| 30 | 2 | 165.3885 | 260.9897 | 32.7020 |
| | 3 | 191.7589 | 139.5053 | 46.5481 |
| | 4 | 122.8760 | 107.4295 | 21.9869 |
| | 5 | 116.4051 | 131.5037 | 26.7878 |
| | 6 | 73.6143 | 84.2598 | 20.8040 |
| 35 | 2 | 73.8230 | 222.8605 | 26.7182 |
| | 3 | 116.0572 | 170.3982 | 30.6146 |
| | 4 | 126.4245 | 123.0151 | 28.9447 |
| | 5 | 128.3031 | 162.2575 | 8.8365 |
| | 6 | 98.1059 | 151.8903 | 30.3363 |
| 45 | 2 | 161.0747 | 225.0175 | 16.6989 |
| | 3 | 148.5505 | 127.0507 | 15.1682 |
| | 4 | 128.9989 | 108.1949 | 12.0371 |
| | 5 | 103.8810 | 97.3406 | 3.1310 |
| | 6 | 108.5428 | 94.9749 | 11.6196 |

Tabla N°12: Contenido de Antocianinas totales (AT) en los extractos fermentados de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) a diferente pH y temperatura.

Se realizó 3 repeticiones para la evaluación del contenido de antocianinas en la Mashua, Maíz morado y Arándano, en la Tabla N° 12 se trabajó con el promedio del contenido de antocianinas totales (AT). Obtenidas frente a los diferentes parámetros.

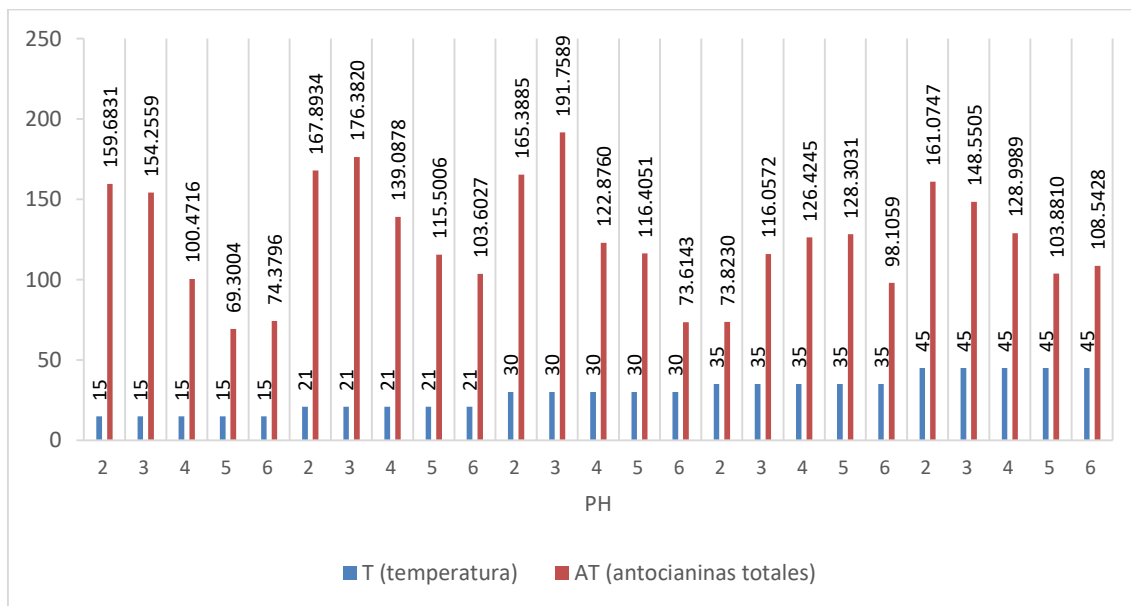


Figura N°14: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) a diferente pH y temperatura.

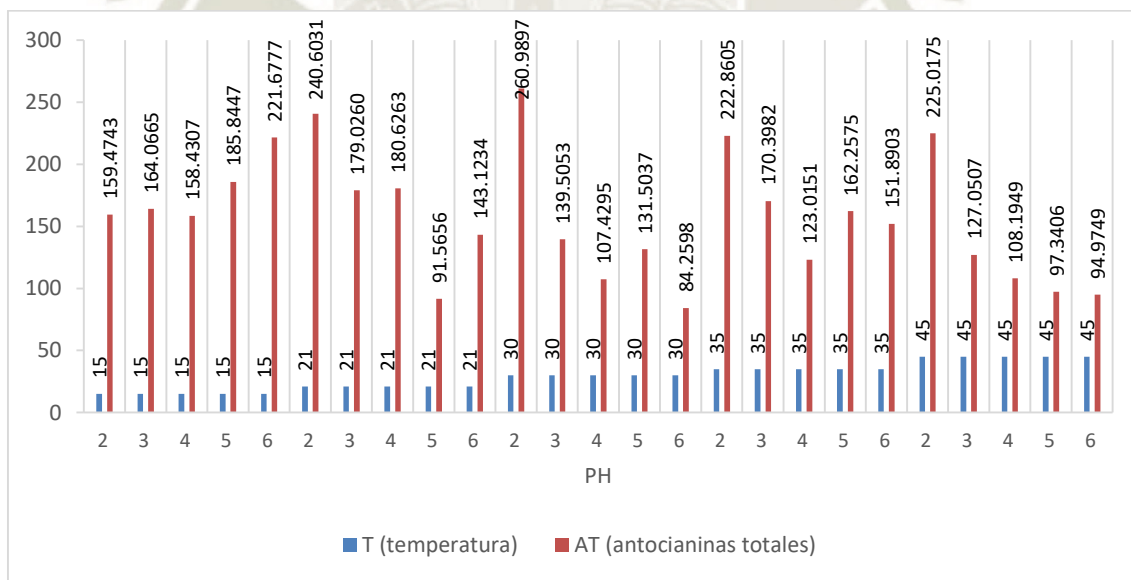


Figura N°15: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado) a diferente pH y temperatura.

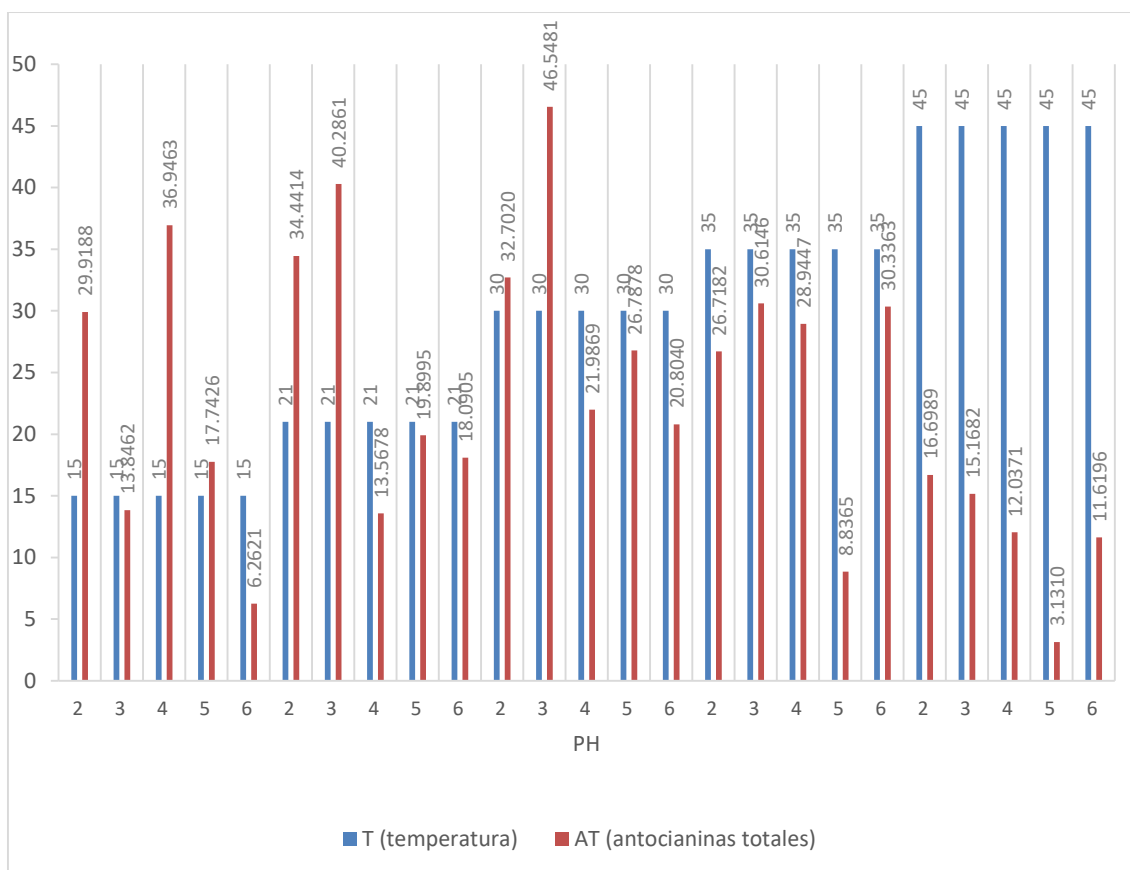


Figura N°16: Contenido de antocianinas totales en el extracto fermentado de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) a diferente pH y temperatura.

En los ensayos se encontró que el mayor contenido de antocianinas totales está en el rango de pH de 2 a 3 y la temperatura de 30 a 45°C, observándose que a pH 3 y 30°C se obtuvo una mayor extracción de antocianinas totales para la Mashua y el Arandano, pH 2 y 30°C para el Maíz morado como se muestra en las Figuras N° 14, 15 y 16. En la extracción de antocianinas se consideró dos aspectos: los factores que influyen en la estabilidad de las antocianinas y los factores que influyen en el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, y consecuentemente la producción de etanol por parte de la levadura. Tanto la temperatura y el pH son muy importantes en este aspecto, se pudo observar que la temperatura óptima para la extracción de antocianinas de las muestras está dentro del rango óptimo del crecimiento de la levadura descrito por Pitt y Hocking¹⁵⁰ quien menciona que el incremento de la temperatura hasta 34°C favorece el crecimiento de las levaduras y por lo tanto la producción de etanol en el medio, esto a su vez, incrementa la extracción de antocianinas así como también su solubilidad y su coeficiente de difusión¹⁵¹. Temperaturas mayores afectan al crecimiento de las levaduras y, en consecuencia, a la producción de etanol. Además, favorecen la producción de chalconas debido a que las reacciones de deterioro de las antocianinas son endotérmicas.^{74,87}

En investigaciones utilizando otros métodos de extracción de antocianinas, Gutiérrez et al,⁸⁸ reportaron que en el maíz morado trabajando a temperaturas entre 25 - 90°C, el mayor rendimiento de extracción se produjo a temperaturas entre 75°C y 90°C. También en estudios de optimización de la extracción de antocianinas de batata morada (camote) Fan et al,⁸⁹ reportaron que a temperaturas entre 40 - 80°C se logró la mejor extracción a 80°C.

De lo expuesto anteriormente, se puede inferir que la extracción de antocianinas por el método fermentativo se da a la mayor temperatura posible, pero sin que esta afecte el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El pH también se encuentra en el rango de crecimiento de la levadura, ya que este presenta un efecto contrapuesto a la temperatura. Es así que, cuanto menor es el pH, más se ve favorecida la estructura del catión flavilio (forma más estable de las antocianinas); a pH 5 se ve favorecida la formación de especies pseudobase carbinol que son incoloras⁸³. En el estudio de la extracción de antocianinas de frutillas en el rango de pH de 1.0 a 13.0 el resultado fue que la mejor extracción se dio al valor más bajo de pH⁸².

De lo expuesto en el punto anterior, se observó que a pH bajo hay una mejor extracción de antocianinas, pero se debe considerar que este no afecte el crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que a pH extremos se limita su crecimiento.

Se aplicó la prueba estadística de t-student para evaluar si existe diferencia significativa entre el par de valores más cercanos para cada una de las muestras. Para la Mashua se tomó los valores 191.7589 y 176.3820 que se observan en la Tabla N°12 y la Figura N°14; estos valores son el promedio de las 3 repeticiones de los tratamientos a pH 3, 30 °C y 21°C respectivamente. En la Tabla N°13 se muestra las repeticiones de estos valores.

Tabla N°13: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

| Mashua | | | |
|--------|--------------|---|----------|
| | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100mL extracto) | |
| pH | Repeticiones | Temperatura (°C) | |
| | | 30 | 21 |
| 3 | 1ra | 190.9935 | 171.1636 |
| | 2da | 192.0372 | 178.6781 |
| | 3ra | 192.2459 | 179.3043 |

El nivel de confianza utilizado fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P de la prueba F fue de 0.0429 lo que indica que las varianzas son distintas.

En la Tabla N°14 se muestran los datos de la prueba t suponiendo que las varianzas son distintas en la Mashua.

Tabla N°14: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

| | Variable 1 | Variable 2 |
|--------------------------------|------------|------------|
| Media | 191.7589 | 176.3820 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 2 | |
| Estadístico t | 5.8158 | |
| P($T \leq t$) dos colas | 0.0283 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 4.3027 | |

El nivel de confianza utilizado para la prueba de t-student fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P fue de 0.0283, lo que indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los 2 datos cercanos en la Mashua.

Para el Maíz morado se tomó los valores 260.9897 y 240.6031 que se observan en la Tabla N°12 y la Figura N°15; estos valores son el promedio de las 3 repeticiones de los tratamientos a pH 2, 30 °C y 21°C respectivamente. En la Tabla N°15 se muestra las repeticiones de estos valores.

Tabla N°15: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado)

| Maíz morado | | | |
|-------------|--------------|---|----------|
| | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100mL extracto) | |
| pH | Repeticiones | Temperatura (°C) | |
| | | 30 | 21 |
| 2 | 1ra | 263.6336 | 235.4543 |
| | 2da | 257.5803 | 239.2115 |
| | 3ra | 261.7550 | 247.1435 |

El nivel de confianza utilizado fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P de la prueba F fue de 0.4247 lo que indica que las varianzas son iguales.

En la Tabla N°16 se muestran los datos de la prueba t suponiendo que las varianzas son iguales en el Maíz morado.

Tabla N°16: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en *Zea maíz* L. (Maíz morado)

| | <i>Variable 1</i> | <i>Variable 2</i> |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Media | 260.9897 | 240.6031 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 5.2514 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.0063 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.7764 | |

El nivel de confianza utilizado para la prueba de t-student fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P fue de 0.0063, lo que indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los 2 datos cercanos en el Maíz morado.

Para el Arándano se tomó los valores 46.5481 y 40.2861 que se observan en la Tabla N°12 y la Figura N°16; estos valores son el promedio de las 3 repeticiones de los tratamientos a pH 3, 30 °C y 21°C respectivamente. En la Tabla N°17 se muestra las repeticiones de estos valores.

Tabla N°17: Influencia del pH en la extracción de antocianinas en el fermentado de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano)

| Arándano | | | |
|----------|--------------|---|---------|
| | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100mL extracto) | |
| pH | Repeticiones | Temperatura (°C) | |
| | | 30 | 21 |
| 3 | 1ra | 46.3394 | 38.6162 |
| | 2da | 46.1307 | 41.7472 |
| | 3ra | 47.1743 | 40.4948 |

El nivel de confianza utilizado fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P de la prueba F fue de 0.2188 lo que indica que las varianzas son iguales.

En la Tabla N°18 se muestran los datos de la prueba t suponiendo que las varianzas son iguales en el Arándano.

Tabla N°18: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano)

| | Variable 1 | Variable 2 |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| Media | 46.5481 | 40.2861 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 6.4952 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.0029 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.7764 | |

El nivel de confianza utilizado para la prueba de t-student fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P fue de 0.0029, lo que indica que si existe diferencia estadísticamente significativa entre los 2 datos cercanos en el Arándano.

Si existe diferencias estadísticamente significativas en cada par de datos cercanos para cada una de las muestras.

1.2 Evaluación del contenido de antocianinas totales (AT) en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays* L. (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) por días de fermentación

En la Tabla N° 19 se muestra que la mayor extracción de antocianinas totales (AT) se da al tercer día, esto debido al desarrollo de la levadura y a su producción de alcohol, además se observó una menor extracción de antocianinas totales al cuarto día. En las Figuras N° 17, 18 y 19 se muestra una mejor representación sobre la evaluación del contenido de antocianinas por día de fermentación.

Tabla N°19: Contenido de antocianinas totales en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays* L. (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) por días de fermentación

| Variables | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
|---------------------|------------------|--|-------------|----------|
| Temperatura (°C) | Tiempo (Días) | Mashua | Maíz morado | Arándano |
| | | pH 3 | pH 2 | pH 3 |
| 30 | 1 | 175.0600 | 157.3870 | 31.7279 |
| | 2 | 181.6700 | 163.9970 | 45.7828 |
| | 3 | 202.1261 | 208.1794 | 90.6010 |
| | 4 | 189.0453 | 113.9003 | 49.4704 |

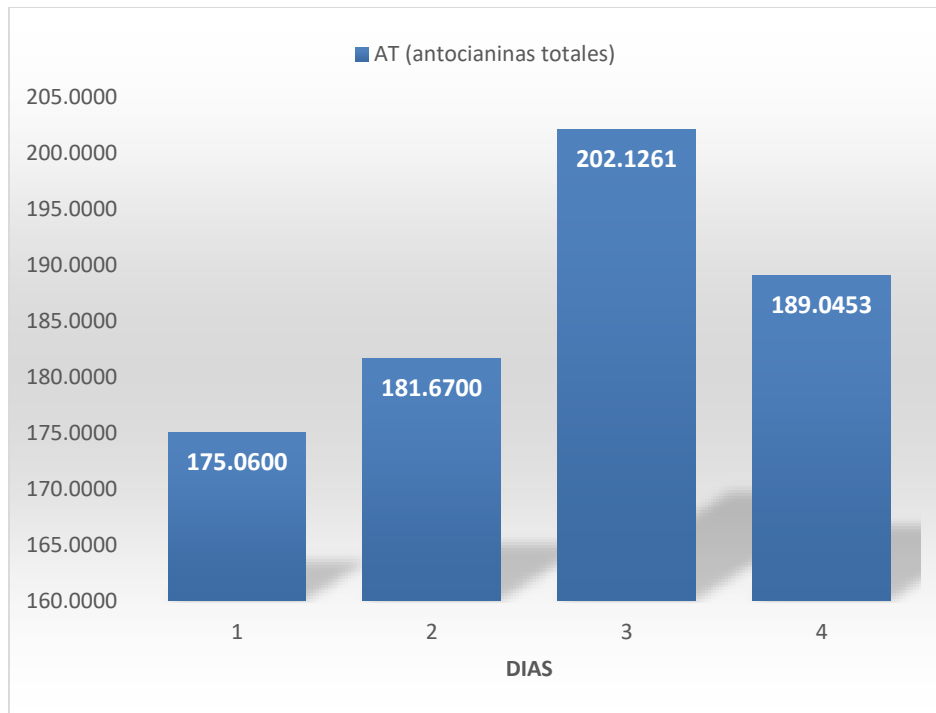


Figura N°17: Contenido de antocianinas totales en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) por días de fermentación

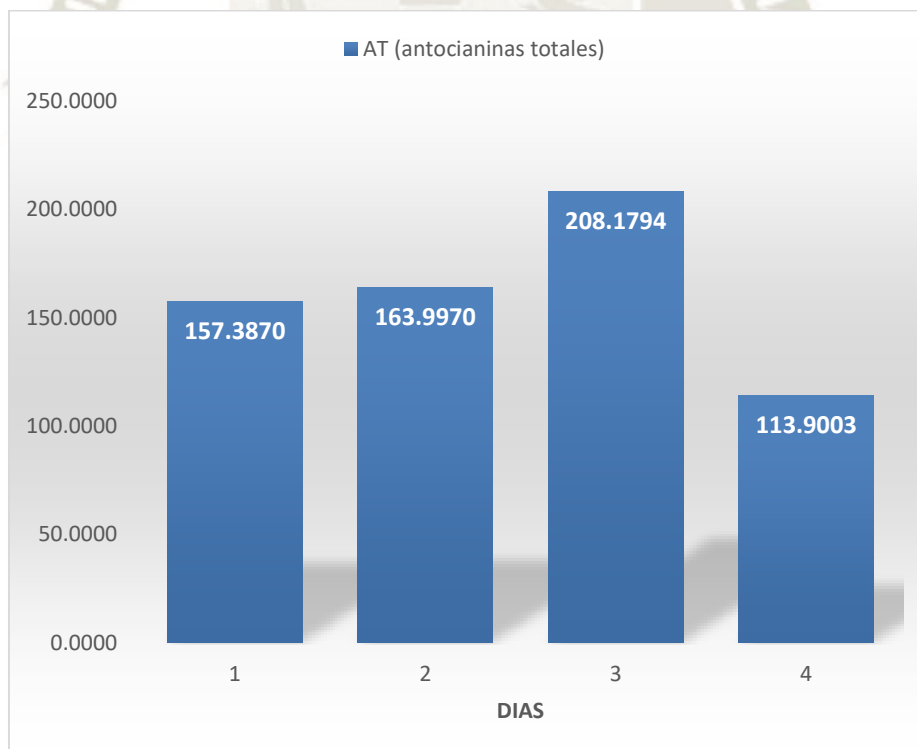


Figura N°18: Contenido de antocianinas totales en *Zea mays L.* (Maíz morado) por días de fermentación.

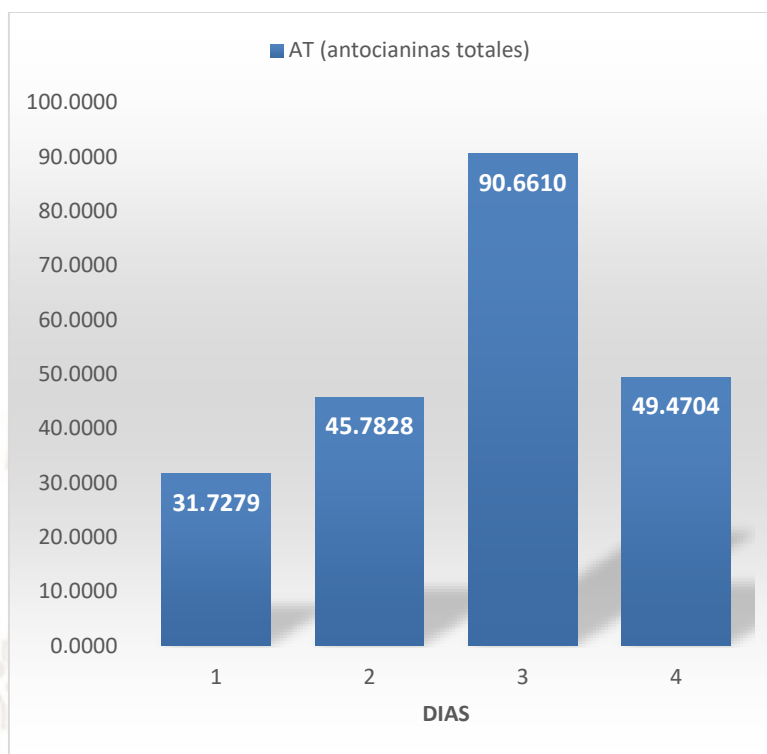


Figura N°19: Contenido de antocianinas totales en *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano) por días de fermentación.

En la evaluación de extracción de las antocianinas totales a diferentes tiempos, como se muestran en las Figuras N° 17, 18 y 19 se observó que la extracción en los 3 extractos (Mashua, Maíz morado y Arándano), se fue incrementando hasta llegar a su pico más alto al tercer día, para luego presentar una disminución.

Un tiempo de extracción adecuado permite que el solvente utilizado en la extracción ingrese y se difunda en las partículas de la Mashua, Maíz morado y Arándano; hasta que las antocianinas entren en contacto, se difundan hacia el solvente, y se produzca la transferencia de éstas desde la superficie de la partícula hacia el seno del solvente extractivo. La transferencia de masa se produce hasta que el conjunto (partícula -solvente) alcance una concentración de antocianinas uniforme¹⁵².

La acción de las levaduras se da a partir de los azúcares presentes en el sustrato a fermentar y así obtener una solución alcohólica que va a permitir la solubilización de las antocianinas;¹⁴¹ al utilizar el método de extracción fermentativa es necesario considerar la acción del agua en la degradación de las antocianinas, 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 antocianinas¹⁴². Por otro lado, las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con el 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.¹⁴³

Por lo tanto, se podría inferir que la capacidad de extracción que brinda el alcohol producido por la *Saccharomyces cerevisiae* es mayor que el proceso de degradación hasta el tercer día, luego, la acción de otras variables como el agua y el oxígeno aumentan el proceso de degradación de antocianinas.

2. Evaluación de la capacidad antioxidante

2.1 Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos fermentados de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

En la Tabla N° 20 se evaluó el porcentaje de actividad antioxidante en los extractos fermentados de Mashua, Maíz morado y Arándano, esta se realizó con una comparación entre el porcentaje de capacidad antioxidante y la concentración del extracto, donde se observó que la concentración y la capacidad antioxidante son directamente proporcionales.

Tabla N°20: Capacidad antioxidante de los extractos fermentados de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua), *Zea mays L.* (Maíz morado) y *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

| Concentración de extractos (g/L) | Capacidad antioxidante (%) | | |
|----------------------------------|----------------------------|-------------|----------|
| | Mashua | Maíz morado | Arándano |
| 4 | 95.7292 | 84.3750 | 75.2083 |
| 3 | 83.8542 | 83.5417 | 69.4792 |
| 2 | 81.6667 | 81.3542 | 54.6875 |
| 1 | 58.7500 | 76.8750 | 51.5625 |

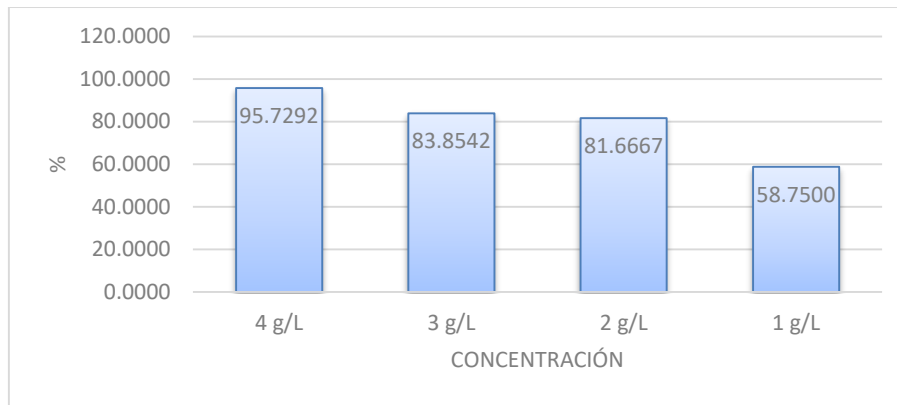


Figura N°20: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)



Figura N°21: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado).

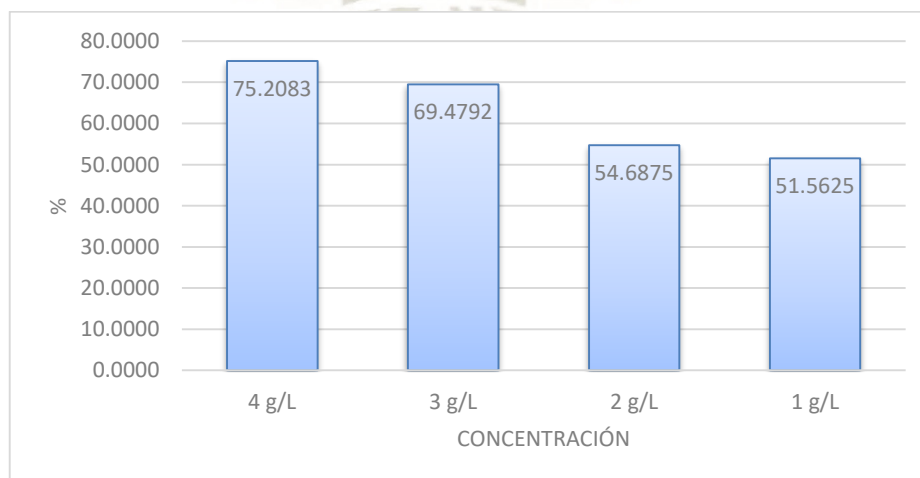


Figura N°22: Capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

En las Figuras N° 20, 21 y 22 se observó que la mayor capacidad antioxidante de las 3 muestras, se dio en la Mashua con un 95,72 % de inhibición del radical DPPH, seguida por el Maíz morado con 84,37% de inhibición del radical DPPH y por último el Arándano con 75, 20% de inhibición del radical DPPH, indicando que la Mashua es un producto que tiene mayor poder antioxidante

2.2 Evaluación de la capacidad antioxidante en equivalentes Trolox.

En la Tabla N°21 se observa los porcentajes de captación de radicales libres con respecto a las concentraciones del Trolox.

Tabla N°21: Porcentajes de captación de radicales libres con respecto a concentraciones de trolox.

| Concentración de Trolox (µg/mL) | Capacidad antioxidante (%) |
|---------------------------------|----------------------------|
| 1 | 36.0417 |
| 2 | 57.2917 |
| 3 | 74.4792 |
| 4 | 85.5208 |

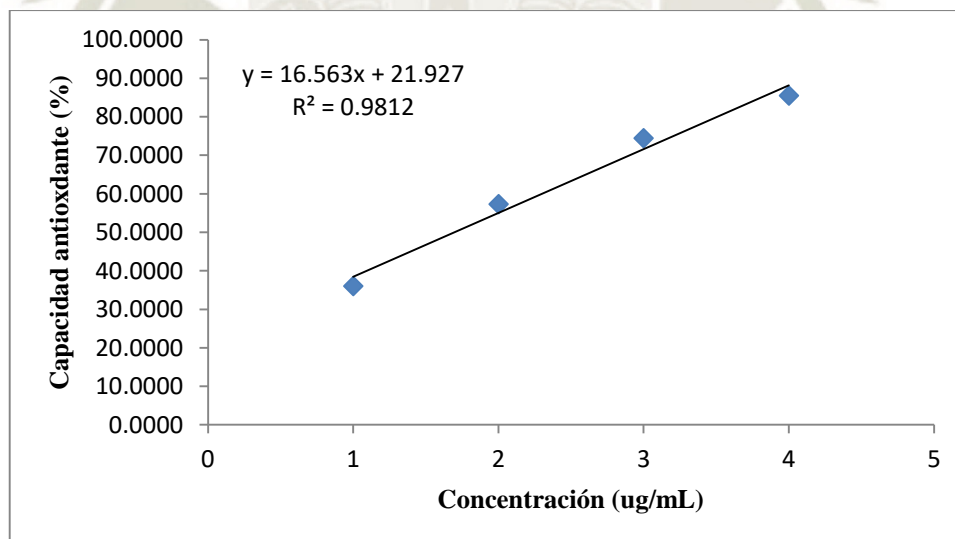


Figura N°23: Capacidad antioxidante de Trolox

En La Figura N° 23 se observa la curva de calibración del Trolox con respecto a sus respectivos porcentajes de captación de radicales libres de DPPH

En la Tabla N°22 podemos observar el porcentaje de actividad antioxidante de las diferentes muestras expresado en mg/eq Trolox en 100g de muestra.

Tabla N°22: Porcentaje de actividad antioxidante de las diferentes muestras expresado en mg/eq Trolox en 100g de muestra.

| Extracto 2 mg /mL | Capacidad antioxidante (%) | mg/eq Trolox en 100 g de muestra |
|------------------------------|-----------------------------------|---|
| Mashua | 81.6667 | 180.342 |
| Maíz morado | 81.3542 | 179.397 |
| Arándano | 54.6875 | 98.896 |

En la Tabla N° 22 se observó el porcentaje de actividad antioxidante de la Mashua, Maíz morado y Arandano expresado en mg/eq Trolox en 100 g de muestra, los cuales también fueron estudiados por Luis A, et al,¹⁴⁷ Actividad antioxidante de *Tropaeolum Tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) y su aplicación como colorante para yogur. Boliávar et al,¹⁴⁸ Estudios estequiométricos y cinéticos de antioxidantes fenólicos de maíz morado andino y papa dulce de pulpa roja. Por último, en el caso del arándano Rodrigues et al,¹⁴⁹ Compuestos fenólicos y actividad antioxidante de cultivares de arándano cultivados en Brasil, los cuales también reportaron la capacidad antioxidante de dichos productos.

Se aplicó la prueba estadística de t-student para evaluar si existe diferencia significativa entre los valores de la Mashua y el Maiz morado, por ser valores cercanos entre si; para esto se tomo los datos de las repeticiones mostrados en la Tabla N° 23.

Tabla N°23: Capacidad antioxidante en los extractos fermentados de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Zea mayz L.* (Maiz morado)

| Repeticiones | Capacidad antioxidante (%) en 2mg/mL de extracto | |
|---------------------|---|--------------------|
| | Mashua | Maiz morado |
| 1ra | 82.1853 | 84.375 |
| 2da | 81.5025 | 79.6875 |
| 3ra | 81.3124 | 80.00 |

El nivel de confianza utilizado fue del 95% ($P \leq 0.05$). El valor P de la prueba F fue de 0.0595 lo que indica que las varianzas son iguales.

En la Tabla N° 24 se muestra los datos de la prueba t suponiendo que las varianzas son iguales.

Tabla N°24: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Zea mayz L.* (Maiz morado).

| | Variable 1 | Variable 2 |
|--------------------------------|------------|------------|
| Media | 81.6667333 | 81.3541667 |
| Observaciones | 3 | 3 |
| Grados de libertad | 4 | |
| Estadístico t | 0.20347496 | |
| P(T<=t) dos colas | 0.84869593 | |
| Valor crítico de t (dos colas) | 2.77644511 | |

El nivel de confianza utilizado para la prueba de t-student fue del 95% ($P \leq 0.05$). el valor P fue de 0.8487, lo que indica que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los datos de la Mashua y el Maiz morado.

3. Evaluación de antocianinas por HPLC

3.1 Evaluación de los tiempos de retención

En la Tabla N°25 se muestra los tiempos de retención de los estándares utilizados: Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido.

Tabla N°25: Tiempos de retención de la Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido.

| Estándar | Tiempo de retención (min) |
|-------------------------|---------------------------|
| Cianidina-3-glucósido | 6,127 |
| Delfinidina-3-glucósido | 5,757 |

3.2 Evaluación de la linealidad

En la Tabla N° 26 y 27 se observan los resultados de área de los picos de la Cianidina-3-glucósido y de la Delfinidina-3-glucósido a 5 diferentes concentraciones y por triplicado. En las Figuras N° 24 y 25 se muestra la regresión lineal de los estándares utilizados: Cianidina-3-glucósido y Delfinidina-3-glucósido en las concentraciones de 2ppm, 4ppm, 6ppm, 8ppm y 10ppm.

Tabla N°26: Linealidad de la Cianidina-3-glucósido

| Cianidina-3-glucósido | |
|------------------------------|-------------|
| Concentración (ppm) | Área |
| 2 | 522957 |
| 4 | 1160404 |
| 6 | 1722773 |
| 8 | 2324496 |
| 10 | 2899612 |

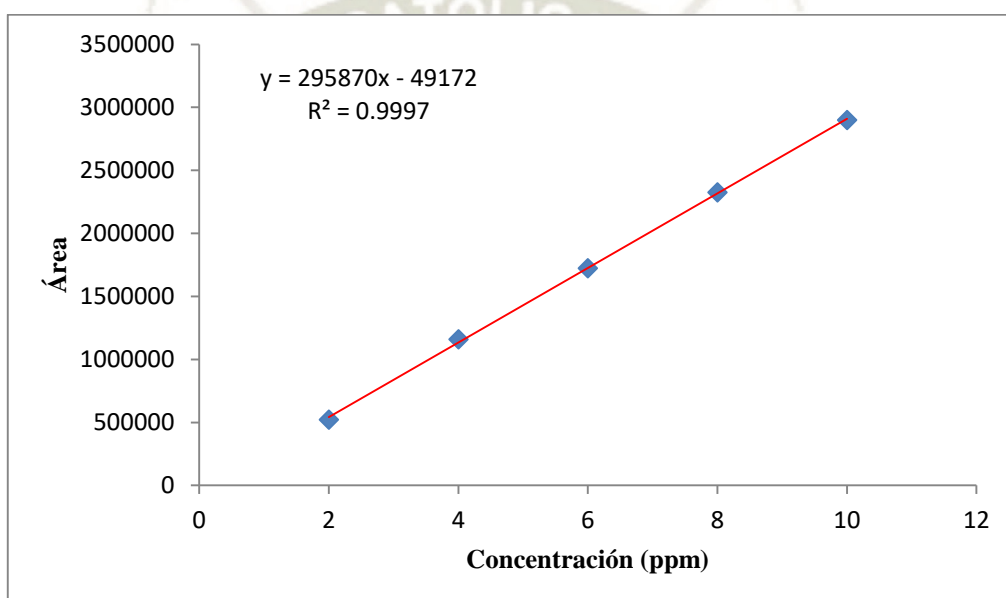


Figura N°24: Linealidad de la Cianidina-3-glucósido.

Tabla N°27: Linealidad de la Delfinidina-3-glucósido.

| Delfinidina-3-glucósido | |
|--------------------------------|-------------|
| Concentración (ppm) | Área |
| 2 | 484423 |
| 4 | 1121055 |
| 6 | 1740761 |
| 8 | 2353008 |
| 10 | 2972577 |

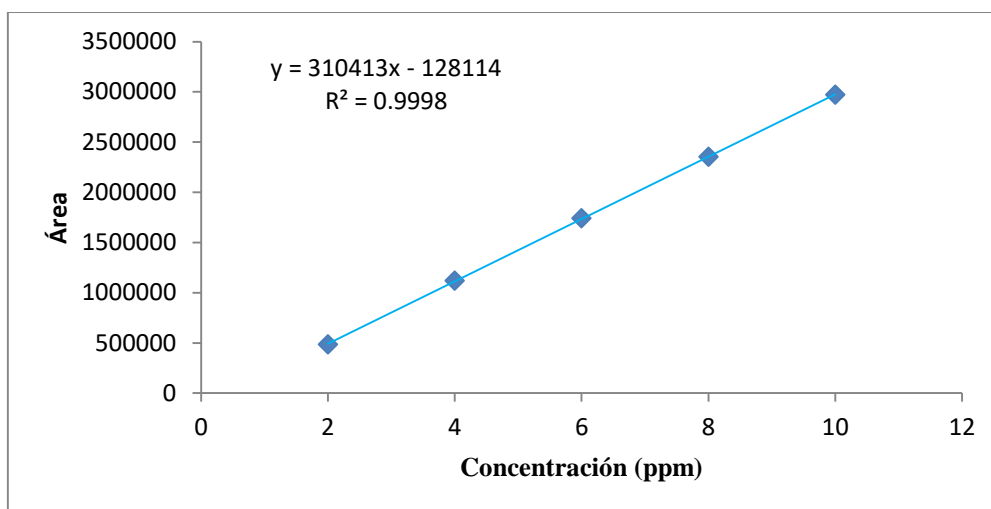


Figura N°25: Linealidad de la Delfinidina-3-glucósido.

En la Tabla N°28 se observan los resultados de estadística de la Cianidina-3-glucósido, donde se observa que el coeficiente de correlación múltiple (relación de X y Y), es cercano a 1 lo que significa una linealidad buena. También el coeficiente de determinación R^2 es cercano a 1 dando confiabilidad del modelo matemático.

Tabla N°28: Estadística de regresión lineal de la Cianidina-3-glucósido.

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|--------------------------------------|-------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0.999923775 |
| Coefficiente de determinación R^2 | 0.999847556 |
| R^2 ajustado | 0.999771333 |
| Error típico | 11361.43152 |
| Observaciones | 4 |

En la Tabla N°29 se observan los resultados de estadística de la Delfinidina-3-glucósido donde podemos observar que el coeficiente de correlación múltiple (relación de X y Y), es cercano a 1 lo que significa una linealidad buena. También el coeficiente de determinación R^2 es cercano a 1 dándonos confiabilidad del modelo matemático.

Tabla N°29: Estadística de regresión lineal de la Delfinidina-3-glucósido

| <i>Estadísticas de la regresión</i> | |
|--------------------------------------|-------------|
| Coefficiente de correlación múltiple | 0.999976298 |
| Coefficiente de determinación R^2 | 0.999952596 |
| R^2 ajustado | 0.999936795 |
| Error típico | 7804.160506 |
| Observaciones | 5 |

3.3 Evaluación de la precisión

3.3.1 Repetibilidad

En las Tablas N° 30 y 31 se observan tres repeticiones a 5 concentraciones diferentes con su correspondiente desviación estándar para luego dar como resultado su coeficiente de variación, la que por norma tiene que ser menor a 6, esto asegura que los análisis realizados presentan una repetibilidad buena.

Esto fue hecho tanto para la Cianidina-3-glucósido como para la Delfinidina-3-glucósido y se observó que, en ninguna de las dos, los valores de su coeficiente de variación (CV) son mayores a 6 dando la seguridad de una repetibilidad dentro de la norma, por lo tanto, aplicable.

Tabla N°30: Repetibilidad en Cianidina-3-glucósido.

| Cianidina-3-glucósido. | | | |
|-------------------------------|-------------|----------------------------|-----------|
| Concentración (ppm) | Área | Desviación Estándar | CV |
| 2 | 522957 | 7880 | 1.51 |
| 4 | 1160404 | 14727 | 1.27 |
| 6 | 1722773 | 15613 | 0.91 |
| 8 | 2324496 | 34419 | 1.48 |
| 10 | 2899612 | 22260 | 0.77 |

Tabla N°31: Evaluación de la repetibilidad en Delfinidina-3-glucósido.

| Delfinidina-3-glucósido | | | |
|--------------------------------|-------------|----------------------------|-----------|
| Concentración (ppm) | Área | Desviación Estándar | CV |
| 2 | 484423 | 20399 | 4.21 |
| 4 | 1121055 | 47861 | 4.27 |
| 6 | 1740761 | 9163 | 0.53 |
| 8 | 2353008 | 38514 | 1.64 |
| 10 | 2972577 | 5687 | 0.19 |

3.3.2 Repetibilidad intermedia

En las Tablas N° 32 y 33 se observa 3 repeticiones a 5 concentraciones las cuales presentan variables (día del análisis, diferente analista y solvente nuevo) a estos datos se realizó una desviación estándar para luego dar como resultado el coeficiente variación

(CV), que por norma debe ser menor a 11 asegurando así que los análisis realizados presentan una reproducibilidad buena.

Esto fue hecho tanto para la Cianidina-3-glucósido como para la Delfinidina-3-glucósido y se observó que para ningún caso los valores de su coeficiente de variación (CV) son mayores a 11, dando la seguridad de una reproducibilidad dentro de la norma por lo tanto aplicable.

Tabla N°32: Repetibilidad en Cianidina-3-glucósido.

| Concentración del estándar (ppm) | Cianidina-3-glucósido (área) | | | | | CV |
|----------------------------------|------------------------------|--------------------|----------------|--------------------|---------------------|------|
| | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Cianidina promedio | Desviación estándar | |
| 2 | 479364 | 513975 | 526190 | 506843 | 24289 | 4.80 |
| 4 | 1113445 | 1169421 | 1143409 | 1142091 | 28011 | 2.45 |
| 6 | 1705440 | 1711771 | 1715906 | 1711039 | 5271 | 0.31 |
| 8 | 2289006 | 2285130 | 2348909 | 2307681 | 35756 | 1.55 |
| 10 | 2869336 | 2874160 | 2909231 | 2884242 | 21775 | 0.75 |

Tabla N°33: Repetibilidad en Delfinidina-3-glucósido.

| Concentración del estándar (ppm) | Delfinidina-3-glucósido (Área) | | | | | CV |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|---------------------|------|
| | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Delfinidina promedio | Desviación estándar | |
| 2 | 505555 | 482866 | 524748 | 504390 | 20965 | 4.16 |
| 4 | 1166485 | 1125593 | 1129396 | 1140491 | 22591 | 1.98 |
| 6 | 1731477 | 1741006 | 1739518 | 1737334 | 5126 | 0.30 |
| 8 | 2380138 | 2369961 | 2365204 | 2371768 | 7629 | 0.32 |
| 10 | 2979088 | 2970061 | 2970029 | 2973059 | 5221 | 0.18 |

3.4 Evaluación de la exactitud

En las Tablas N° 34, 35 y 36 se puede observar la recuperación obtenida para cada una de las muestras, las cuales se encuentran por encima del 75% lo que da la seguridad de que hubo una buena recuperación según la Asociación de Analistas Químicos Oficiales (AOAC), por lo tanto, la exactitud del análisis es considerada dentro de la norma por lo tanto aplicable.

También se observa los espectros del HPLC para cada una de las muestras evaluadas, como se muestra en las Figuras N° 26, 27, 28.

Tabla N°34: Exactitud en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

| Mashua | | | | | |
|--------------------------------|-------------|----------------|-----------|----------------|----------------|
| | | Área | | | Área Promedio |
| Antocianinas en la muestra | Delfinidina | 810649 | 813302 | 791527 | 805159 |
| | Cianidina | 1356663 | 1375356 | 1357982 | 1363334 |
| Estándar puro | Delfinidina | 1121055 | 1121055 | 1121055 | 1121055 |
| | Cianidina | 1160404 | 1160404 | 1160404 | 1160404 |
| Muestra + estándar | Delfinidina | 1914368 | 1912568 | 1858998 | 1895311 |
| | Cianidina | 2503335 | 2486935 | 2490235 | 2493502 |
| Recuperación promedio % | | | | | |
| | Delfinidina | 97.2434 | Cianidina | 97.3944 | |

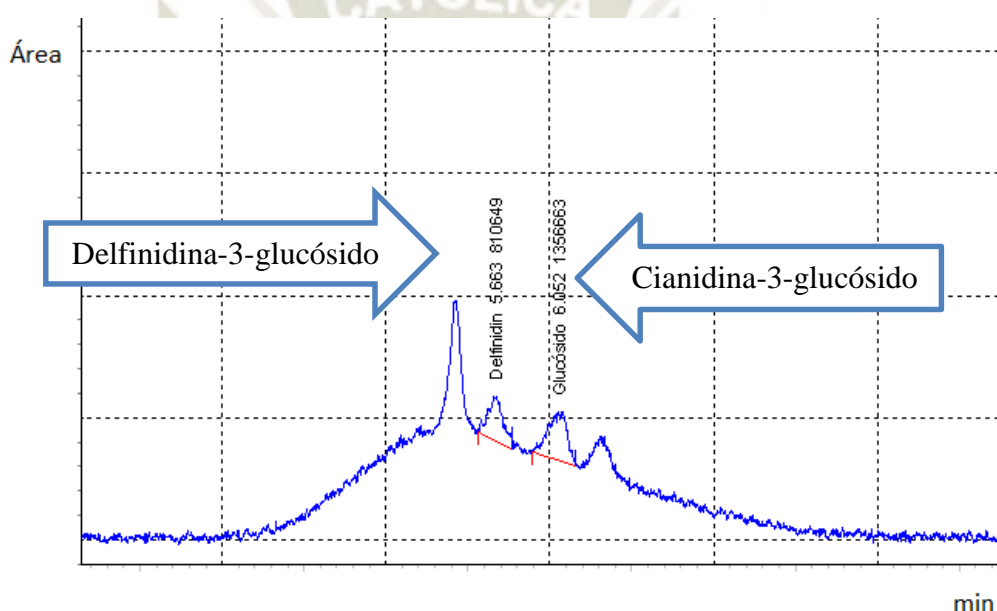


Figura N°26: *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

Tabla N°35: Evaluación de la exactitud en *Zea mays L.* (Maíz morado).

| Maíz morado | | | | | |
|----------------------------------|-------------|------------|-----------|----------------|----------------|
| | | Área | | | Área promedio |
| Antocianinas en la muestra | Delfinidina | ND* | ND* | ND* | ND* |
| | Cianidina | 1806136 | 1828436 | 1813474 | 1816015 |
| Estándar puro | Delfinidina | ND* | ND* | ND* | ND* |
| | Cianidina | 1160404 | 1160404 | 1160404 | 1160404 |
| Muestra + estándar | Delfinidina | ND* | ND* | ND* | ND* |
| | Cianidina | 2935429 | 2939658 | 2962189 | 2945759 |
| Recuperación promedio (%) | | | | | |
| | Delfinidina | ND* | Cianidina | 97.3578 | |

*ND: No se puede definir

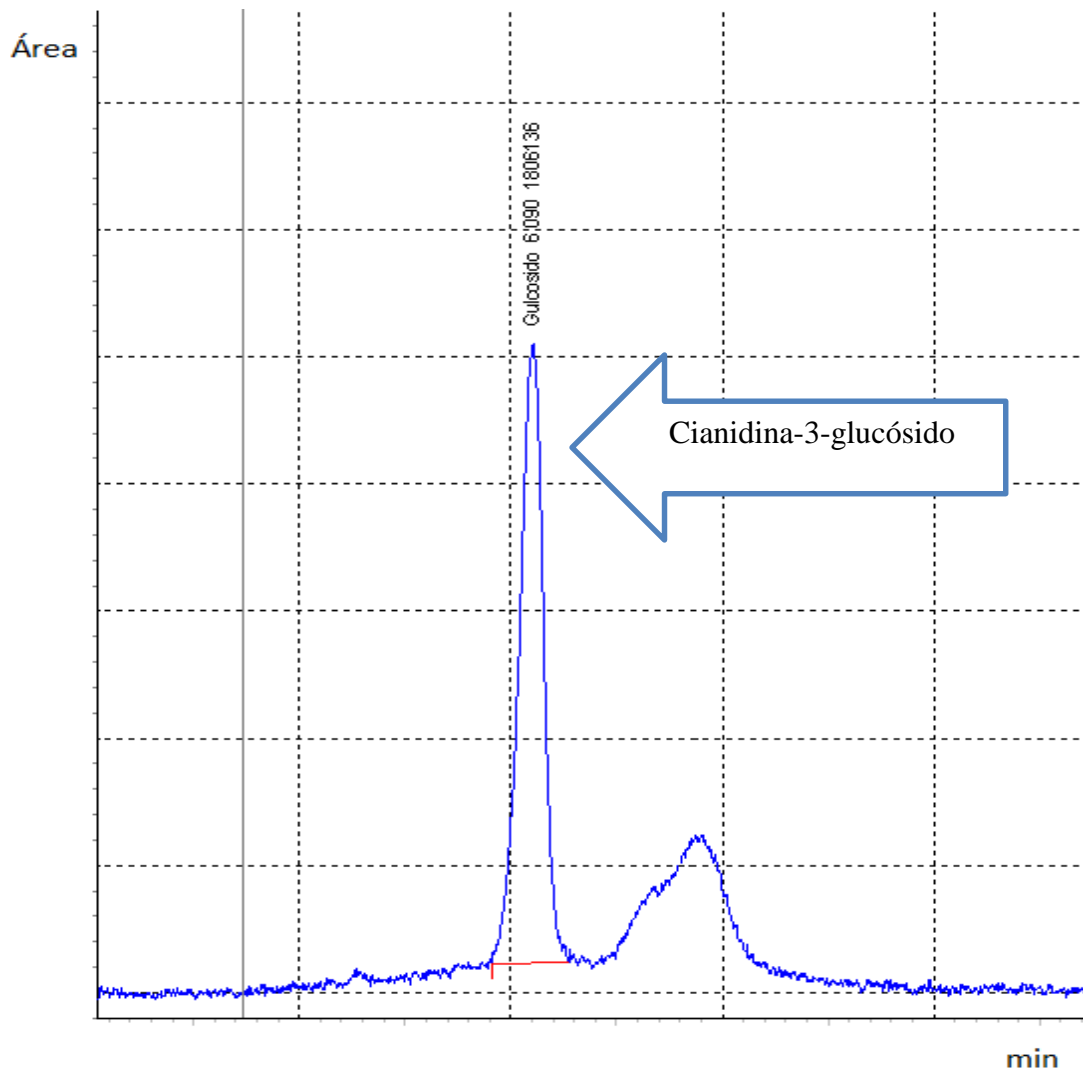


Figura N°27: *Zea mays L.* (Maíz morado).

Tabla N°36: Evaluación de la exactitud en *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

| Arándano | | | | | |
|----------------------------------|-------------|----------------|-----------|----------------|----------------|
| | | Área | | | Área promedio |
| Antocianinas en la muestra | Delfinidina | 2200005 | 2198735 | 2193233 | 2197324 |
| | Cianidina | 1413393 | 1415155 | 1440503 | 1423017 |
| Estándar puro | Delfinidina | 1121055 | 1121055 | 1121055 | 1121055 |
| | Cianidina | 1160404 | 1160404 | 1160404 | 1160404 |
| Muestra + estándar | Delfinidina | 3290268 | 3302589 | 3302588 | 3298482 |
| | Cianidina | 2532568 | 2568963 | 2545869 | 2549133 |
| Recuperación promedio (%) | | | | | |
| | Delfinidina | 98.2251 | Cianidina | 97.0452 | |

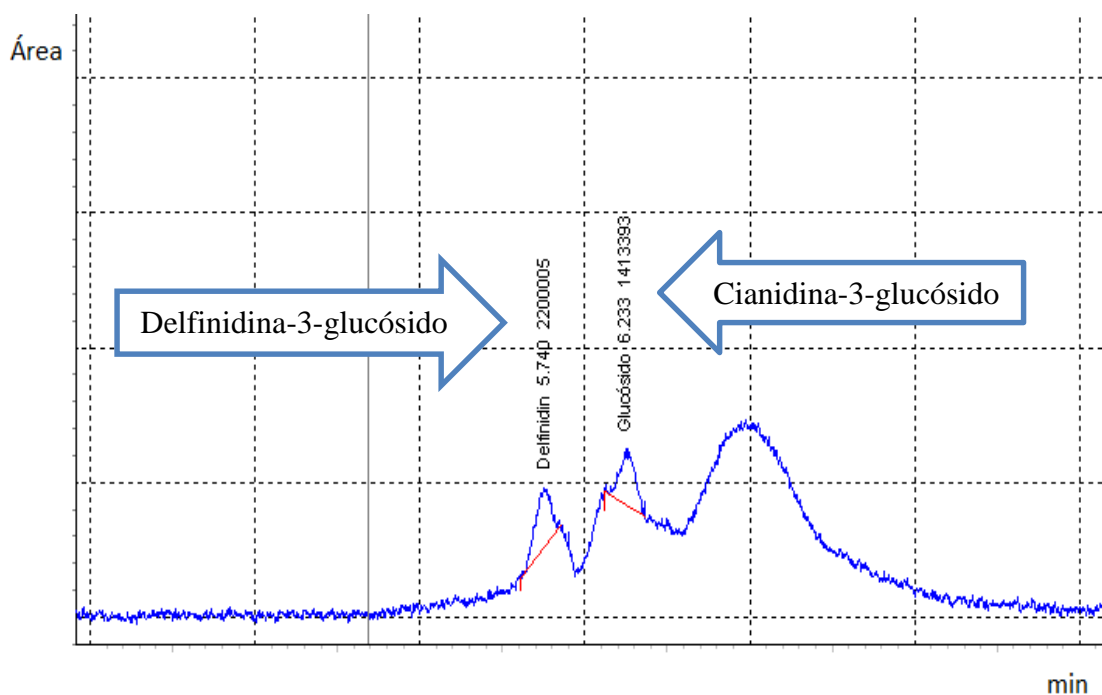


Figura N°28: *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano).

3.5 Evaluación de los límites de detección y cuantificación

En la Tabla N°37 se observa que después de la integración que se realizó entre las concentraciones y áreas de los picos, se obtienen los resultados de las concentraciones de los estándares en las muestras tanto de Mashua, Maíz morado y Arandano. Comparando estos resultados con los de la Tabla N° 38 se puede decir que se encuentran dentro o que son menores que los de límites de detección y de los límites de cuantificación según la Asociación de Analistas Químicos Oficiales (AOAC), por lo tanto, son aceptables.

Tabla N°37 Concentraciones de antocianinas tanto del HPLC como de la extracción

| | | Concentración HPLC (ppm) | Concentración de la extracción (ppm) | Concentración en mg/g de materia prima |
|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------------------|--|
| Mashua | Delfinidina | 3.1227 | 3.1227 | 0.0195 |
| | Cianidina | 4.7683 | 4.7683 | 0.0298 |
| Maíz morado | Delfinidina | ND | ND | ND |
| | Cianidina | 6.3163 | 31.5815 | 0.1973 |
| Arándano | Delfinidina | 7.6008 | 7.6008 | 0.0475 |
| | Cianidina | 4.9768 | 4.9768 | 0.0311 |

Tabla N°38: Límites de detección y cuantificación

| Límite de detección en (ppm) | | Límite de cuantificación (ppm) | |
|------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
| Cianidina | 0.0799 | Cianidina | 0.2663 |
| Delfinidina | 0.1971 | Delfinidina | 0.6571 |

De las tres muestras (Mashua, Maíz Morado y Arándano), sólo en el Maíz morado no se encontró Delfinidina-3-glucósido como se muestra en la Figura N°27, estos resultados coinciden con lo reportado por Lao et al,¹⁴⁴ donde no se encontró dicha antocianina, pero si Cianidina-3-glucósido, esta es representativa en el Maíz morado, se encuentra en mayor proporción que otras antocianinas como la Peonidina y la Pelargonidina,¹⁴⁵ que no fueron usadas en esta determinación.

En la Mashua se encontró las dos antocianinas estudiadas: Delfinidina-3-glucósido y Cianidina-3-glucósido como se muestra en la Figura N°26. Chirinos et al,²⁰ reportaron que la mashua dependiendo de la variedad en estudio, contiene diferentes niveles de antocianinas, evidenciándose un mayor contenido de antocianinas en variedades con tonalidades oscuras, es por eso que en la Mashua negra que fue nuestro objeto de estudio se logró encontrar la presencia de dichas antocianinas. Por último, en el Arándano también se encontró los dos tipos de antocianinas, como se muestra en la Figura N°28 Rihinen et al,¹⁴⁶ reportaron que los compuestos fenólicos más importantes en los frutos de Arándanos son las antocianinas, entre las más representativas están las Cianidinas, Delfinidinas, Petunidinas, Peonidinas y Malvidinas glucosiladas; a diferencia de las hojas que contienen un bajo contenido de antocianinas y en mayor proporción solo la Cianidina. En el estudio no se pudo determinar más antocianinas por el número limitado de estándares

CONCLUSIONES

1. Las variables (pH, T° y t) estudiadas en el proceso, tuvieron influencia en la extracción de las antocianinas: Para *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano), los mejores rendimientos se obtuvieron a pH 3 y 30°C, en cambio para *Zea mays* L. (Maíz morado) fue a pH 2 y 30°C. Para el tiempo de extracción en días se encontró que los 3 productos presentan un máximo rendimiento de antocianinas totales a los 3 días de fermentación por *Saccharomyces cerevisiae*. En el contenido de antocianinas totales (AT) *Zea mays* L. (Maíz morado) presentó 260.607 mg de cianidina/100 mL de extracto, *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) presentó 191.515 mg de cianidina/100 mL de extracto y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) presentó 46.653 mg de cianidina/100 mL de extracto.
2. En cuanto a la capacidad antioxidante se observó que *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) presentó 180.342 mg/eq Trolox en 100 g de muestra, seguido por *Zea mays* L. (Maíz morado) con 179.397 mg/eq Trolox en 100 g de muestra y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) con 98.896 mg/eq Trolox en 100 g de muestra.
3. Mediante el análisis con HPLC se pudo identificar 2 tipos de antocianinas: Cianidina-3-glucósido con un tiempo de retención de 6.127 min y Delfinidina-3-glucósido con un tiempo de retención de 5.757 min; se observó que en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) están presentes ambas antocianinas, mientras que en *Zea mays* L. (Maíz morado) sólo se encuentra la Cianidina-3-glucósido. Para *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) la concentración de Delfinidina-3-glucósido fue de 0.0195 mg/g de materia prima, y para la Cianidina-3-glucósido fue de 0.0298 mg/g de materia prima; para *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano) la concentración de Delfinidina-3-glucósido fue de 0.0475 mg/g de materia prima y para la Cianidina-3-glucósido fue de 0.0311 mg/g de materia prima, por último, para *Zea mays* L. (Maíz morado) la concentración de Cianidina-3-glucósido fue de 0.1973 mg/g de materia prima.

4. La relación que se pudo obtener de las antocianinas totales (AT) con la capacidad antioxidante no fue proporcional ya que *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) a pesar de tener menor cantidad de antocianinas totales que *Zea mays L.* (Maíz morado), presentó una capacidad antioxidante muy similar.



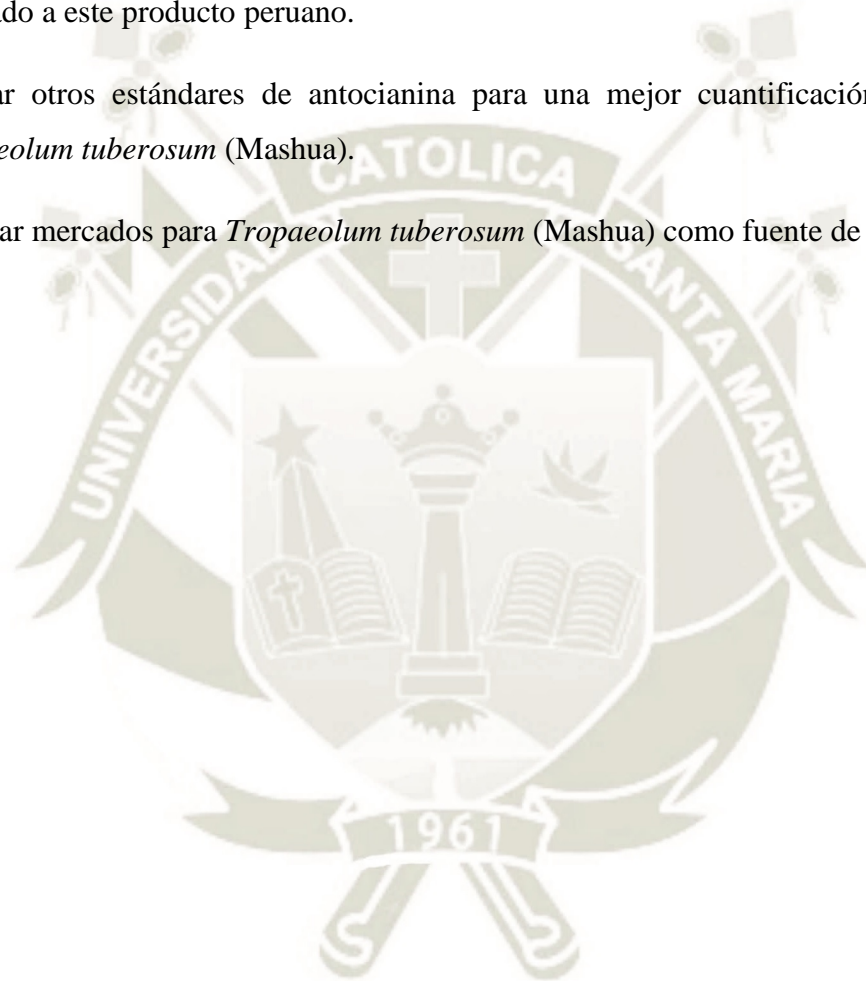
RECOMENDACIONES

Continuar con los estudios de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) y sus propiedades beneficiosas para la salud, así como sus contraindicaciones en el consumo.

Estudiar nuevos procedimientos de extracción y purificación de las antocianinas a partir de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) para su producción industrial y así darle valor agregado a este producto peruano.

Utilizar otros estándares de antocianina para una mejor cuantificación de estas en *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).

Estudiar mercados para *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) como fuente de antocianinas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Prior R, Wu X. Diet antioxidant capacity: relationships to oxidative stress and health. *American Journal of Biomedical Sciences* 2013;5(2):126-139.
- 2) Campos D, Noratto G, Chirinos R., et al. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of andean tuber crops: Native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz&Pavon), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and olluco (*Ullucus tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 2006;86:1481–1488.
- 3) National Research Council, *Roots and tubers, in Lost Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press, Washington, DC; 1989. p. 67–73
- 4) Soria SL, Vega R, Damsteegt VD, McDaniel LL, Kitto SL, Evans TA. Occurrence and partial characterization of a new mechanically transmissible virus in Mashua from the Ecuadorian highlands. *Plant Dis* 1998;82:69–73.
- 5) Arbizu C, Tapia M. 1992. Tubérculos andinos. En: J. Hernández y J. León. (eds.). *Cultivos marginados: otra perspectiva de 1492*. FAO – Producción y protección vegetal 1992; 26:147-161.
- 6) Cárdenas M. *Manual de plantas económicas de Bolivia*. Cochabamba, Bolivia: Imprenta Ichthus; 1989. p. 65-67.
- 7) Robles E. *Origen y evolución de la oca, olluco y mashua*. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú; 1981. p. 19-25.
- 8) Arbizu C. & Vivanco F. s/a. *Descriptores de mashua*. Centro Internacional del Papa. Lima.
- 9) Grau A, Ortega R, Nieto C, Herman M. Mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav.). In Jan, M., & Engels, M., (Vol. Eds.), *Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops*, Vol. 25., International Potato Center, Lima, Peru/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2003.
- 10) Espinoza S, Montenegro M, Álvarez J, Arnao I. Análisis electroforético unidimensional y bidimensional de las proteínas de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua). Centro de investigación de Bioquímica y nutrición, laboratorio de química bioorgánica. UNMSM: Lima; 2002.

- 11) Navas G, Vega De Rojas B, Soriare L. La mashua (*Tropaeolum tuberosum*) fuente potencial de carbohidratos. Escuela Politécnica Nacional. Instituto de investigación Tecnológica. Simposio en carbohidratos; 1993. p. 233-237.
- 12) Pearsall D 1992. The origins of plant cultivation in South America; 1992. p. 173–205 in *The origins of agriculture. An international perspective* (Wesley and P.J. Watson (eds.)), Smithsonian Institution, Washington D.C., USA.
- 13) Terrazas F & Valdivia G. Spatial dynamics of in situ conservation: handling the genetic diversity of Andean tubers in mosaic systems. *Plant Genetic Resources Newsletter*. FAO/IPGRI. 1998;(114): 9-15.
- 14) Espinoza P, Vaca R, Abad J, Crissman CC. Raíces y tubérculos andinos, cultivos marginados en el Ecuador. Situación actual y limitaciones para la producción. Centro Internacional de la Papa-Estación Quito. Departamento de Ciencias Sociales, Quito; 1996. p. 178.
- 15) Manrique I, Arbizu C, Vivanco F, Gonzales R, Ramírez C, Chávez O, et al. *Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú; 2014. p. 122.
- 16) Cadima X, García W, Patiño F. El isaño (*Tropaeolum tuberosum* R&P). Avances en la investigación de un cultivo subutilizado. Documento de trabajo No.24. Fundación PROINPA. Programa Colaborativo de Manejo, Conservación y Uso de la Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos (PBRTAs). Proyecto Papa Andina. Cochabamba; 2003. p. 49.
- 17) Johns T, Kitts WD, Newsome F, Neil Towers GH. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *J. Ethnopharmacol* 1982;5(2):149-161
- 18) Campos D, Noratto G, Chirinos R, Arbizu C, Roca, W, Cisneros-Zevallos L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of andean tuber crops: Native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz&Pavon), oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and olluco (*Ullucus tuberosum*). *Journal of the Science of Food and Agricultural* 2006; 86:1481–1488.
- 19) Chirinos R, Campos D, Arbizu C, Rees JF, Rogez, H, Larondelle Y, et al. Effect of genotype, maturity stage and post-harvest storage on phenolic compounds, carotenoid content and antioxidant capacity, of andean mashua tubers

- (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavon). Journal of the Science of Food and Agricultural 2007; 87:437–446.
- 20) Chirinos R., Campos D, Betalleluz I, Giusti MM., Schwartz SJ, Quingguo T, et al. High-Performance liquid chromatography with photodiode array detection (HPLC-DAD)/ HPLC–Mass Spectrometry (MS) profiling of anthocyanins from andean mashua tubers (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) and their contribution to the overall antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2006; 54:7089–7097.
- 21) Palacios V. Plantas medicinales nativas del Perú. Lima: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; 1997.
- 22) Takhtajan A. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). The botanical review. New York, Estados Unidos; 1980.
- 23) Llanos CM. El maíz su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid, España; 1984.
- 24) Tocagni. El maíz. Buenos aires- argentina. Editorial albatros; 1982.
- 25) Manrique A. El maíz en el Perú. 2 ed. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima-Perú; 1997. p. 362.
- 26) Manrique A. El maíz morado peruano (*Zea mays* L. amilaceae st.) INIA-folleto N° 2-99 Lima – Perú; 1999. p. 24.
- 27) Sevilla R, Valdez Y. Estudio de factibilidad del cultivo de maíz morado. Fondo de Promoción y Exportación (FOPEX). Lima, Perú; 1985.
- 28) Abanto W, Medina A, Injante P. Boletín Informativo -INIA, maíz INIA 601. Programa Nacional de Innovación Agraria en maíz. EEA baños del Inca Cajamarca; 2014.
- 29) Fernandez NA. Estudio de la extracción y pre - purificación de antocianinas de maíz morado (*Zea mays* L.). Tesis Ing. En Industrias Alimentarias. UNALM. Lima- Perú; 1995. p. 116.
- 30) Tapia M, Fries A. Guía de campo de los cultivos andinos. FAO y ANPE. Lima-Perú; 2007. p. 209.
- 31) Benz BF. Diversidad y distribución prehispánica del maíz mexicano. Arqueología mexicana 1997;5(25):17-23.
- 32) Grobman A, Bonavia D, Dillehay T, Piperno D, Iriarte J, Holst I. Preceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 2012;109:1755-1759.

- 33) Otiniano V. Actividad antioxidante de antocianinas presentes en la coronta y grano de maíz (*Zea mays* L.) variedad morada nativa cultivada en la ciudad de Trujillo. Tesis para optar el título de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Cesar Vallejo; 2012. p.74.
- 34) Salinas Y, García C, Coutiño B, Vidal V. Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz. *Rev. Fitotec. Mex.* 2013;285-294.
- 35) Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry* 2005; 100:956-963.
- 36) Zapata S. Colorantes naturales. Exportación de productos Procesados. *Agroenfoque.* Lima - Perú 1996;83: 40 - 43.
- 37) Chicbizola J, López E, Navarro JM, Salinas F. Plan de negocios: "acopio, procesamiento y exportación de maíz morado". Trabajo aplicativo final presentado. EPG. UAP. Arequipa, Perú; 2007. p. 115.
- 38) Muñoz C. Arándano: variedades y su propagación. In Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Estación experimental Carillanca. El cultivo del arándano. Temuco, Chile. 30 nov-2 dic. 1998;53-56.
- 39) Hancock J, Draper A. Blueberry culture in North América. *Hort Science* 1989;24(4):551-556.
- 40) Eck P. Childers N. Blueberry Culture. USA. New Brunswick: Rutgers University; 1989. p. 378.
- 41) Buzeta A. Arándanos. In: Chile: Berries para el 2000. Fundación Chile. Santiago, Chile 1997;53-88.
- 42) Nunes MCN. Color atlas of quality of fruits and vegetables, 2a ed. USA: Blackwell Publishing; 2008.
- 43) Pritts M, Hancock JF. Blueberry growth and development. En: *Highbush Blueberry Production Guide.* New York: NRAES; 1992
- 44) Cronquist A. An Integrated system of clasification of flowering plants. US, University Press. 1981. p. 1,262.
- 45) Sudsuki F. Frutales Menores: Nuevas Alternativas de Cultivo. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Santiago. 1993. p. 286.
- 46) Moore JN. Cultivars, breeding, and culture of blueberries in North America. *Acta Hort. (ISHS)* 1994; 11-16.
- 47) Medel F. Arbustos Frutales. CORFO-UACH. Santiago; 1982.

- 48) Allende J. Análisis Comercial y Visión General del Arándano en Chile. (ASOEX) Asociación de exportadores de Chile. Berries, Arándano – Frambuesa; 2005.
- 49) Navindra P. Recent trends and advances in berry health benefits Research. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2010;58:3869–3870.
- 50) Kalt W, Ryan D, Duy J, Prior R, Ehlenfeldt M, Vander Kloet S. Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp). Journal of Agricultural and Food Chemistry 2001;49: 4761–4767.
- 51) Prior R, Cao G, Martin A, Sofic E, Mcewen J, O'Brien C, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* Species, Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998; 46:2686-2693.
- 52) Heinonen IM, Meyer AS, Frankel, EN. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1998; 46:4107-4112.
- 53) Singh M, Arseneault M, Sanderson T, Murthy V, Ramassamy C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008; 56:4855-4873.
- 54) Dirección General De Políticas Agrarias Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria Primera Edición – Diciembre; 2016
- 55) López J. Los alimentos funcionales: Importancia y aplicaciones. Escuela agrícola Panamericana Zamora Chile; 2008
- 56) Clifford MN. Sensory and dietary properties of phenols. Proceeding of the 16th international conference of grape polyphenols 199216(11): 18-23
- 57) Jimenez M, Zambrano M, Aguilar, M. Estabilidad de Pigmentos en frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. Inf. tecnol. 2004;15(3):1-6.
- 58) Cook N, Samman S. Flavonoids: Chemistry, Metabolism, Cardioprotective effects, and Dietary Sources. J. Nutr. Biochem. 2006; 7:66-67.
- 59) Berra BD, Cortesi N, Fedeli E, Rasetti M, Galli G. Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processe of cholesterol in human LDL. Rivista italiana Sost Grasse 1995; 72:285-291

- 60) Decker EA. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutritional Reviews*. 1997;55(1): 396-398
- 61) Bravo L, Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutrition reviews* 1998;56:317-333
- 62) Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile, *J. Sci. Food Agri*. 2000, 80, 985-1012
- 63) Harborne. General procedures and measurement of total phenolics. *Methods in plant biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics*, Academic Press, London; 1989. p. 1-28
- 64) Shahidi F, Naczki M. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL. EUA 2004:1-16
- 65) Martínez-Valverde I, Periago M, ROS G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Arch. Latin. Nutric*. 2007; 50:5-18.
- 66) Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* 2006;4(1):161-172.
- 67) Mesa A. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en alguna especie del género *Calophyllum*. *Rev. Cub. Plant. Med*. 2010;15(2):13-26.
- 68) Puertas M, Gomez L, Saenz J. Capacidad antioxidante in vitro de fracciones de hojas de *Piper peltatum* L. *Rev cubana Plant Med*. 2009;14(2):1- 5
- 69) Martínez V, Periago I, Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivo latinoamericano de nutrición* 2000;50(1): 1-19
- 70) Murillo E, Lombo O, Tique M, Mendez J. Potencial antioxidante de *Bauhinia Kalbreyeri* Harms. *Inf.tecnol*. 2007;18(6):65-74
- 71) Duran D, Trujillo Y. Estudio comparativo del contenido fenólico de vinos tintos colombianos e importados. *Vitae* 2008;15(1):1-9.
- 72) Strack D, Wray V. Anthocyanins. En *Methods in Plant Biochemistry*. Vol I. *Plant Phenolics*. H. B. Harborne, Academic Press 1989:325-356.
- 73) Malacrida C, Da Mota S. Compuestos fenólicos totales y antocianinas en jugo de uvas. *Cienc. Tecnol. Aliment*. 2005;25(4):659-664.
- 74) Garzón GA. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica colombiana* 2008;13: 27–36.

- 75) Shipp J, Abdel-Aal SM. Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients. *The Open Food Science Journal*, 2010;4:7-22.
- 76) Wang H, Cao G, Prior R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.* 1997; 45(2):304-309.
- 77) Burin B, Falcao L, Valdemoro L. Color, contenido fenólico y actividad antioxidante del jugo de uva. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 2010;30(4):1-6.
- 78) Springob K, Nakajima Ji, Yamazaki M, Saito K. Recent advances in the Biosynthesis and Accumulation of Anthocyanins. *Nat Prod Rep.* 2003; 20:288-303.
- 79) Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Food Science and Nutrition* 2000; 40:173-289.
- 80) Wrolstad R. Anthocyanins. In: Lauro GJ, Francis FJ, editors. *Natural Food Colorants*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, Inc.; 2000. p. 237-252.
- 81) Moldovan B, David L, Chişbora C, Cimpoiu C. Degradation kinetics of anthocyanins from european cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit extracts. Effects of temperature, pH and storage solvent. *Molecules* 2012; 17:11655-11666.
- 82) Bordignon CL Jr, Francescato V, Nienow AA, Calvete E, Reginatto FH. Influência do pH da solução extrativa no teor de antocianinas em frutos de morango. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2009;29: 183-188.
- 83) Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* 2009;113: 859–871.
- 84) Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jameel R, Zare S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition* 2006;5:90-92.
- 85) Aguilera M, Reza MC, Chew RG, Meza JA. Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* 2006; 8:16-22.
- 86) Min-Sheng S, Po-Jung Ch. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry* 2007;104: 182–187.
- 87) Fennema OR. *Química de los Alimentos*, 2a ed. Zaragoza: Acribia SA, 2000.

- 88) Gutierrez A, Quispe F, Arroyo A, Córdova A, Jurado B, Santiago I, et al. Extracción de antocianinas de las corontas de *Zea mays L.* “Maíz morado”. *Ciencia e Investigación* 2009;12: 64-74.
- 89) Fan G, Han Y, Gu Z, Che D. Optimizing conditions for anthocyanins extraction from purple sweet potato using response surface methodology (RSM), *LWT - Food Science and Technology* 2008;⁴¹:155–160
- 90) Cacace JE, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 2003; 68:240-248.
- 91) Laleh GH, Frydoonfar H, Heidary R, Jameel R, Zare S. The effect of light, temperature, pH and species on stability of anthocyanin pigments in four berberis species. *Pakistan Journal of Nutrition* 2006;5: 90-92.
- 92) Devi SP, Saravanakumar M, Mohandas S. The effects of temperatura and pH on stability of anthocyanins from red sorghum (*Sorghum bicolor*) bran. *African Journal of Food Science* 2012; 6:567-573
- 93) Pereira C, Ramos PV, Zapata CP, Tessaro IC, Ferreira LD. Degradation kinetics of anthocyanin in blueberry juice during thermal treatment. *Food Science* 2010;75: 173-176
- 94) Wang WD, Xu SY. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering* 2007; 82:271-275
- 95) Ferreira E, Stringheta C, Cano M. Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits. *Ciencia e Investigación Agraria* 2007; 34:115-120.
- 96) Astiasarán AI, Las Heras AB, Ariño PAH, Martínez HJA. *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos, 2003.
- 97) Prado SC, Hernández M, Mogica-del Ángel M, Moreno M, Preciado F. Incidencia de hipersensibilidad a colorantes artificiales de los alimentos en un grupo de estudiantes de medicina. *Pediatría de México* 2012; 14:172-175.
- 98) Restrepo M. Sustitución de colorantes en alimentos. *Revista Lasallista de Investigación* 2007;4: 35-39.
- 99) Silva EM, Rogez H, Larondelle Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 2007;55: 381–387.
- 100) Gil A. *Tratado de nutrición*, 2a ed. Madrid: Médica Panamericana, 2010.
- 101) Riva R. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current science* 2007;92: 916-925

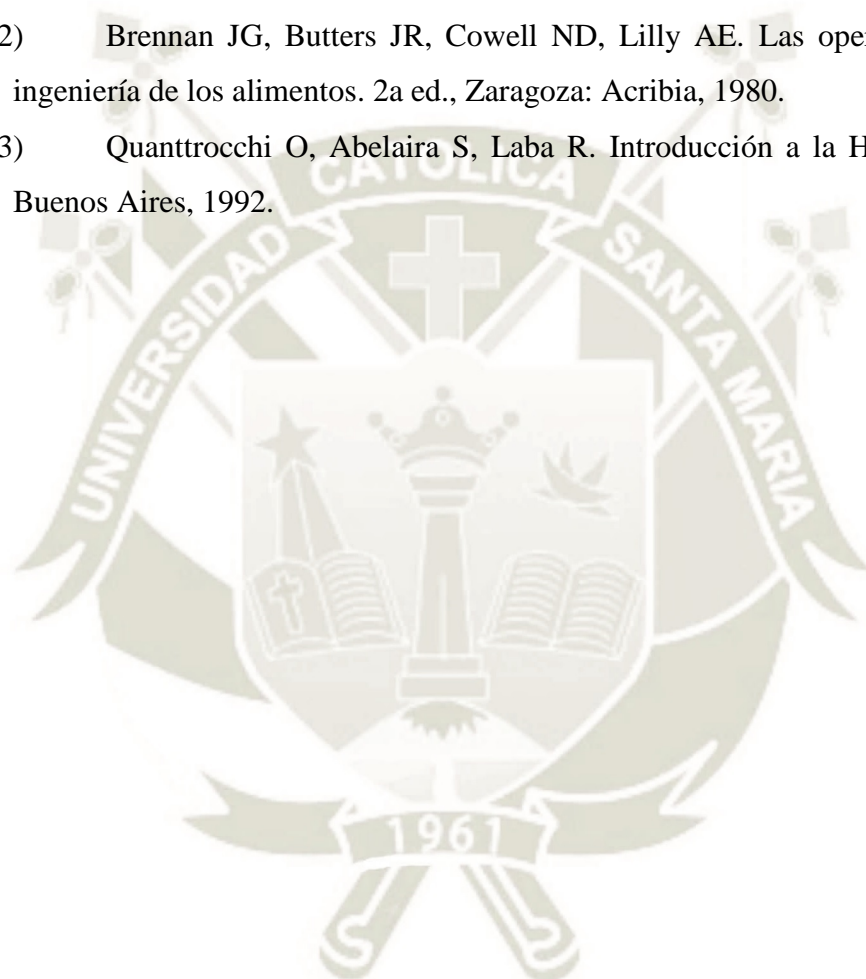
- 102) Bridgers EN, Chinn MS, Truong VD. Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweetpotatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops and Products* 2010; 32:613–620.
- 103) Faria A, Oliviera J, Neves P, Gameiro P, Santos-Buelga C, De Freitas V, Mateus N. Antioxidant Properties of Prepared Blueberry (*Vaccinium myrtillus*) Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005;53: 6896-6902
- 104) Sánchez-Moreno C. Compuestos polifenólicos: efectos fisiológicos. Actividad antioxidante. *Alimentaria.*, ene-feb. 2002:29-40
- 105) Youngson R. ¿Qué son los radicales libres? En: *Antioxidantes y radicales libres*. Madrid: Acirbia, 2004
- 106) Organización Panamericana de la Salud. Enfermedades producidas por radicales libres. *Rev. Panam. Salu. Public.* 1997;1(5):399-400.
- 107) Ferramola A, Sancovich H. Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel. *Rev. Argent. Dermatol.* 2006; 87(2):113-120
- 108) Ferrer Y, Martínez G, Leroy D. El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. *Rev. Cub. Farm.* 2009; 43(3):1-5
- 109) Zorrilla A. El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 2002; 21(3):234-237.
- 110) López-Alarcón C, Denicolab A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 2013;763: 1-10.
- 111) Venero J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cub. Med. Milit.* 2002;31(2):126-136
- 112) Gutierrez A, Ledesma L, García I, Grajales O. Capacidad antioxidante total en alimentos convencionales y regionales de Chiapas, México. *Rev. Cub. Salu. Public.* 2007;33(1):1-4.
- 113) Bagchi D, Sen CK, Bagchi M, Atalay M. Antiangiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69:75–80.
- 114) Ramirez-Tortosa C, Andersen OM, Gardner PT, Morrice PC, Wood SG, Duthie SJ, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Radical Biology & Medicine* 2001; 31:1033-1037.

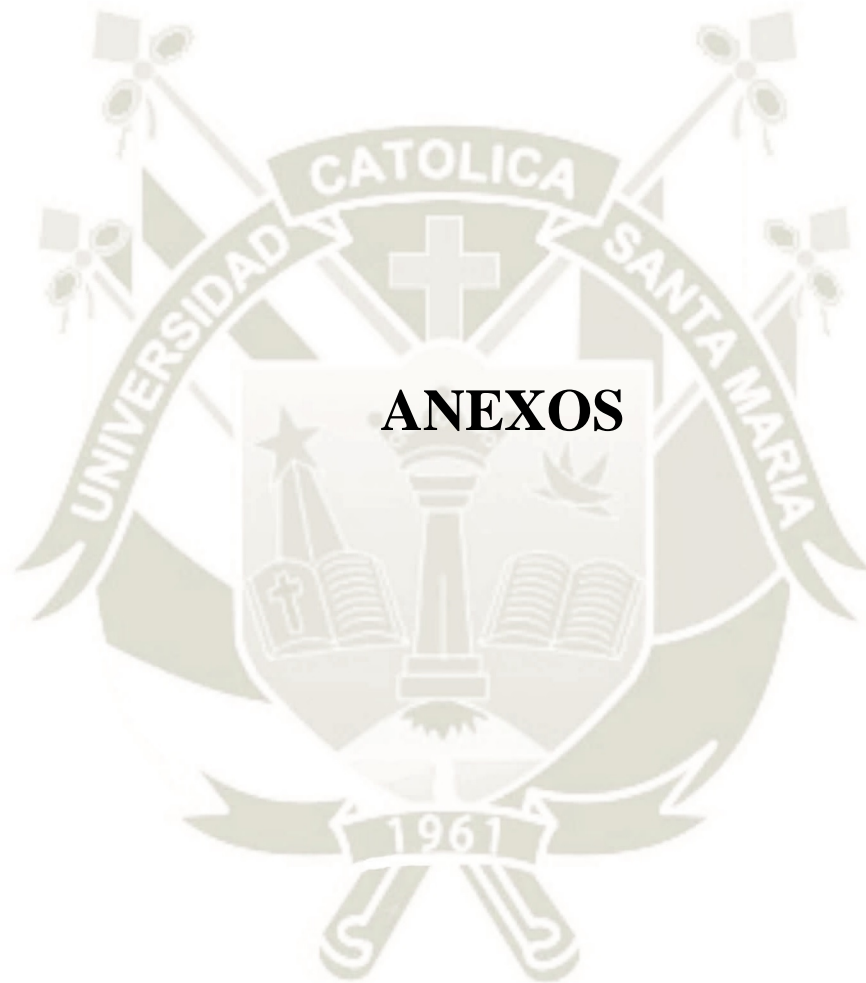
- 115) Yean-Yean S, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry* 2004;88: 411-417.
- 116) Connor AM, Luby JJ, Hancock JF, Berkheimer S, Hanson EJ. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during coltemperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002;50: 893-898
- 117) Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-Glucoside and Cyanidin-3,5-Diglucoside, Into Rats and Humans. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:1083-1091.
- 118) Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated from an Italian Red Wine. *J Agric Food Chem.* 1998;46 (2),361-367
- 119) St. Leger as, Cochrane AI, Moore F. Factors Associated with Cardiac Mortality in Developed Countries with Particular Reference to the Consumption of Wines. *Lancet.* 1979; 1:1017-1020
- 120) Hagiwara A, Yoshino H, Ichiharam T, Kawabe M, Tamano S, Aoki H, et al. Prevention by Natural Food Anthocyanins, Purple Sweet Potato Color and Red Cabbage Color, of 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-B] Pyridine (Phip)-Associated Colorectal Carcinogenesis in Rats. *J Toxicol Sci.* 2002; 27:57-68.
- 121) Koide T, Kamei, H, Hashimoto Y, Kojima T, Hasegawa M. Antitumor Effect of Anthocyanin Fractions Extracted from Red Soybeans and Red Beans in vitro and in vivo. *Cancer Biother Radio.* 1997;12(4):277-280
- 122) Kamei H, Hashimoto Y, Koide T, Kojima T, Hasegawa M. Anti-Tumor Effect of Methanol Extracts from Red and White Wines. *Cancer Biother Radiopharm.* 1998;13(6):447-52.
- 123) Wang J, Mazza G. Inhibitory Effects of Anthocyanins and Other Phenolic Compounds on Nitric Oxide Production in LPS/IFN Gamma-Activated RAW 264.7 Macrophages. *J Agric Food Chem.* 2002; 50:850-857
- 124) Perossini M, Guidi G, Chiellini S, Siravo D. Studio Clinico Sull'impeigo Degli Antocianisidi del Miritillo (Tegens) nel Trattamento Delle Microangiopathi Retiniche di Tipo Diabetico ed Ipertensivo. *Ottal Clin Ocul.* 1987; 113:1173-90.
- 125) Ohgami K, Ilieva I, Shiratori K, Koyama Y, Jin Xh, Yoshida K. et al., 2005. Anti-inflammatory Effects of Aronia Extract on Rat Endotoxin-Induced Uveitis. *Inv Opht Vis Sci.* 2005; 46:275-281.

- 126) Giusti MM, Wrolstad RE. Unit F1.2.:1-13. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. Wrolstad. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: Wiley, 2001
- 127) Wrolstad RE. Color and pigment analyses in fruit products. Agricultural experiment station, Oregon State University, Station Bulletin 624, 1993.
- 128) Wrolstad RE, Durst RW, Lee J. Tracking colour and pigment changes in anthocyanins products. Food Science & Technology 2005;16: 423–428.
- 129) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 1995;22: 25-30.
- 130) Chang R. Reacciones químicas. En: Química 4^a ed. Mc Graw-Hill Interamericana 1992. p.104-117
- 131) Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. II Alteraciones oxidativas en las macromoléculas biológicas. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. ENE Ediciones 1997. p. 91-104.
- 132) Roche E, Romero-Alvira D. Introducción a la bioquímica y citotoxicidad del desequilibrio oxidativo. I) Especies activas del oxígeno. Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. ENE Ediciones 1997. p. 55-88.
- 133) Veiga E, Aguilar JA, Clavo B, Llanes L. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. Análisis Clínicos 1997; 22: 201-216.
- 134) Zamora JD. Antioxidants: micronutrients fighting for health. Rev Chil Nutr. 2007; 34: 1-11.
- 135) Lademann J, Patzelt A, Schanzer S, Richter H, Meinke MC, Sterry W, et al. Uptake of antioxidants by natural nutrition and supplementation: pros and cons from the dermatological point of view. Skin Pharmacol Physiol 2011; 24 (5):269-73.
- 136) Robbins D, Zhao Y. The role of manganese superoxide dismutase in skin cancer. Enzyme Res. 2011; 2011: 1-7.

- 137) Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. Radical Scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta* 2007;230-235.
- 138) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol.* 1995;28(1):25-30.
- 139) Blois MS. Antioxidant determination by use of a stable free radical. *Nature.* 1958; 181:1199-1200.
- 140) Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.* 1995; 20: 25-30.
- 141) Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 2000; 16: 675-729.
- 142) Kopjar M, Piližota V. Copigmentation effect of phenolic compounds on red currant juice anthocyanins during storage. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2009;1: 16-20
- 143) Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Academic dissertation. University of Helsinki. Department of Applied Chemistry and Microbiology Food Chemistry Division. 2005.
- 144) Lao F, Giusti M. Quantification of Purple Corn (*Zea mays* L.) Anthocyanins Using Spectrophotometric and HPLC Approaches: Method Comparison and Correlation. *Food Anal. Methods* 2015.
- 145) Yang Z, Zhai W. Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2010;11:470–476
- 146) Riihinen K, Jaakola L, Karenlampi S, Hohtola A. Organ-specific distribution of phenolic compounds in bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and northblue blueberry (*Vaccinium corymbosum* x *V. angustifolium*). *Food Chemistry* 2008;110;156–160.
- 147) Inostroza L, Castro A, Hernández E, Carhuapoma M, Yuli R, Collado A, et al. Actividad antioxidante de *Tropaeolum Tuberosum* Ruiz & Pavón (Mashua) y su aplicación como colorante para yogur. *Ciencia e Investigación* 2015;18(2): 83-89.
- 148) Boliávar A, Cisneros-Zevallos L. Stoichiometric and Kinetic Studies of Phenolic Antioxidants from Andean Purple Corn and Red-Fleshed Sweetpotato. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51: 3313–3319.

- 149) Rodrigues E, Poerner N, Rockenbach I, Gonzaga L, Mendes, Fett R. Phenolic compounds and antioxidant activity of blueberry cultivars grown in Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas 2011;31(4): 911-917.
- 150) Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*, 3a ed. London Nueva York: Springer, 2009.
- 151) Sayyar S, Abidin ZZ, Yunus R, Muhammad A. Extraction of oil from jatropha seeds-Optimization and kinetics. *American Journal of Applied Sciences*,2009;6:1390-1395.
- 152) Brennan JG, Butters JR, Cowell ND, Lilly AE. *Las operaciones de la ingeniería de los alimentos*. 2a ed., Zaragoza: Acribia, 1980.
- 153) Quantrocchi O, Abelaira S, Laba R. *Introducción a la HPLC*. 1ra ed., Buenos Aires, 1992.





MATERIA PRIMA

Preparación del inóculo



Figura N°1: Pesado de la Mashua para el inóculo



Figura N° 2: levadura liofilizada



Figura N° 3: inóculo de las tres plantas después de las 24 horas

EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS



Figura N° 4: diferentes buffers para extracción de antocianinas



Figura N°5: envasado de las muestras de Mashua, Maíz morado y Arandano a diferentes pH para ser llevados a temperaturas de evaluación



Figura N°6 diseño del termostato casero (termostato de pecera para la T°, aireador para distribuir equitativamente el agua caliente, papel aluminio para el ambiente oscuro)



Figura N°7: se llevó a centrifuga por espacio de 20 min cada una de las muestras para su posterior análisis



Figura N°8: se llevó al espectro y se midió a dos longitudes de onda a 510 nm y a 700 nm



Figuras N° 9: Se observa las diferentes tonalidades a diferentes pH 4,5 y pH 1 respectivamente

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

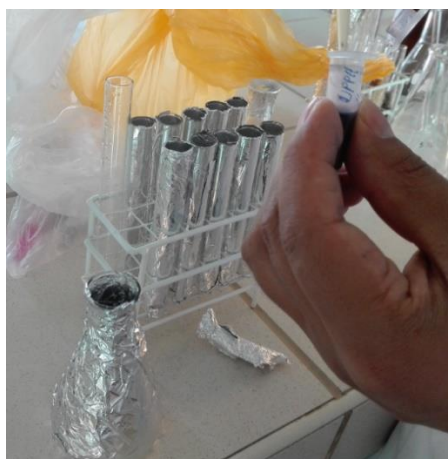


Figura N°10: Se procedió a evaluar la capacidad antioxidante con el método del DPPH



Figura N° 11: Extracto de antociana lista para reacción con el DPPH



Figura N° 12: Se mantuvo en oscuridad por espacio de 30 min para que reaccione



Figura N° 13: Es llevado al espectrofotómetro para su medición

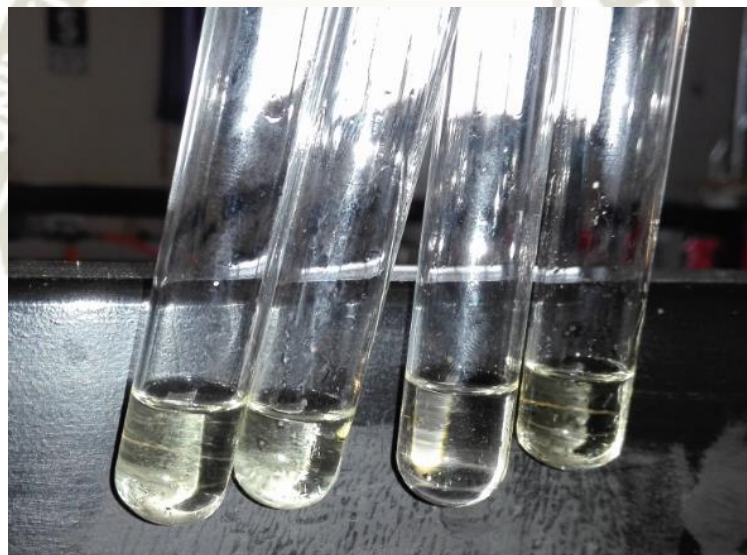
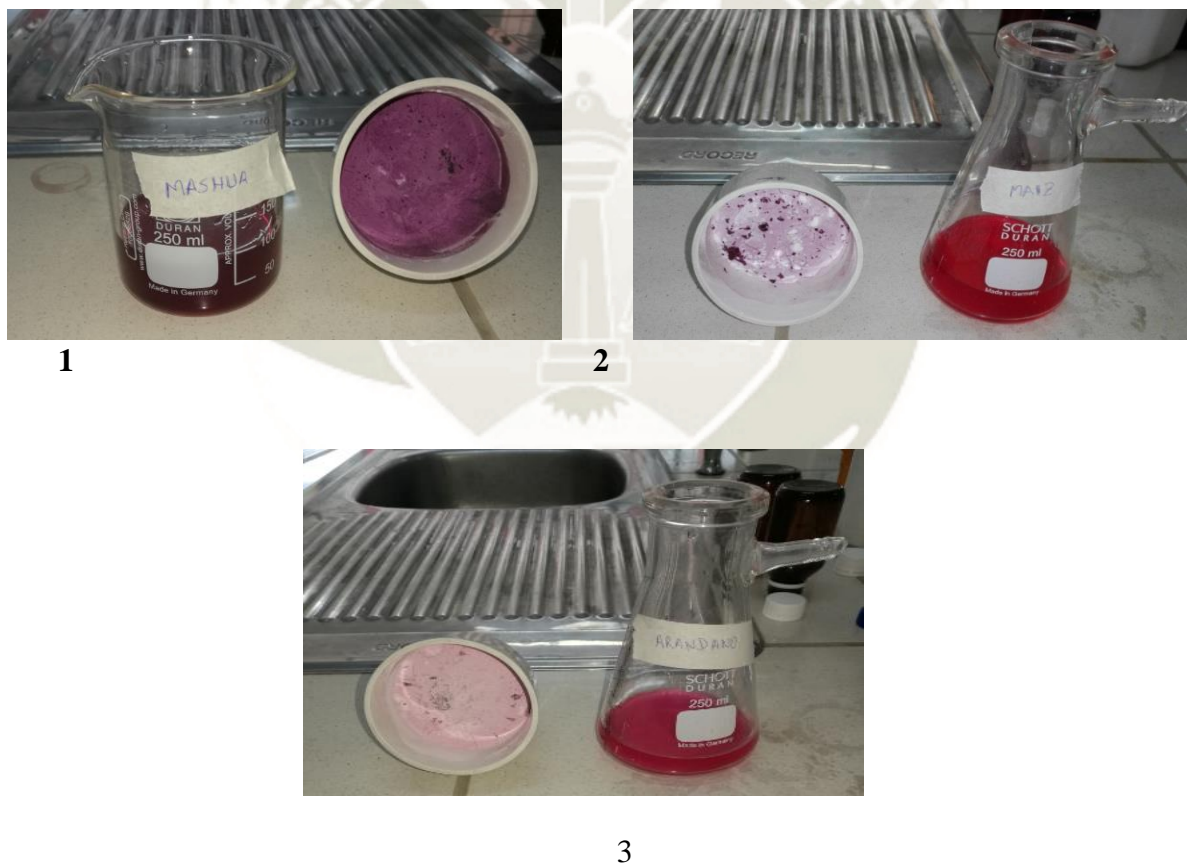


Figura N° 14: Como se observa después de 30 min de reacción

PURIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS



Figura N° 15: Purificación con PVPP



Figuras N° 16: Purificación con PVPP 1) Mashua 2) Maíz morado 3) Arandano



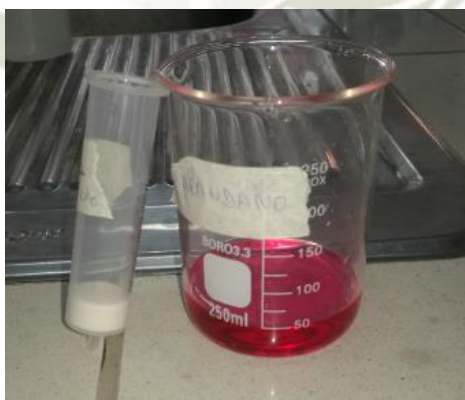
Figura N°17: purificación con cartucho C18



1



2



3

Figura N°18: Purificación con cartucho C18 1) Mashua 2) Maíz Morado 3) Arandano



Figura N°19: Se llevó a un evaporador para disminuir el volumen por evaporación de etanol

CUANTIFICACIÓN POR HPLC

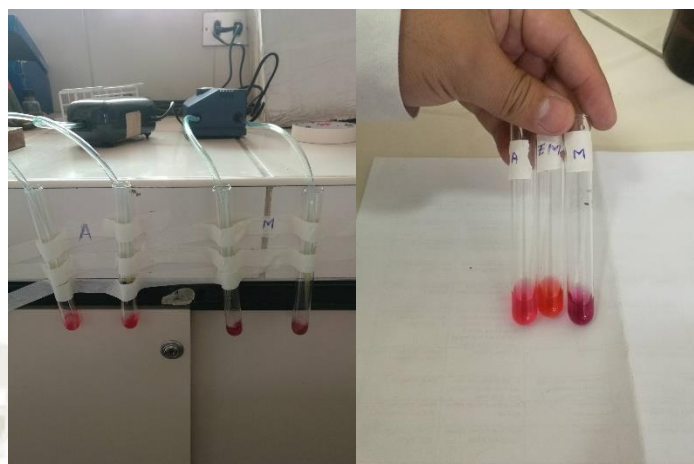


Figura N°20: Secado de las muestras.

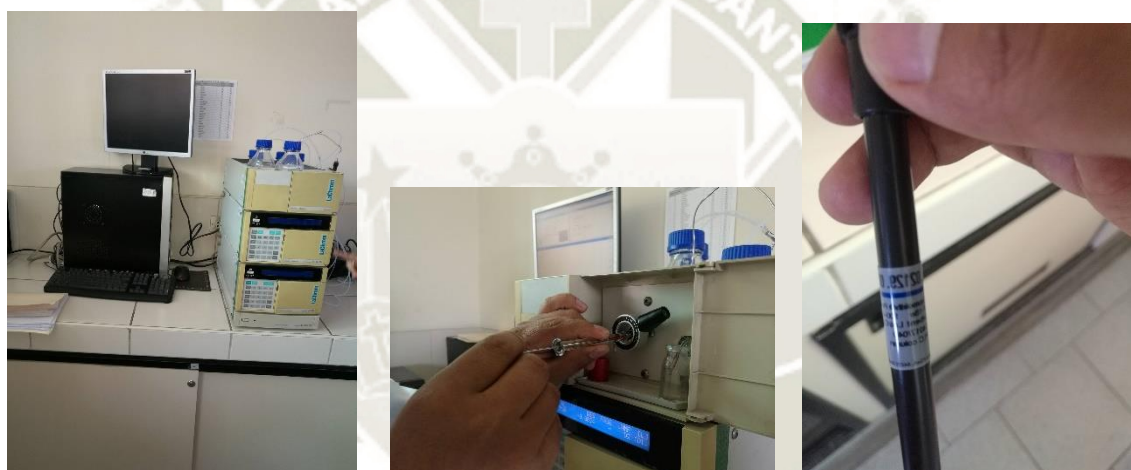


Figura N°21: Equipo de HPLC y columna C18

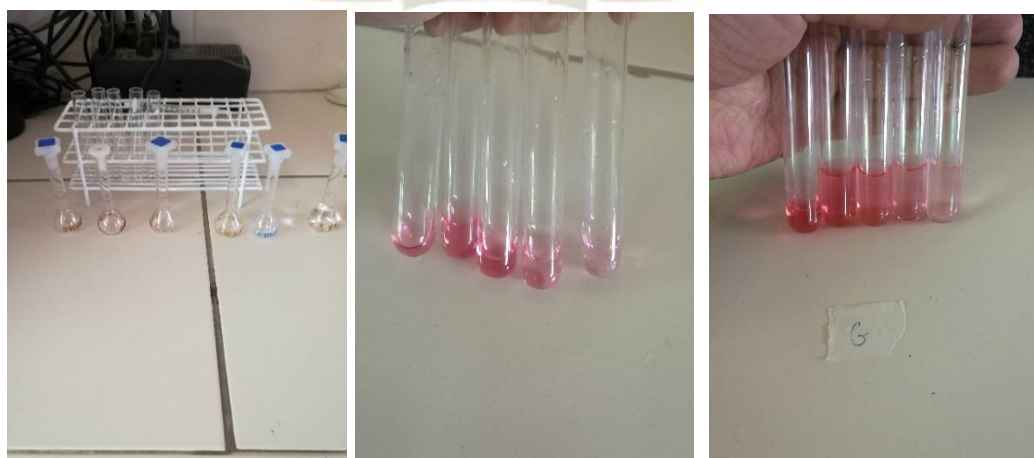


Figura N°22: Estándares a diferentes concentraciones.

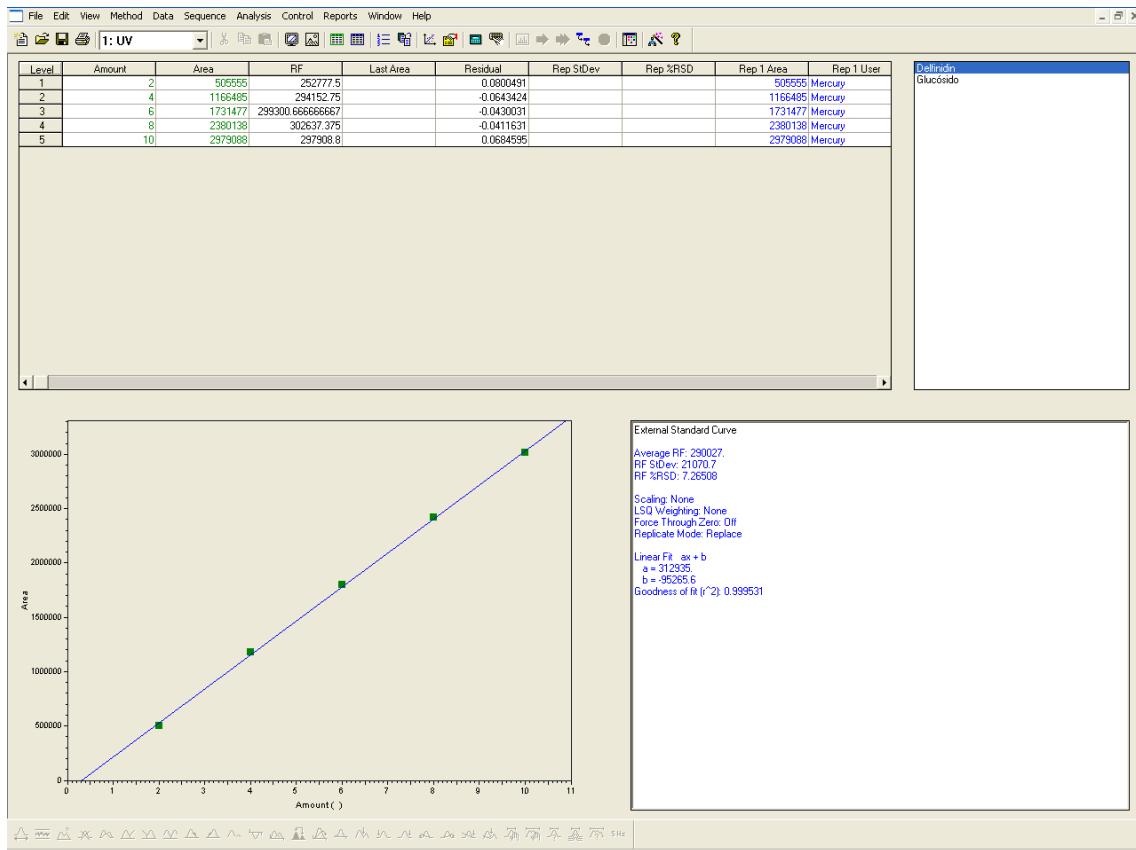


Figura N°23: Linealidad de la delfinidina-3-glucósido.

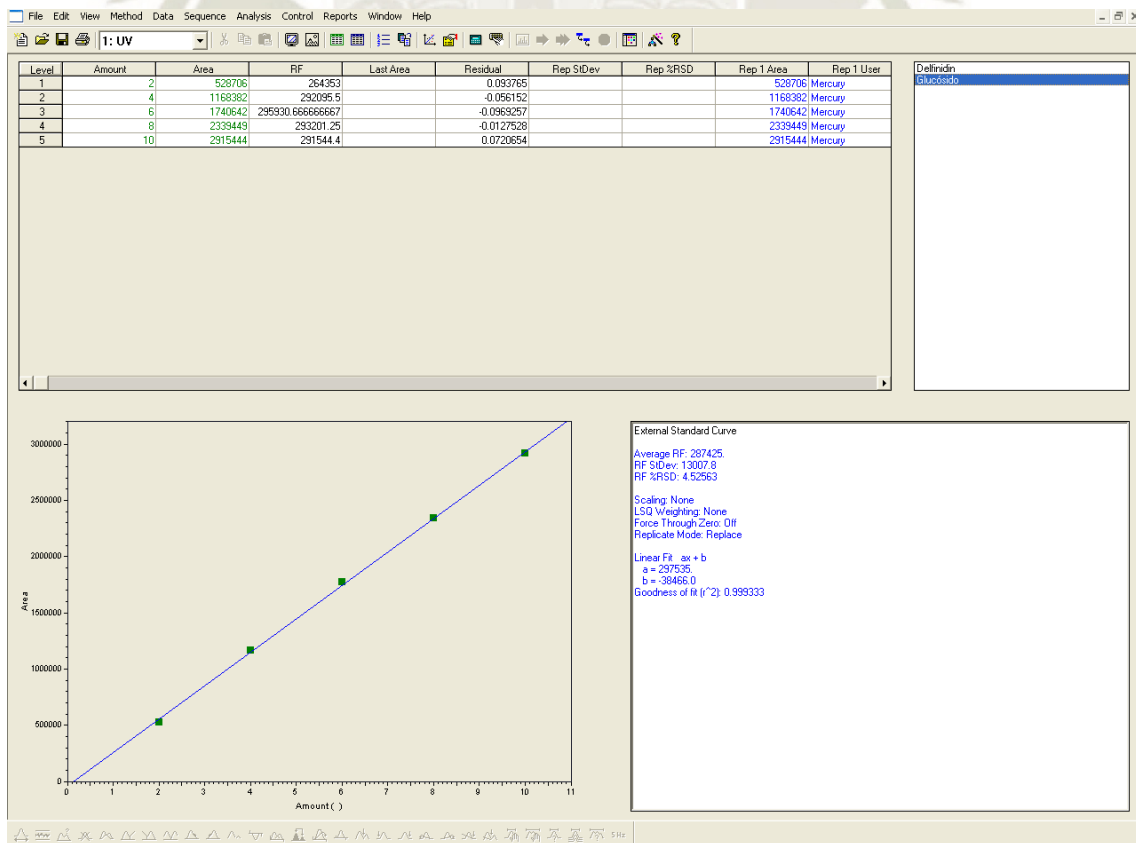


Figura N°24: Linealidad de la cianidina-3-glucósido.

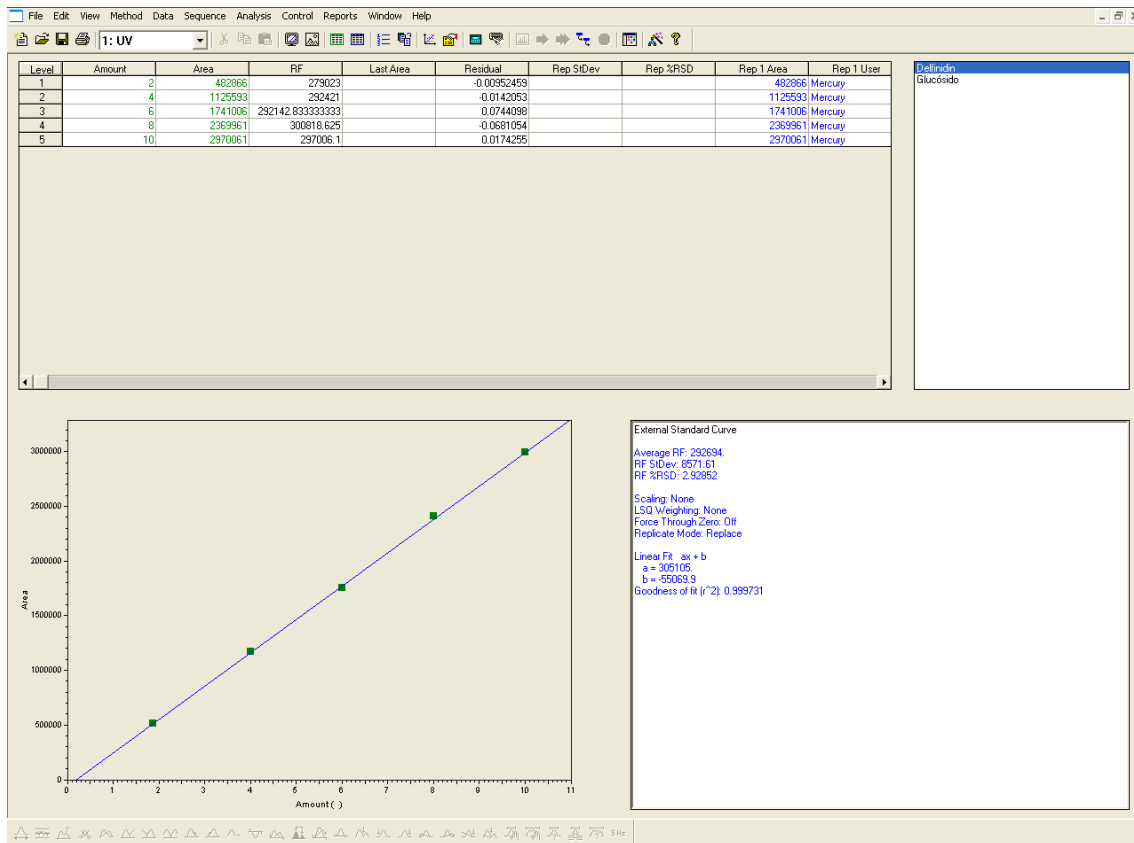


Figura N°25: Linealidad de la delfinidina-3-glucósido.

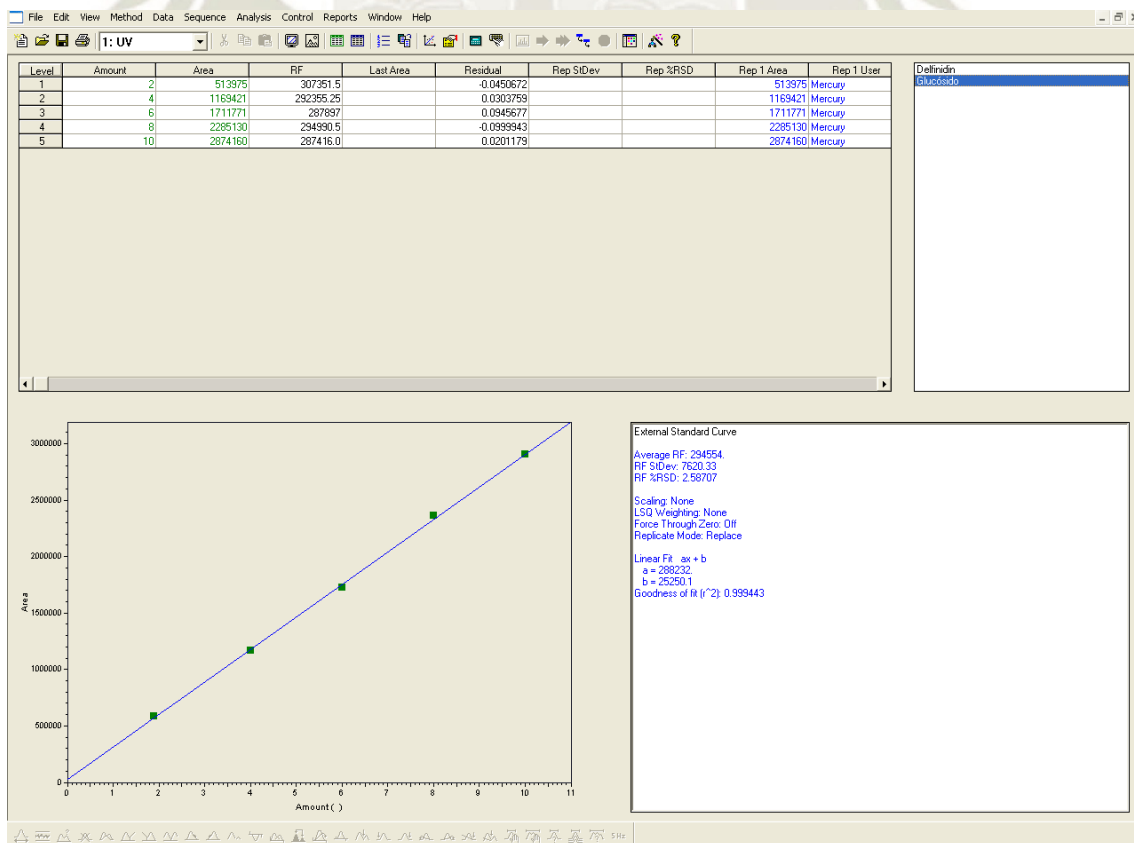


Figura N°26: Linealidad de la cianidina-3-glucósido.

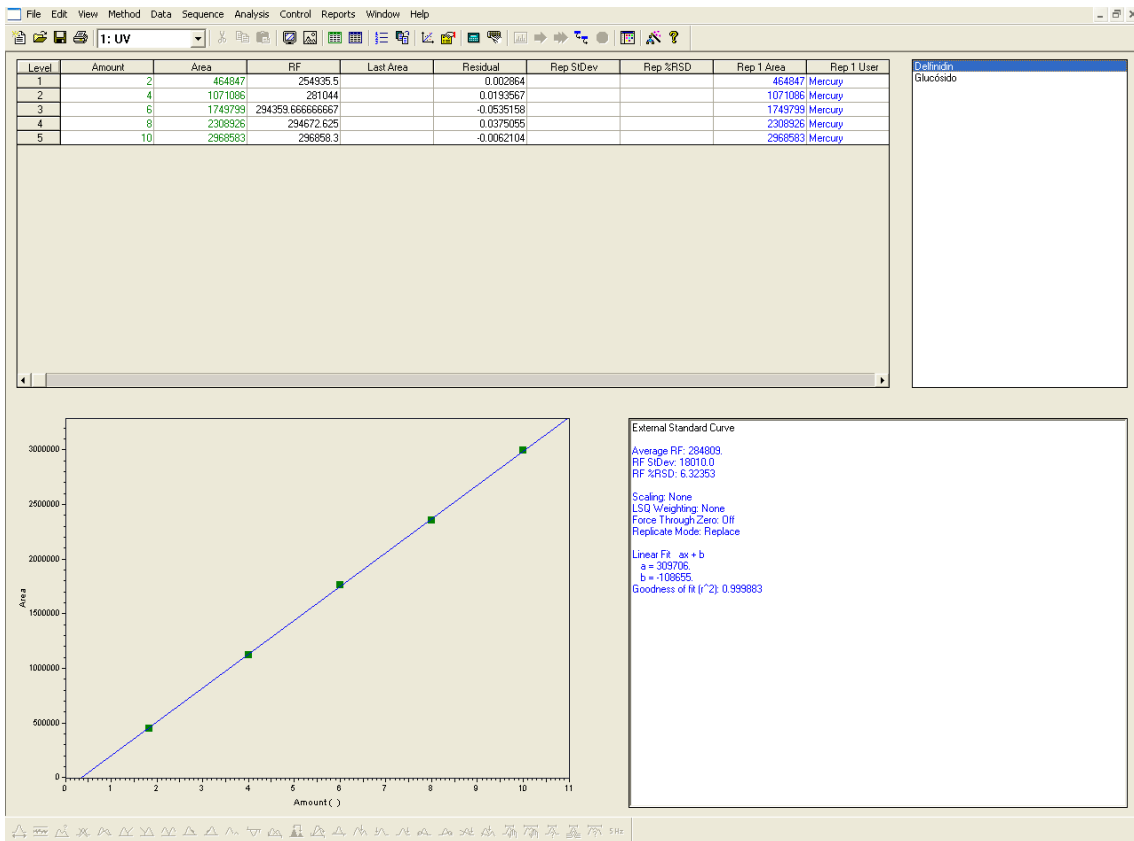


Figura N°27: Linealidad de la delfinidina-3-glucósido.

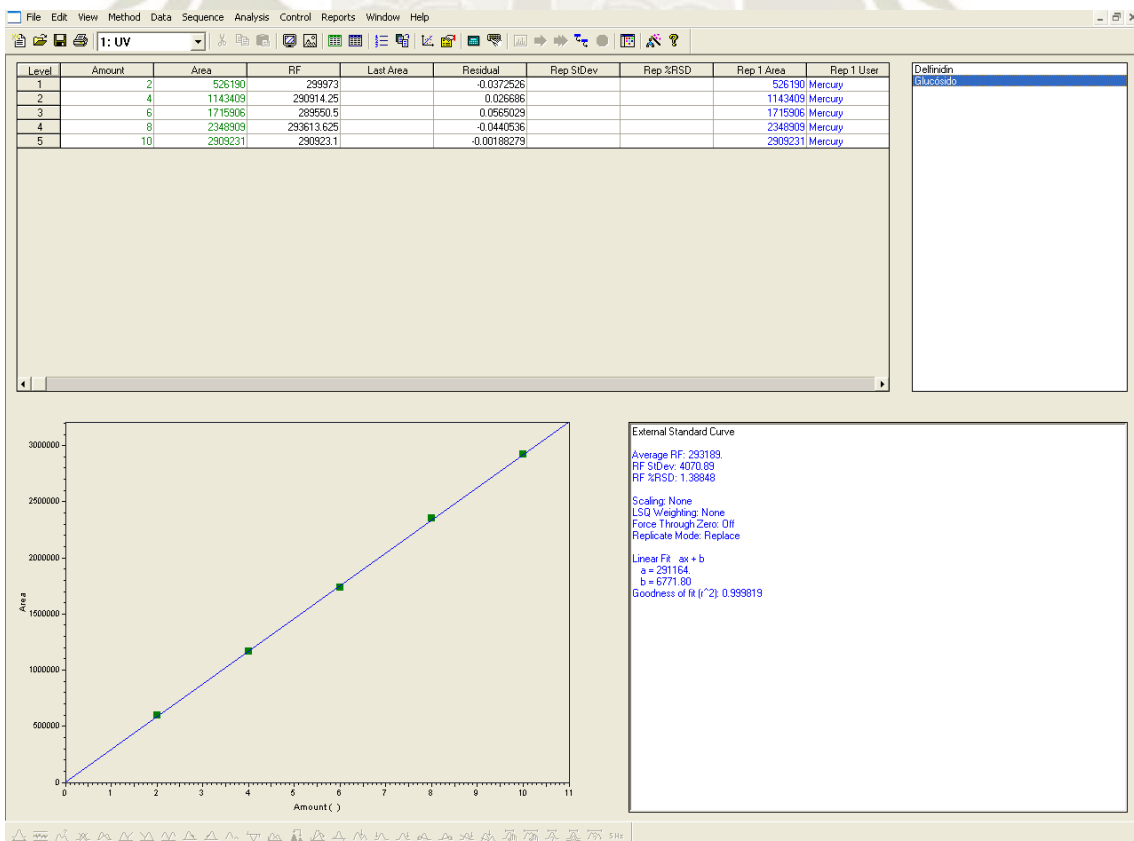


Figura N°28: Linealidad de la cianidina-3-glucósido.

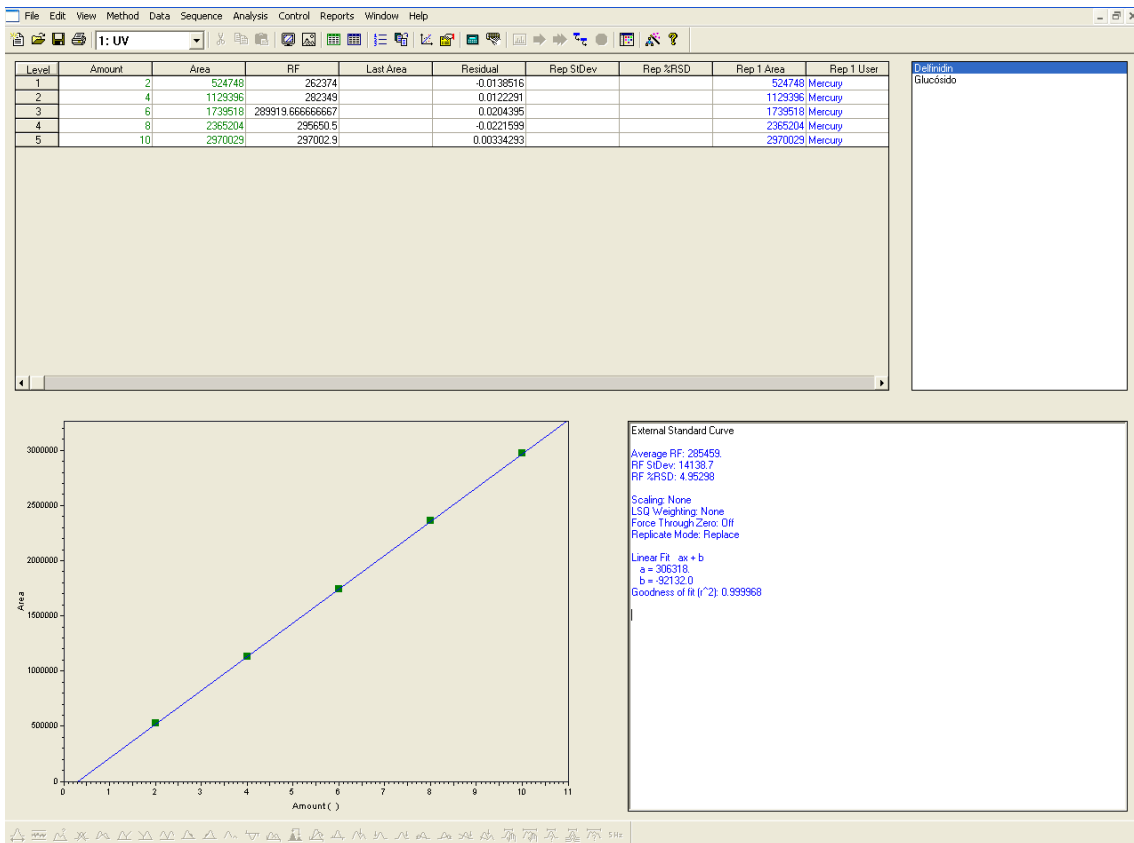


Figura N°2: Linealidad de la delfinidina-3-glucósido.

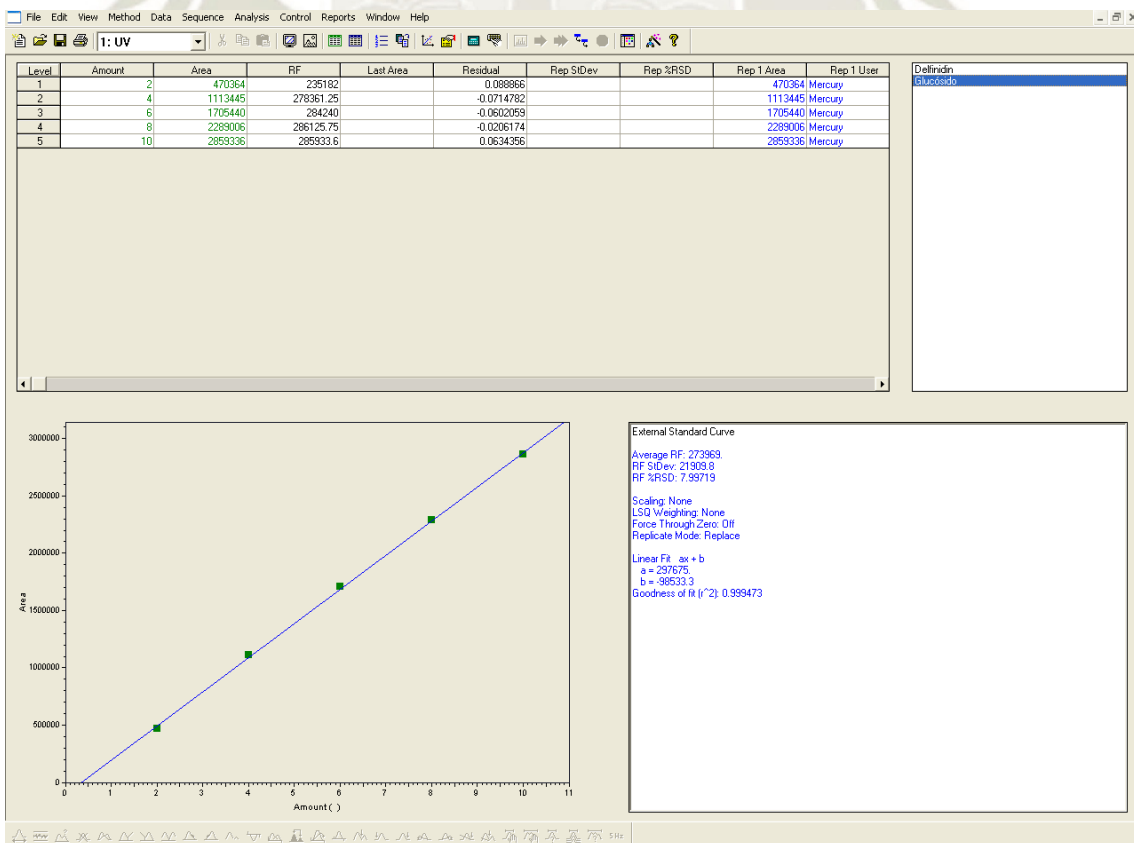


Figura N°29: Linealidad de la cianidina-3-glucósido.

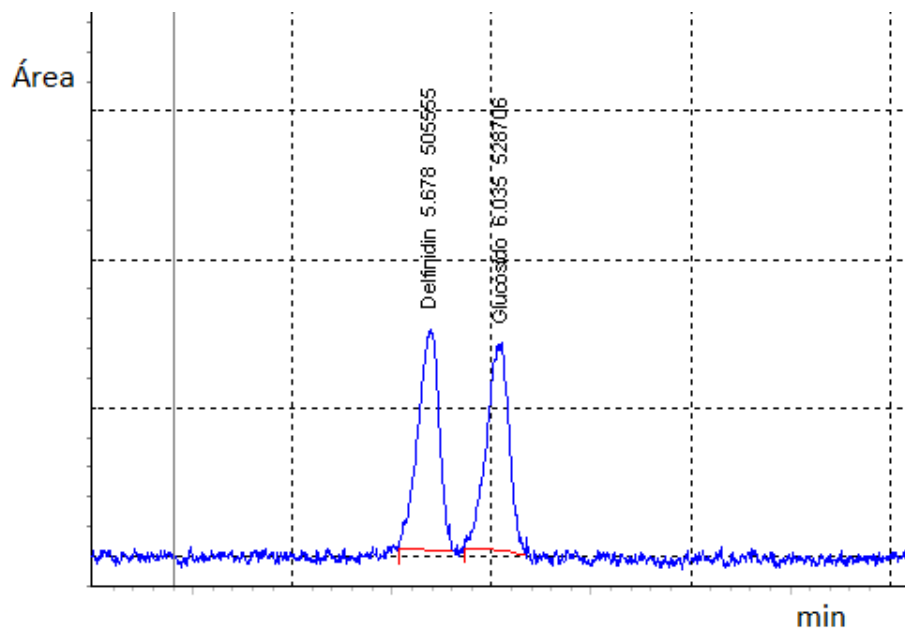


Figura N°30: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 2ppm.

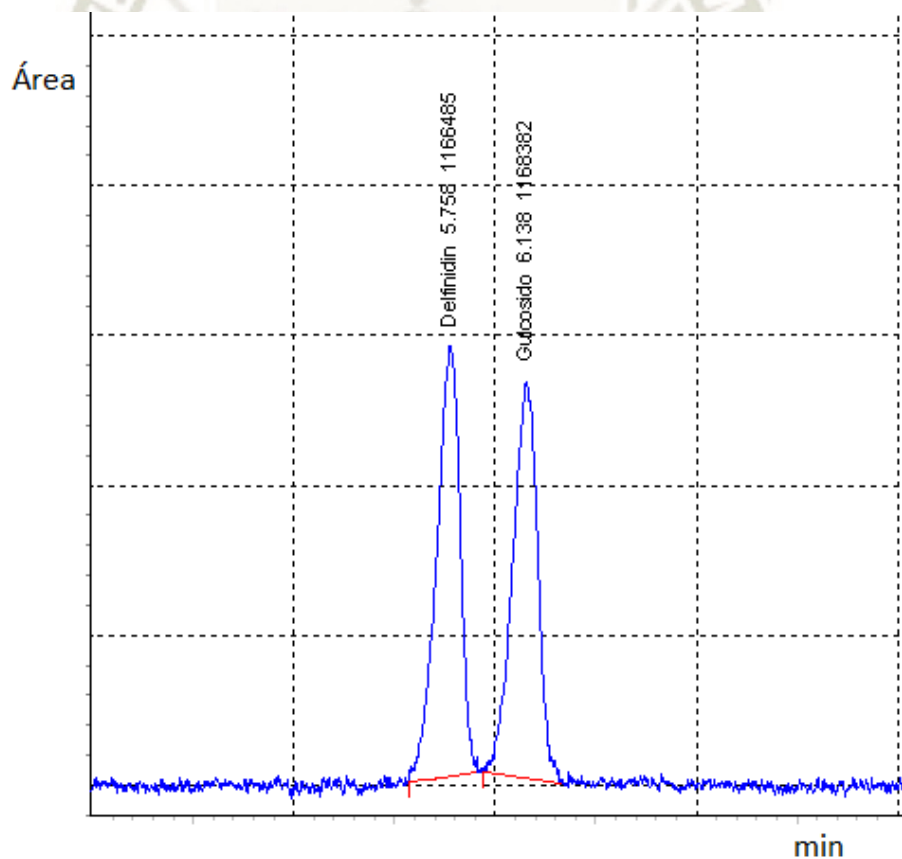


Figura N°31: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 4ppm.

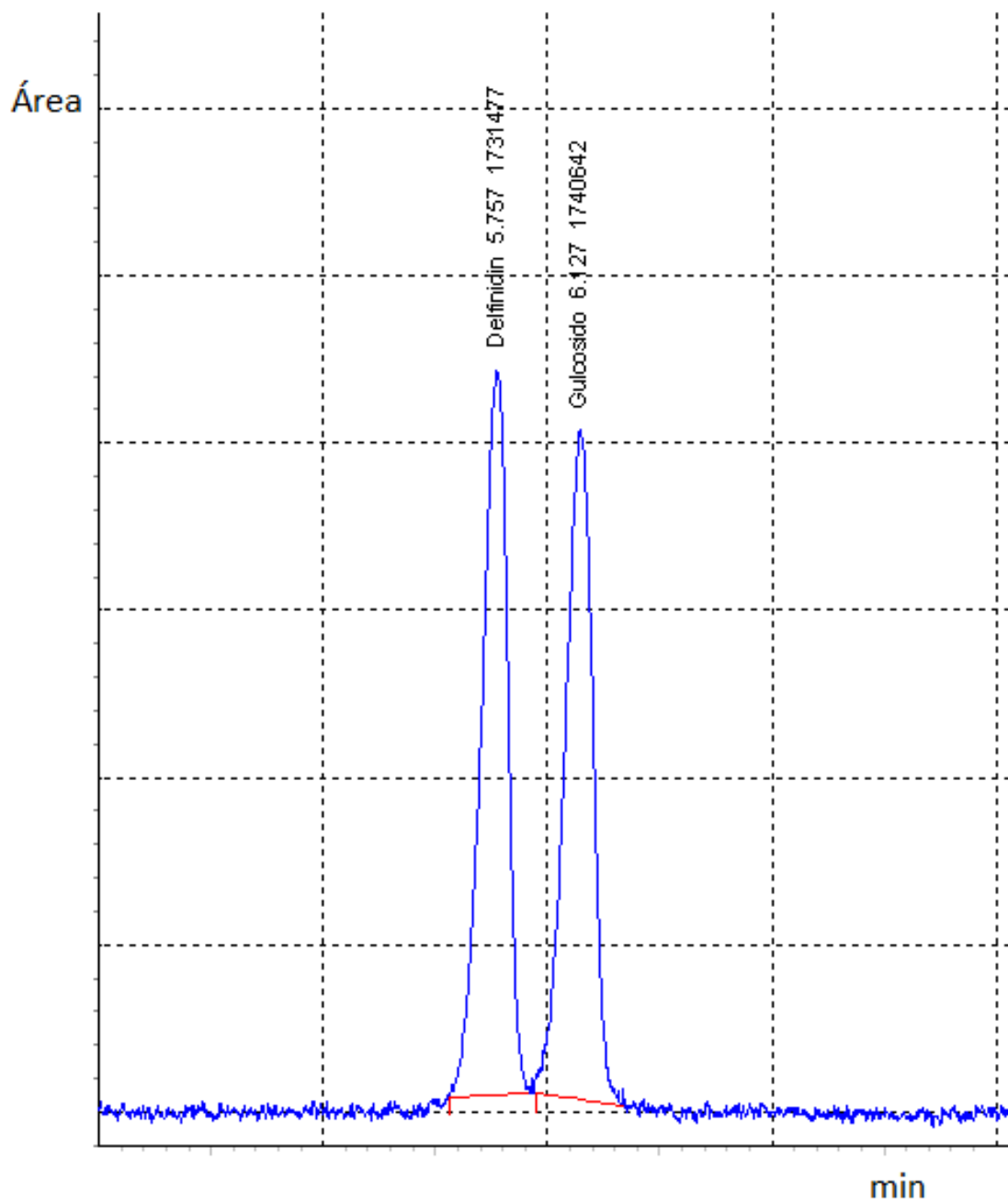


Figura N°32: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 6ppm.

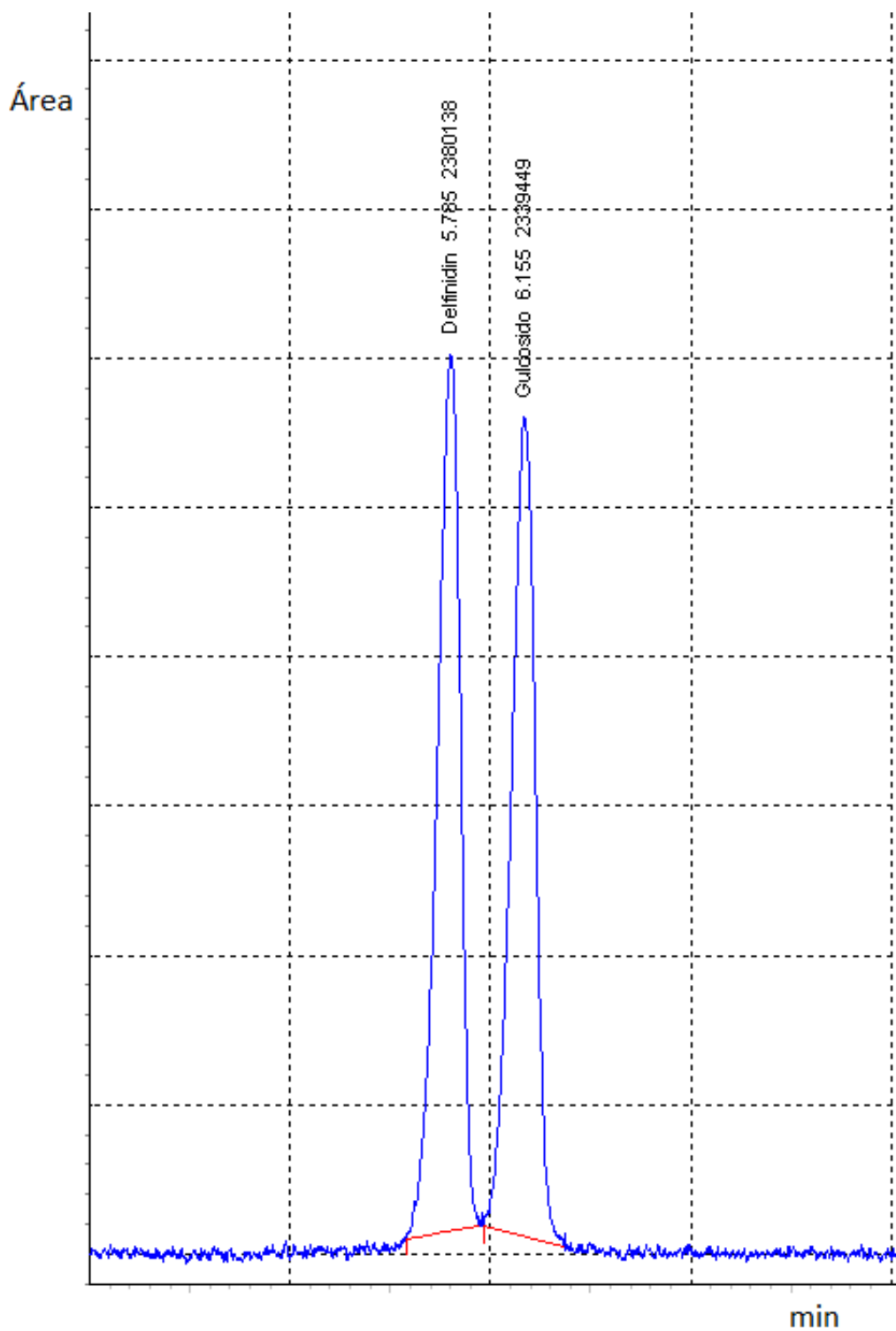


Figura N°33: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 8ppm.

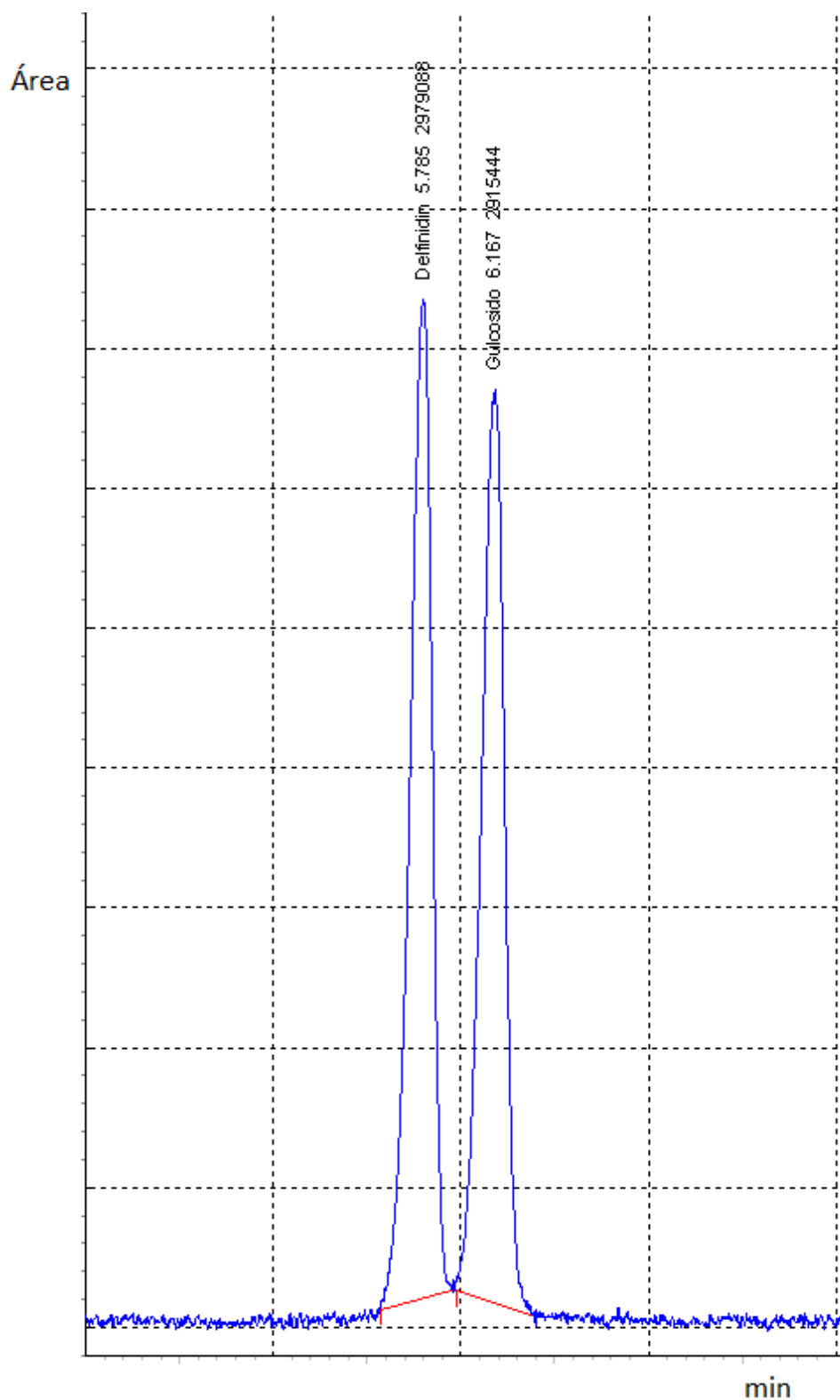


Figura N°34: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 10ppm.

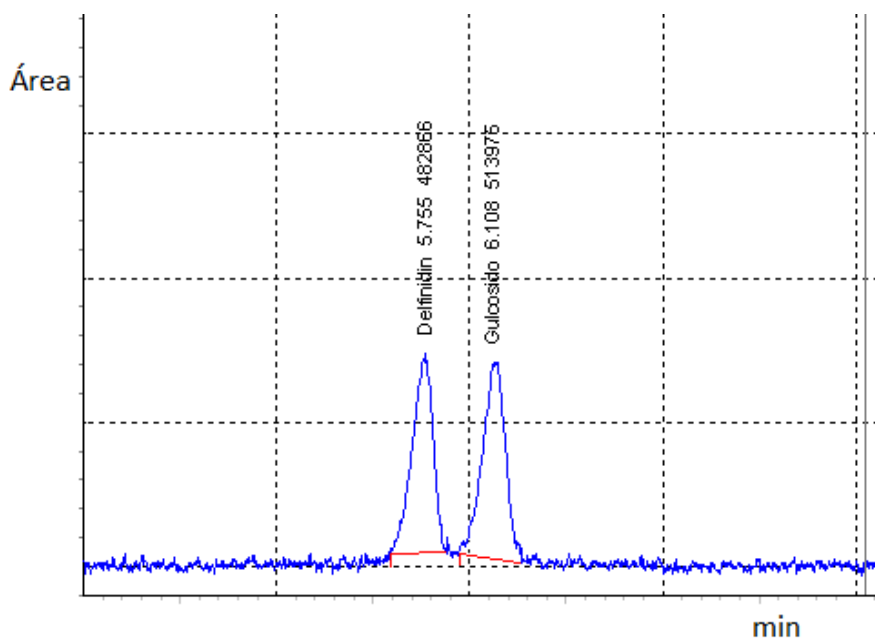


Figura N°35: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 2ppm.

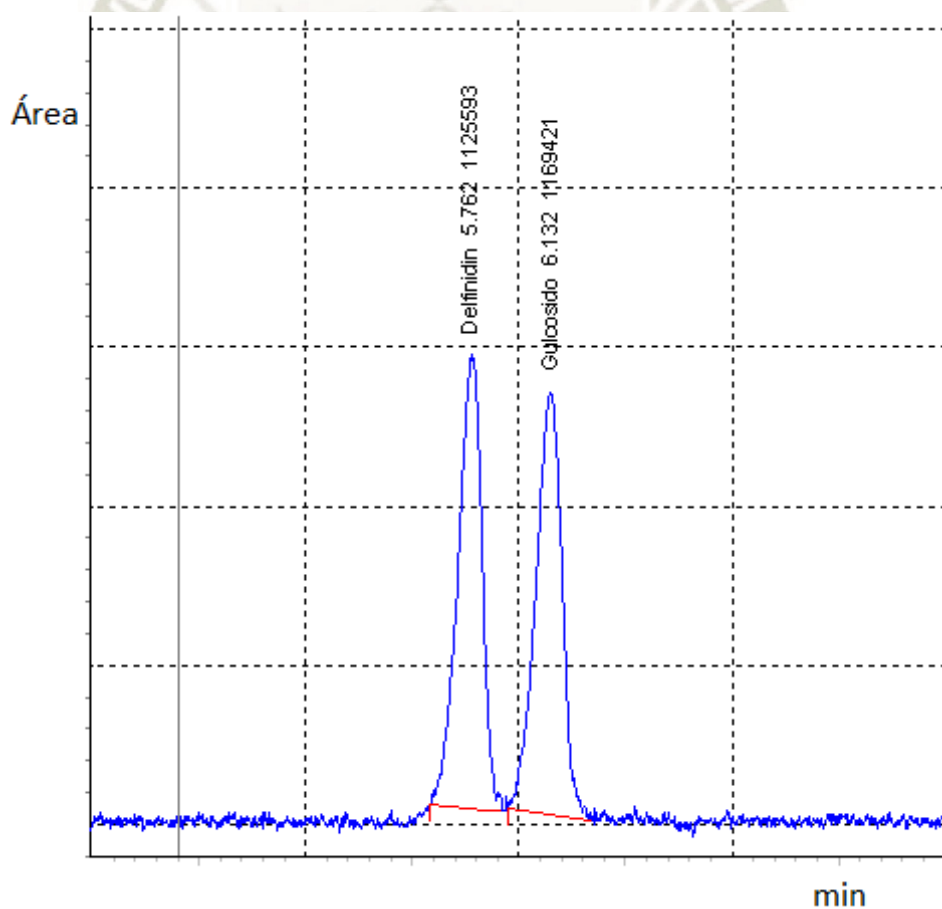


Figura N°36: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 4ppm.

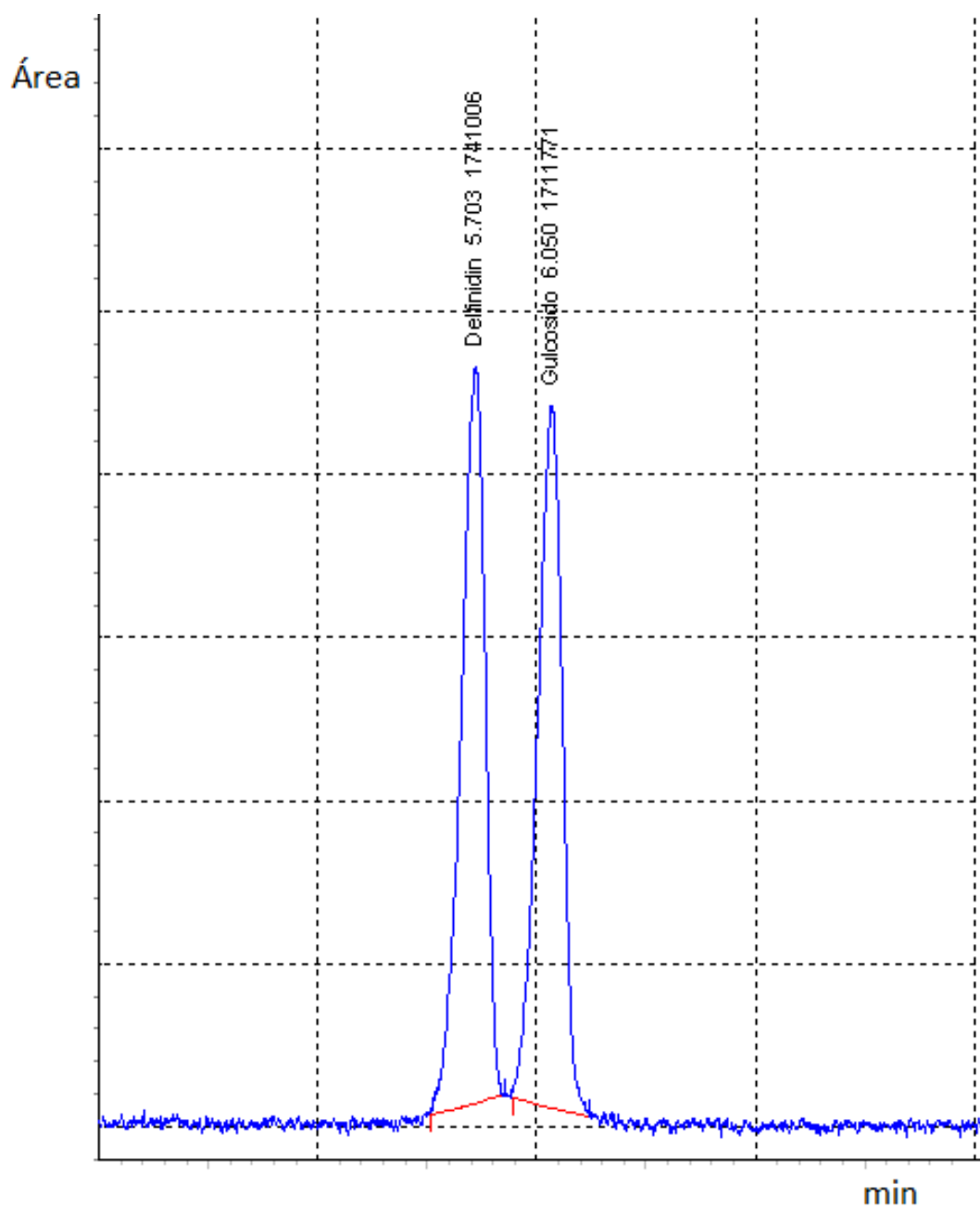


Figura N°37: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 6ppm.

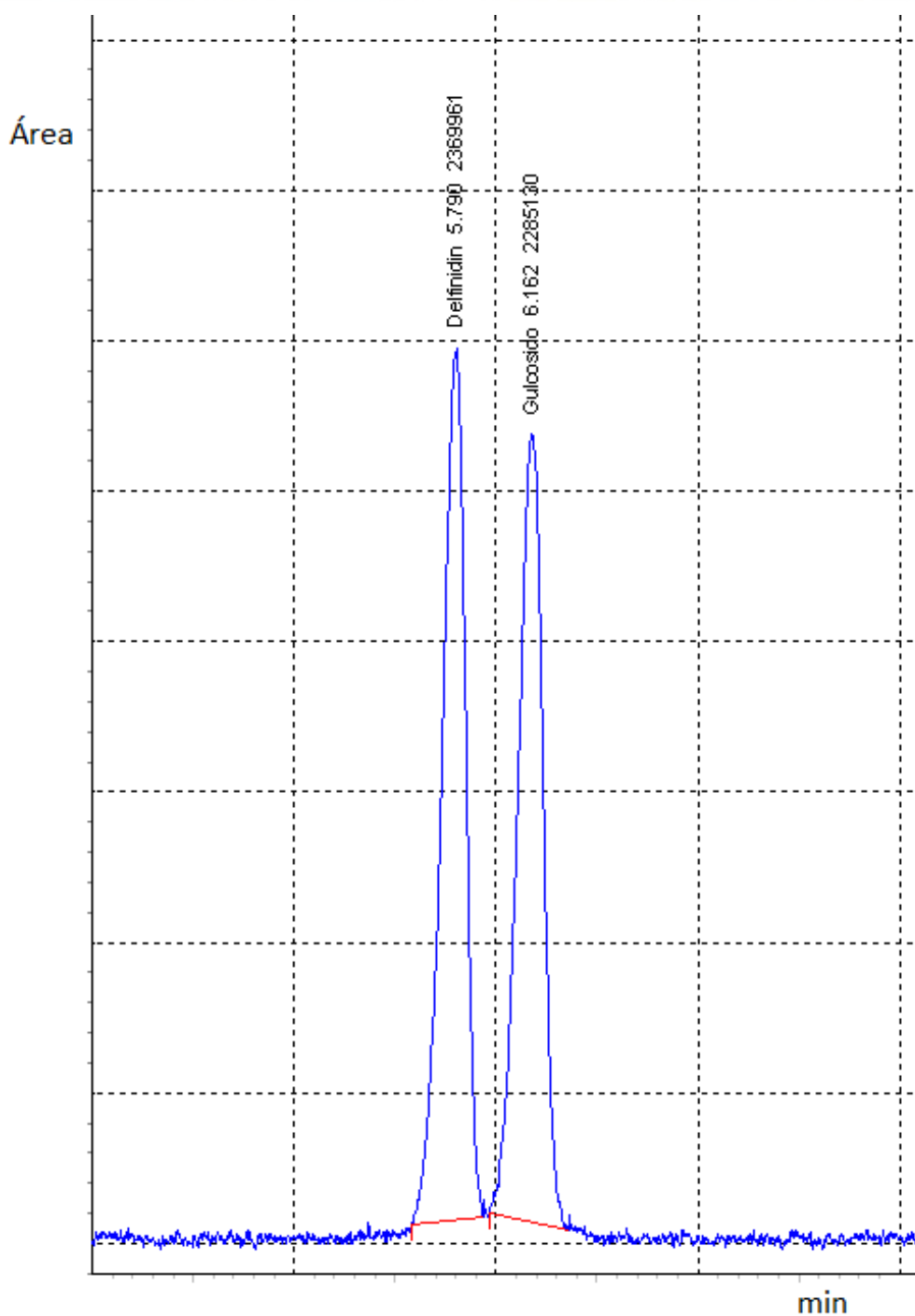


Figura N°38: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 8ppm.

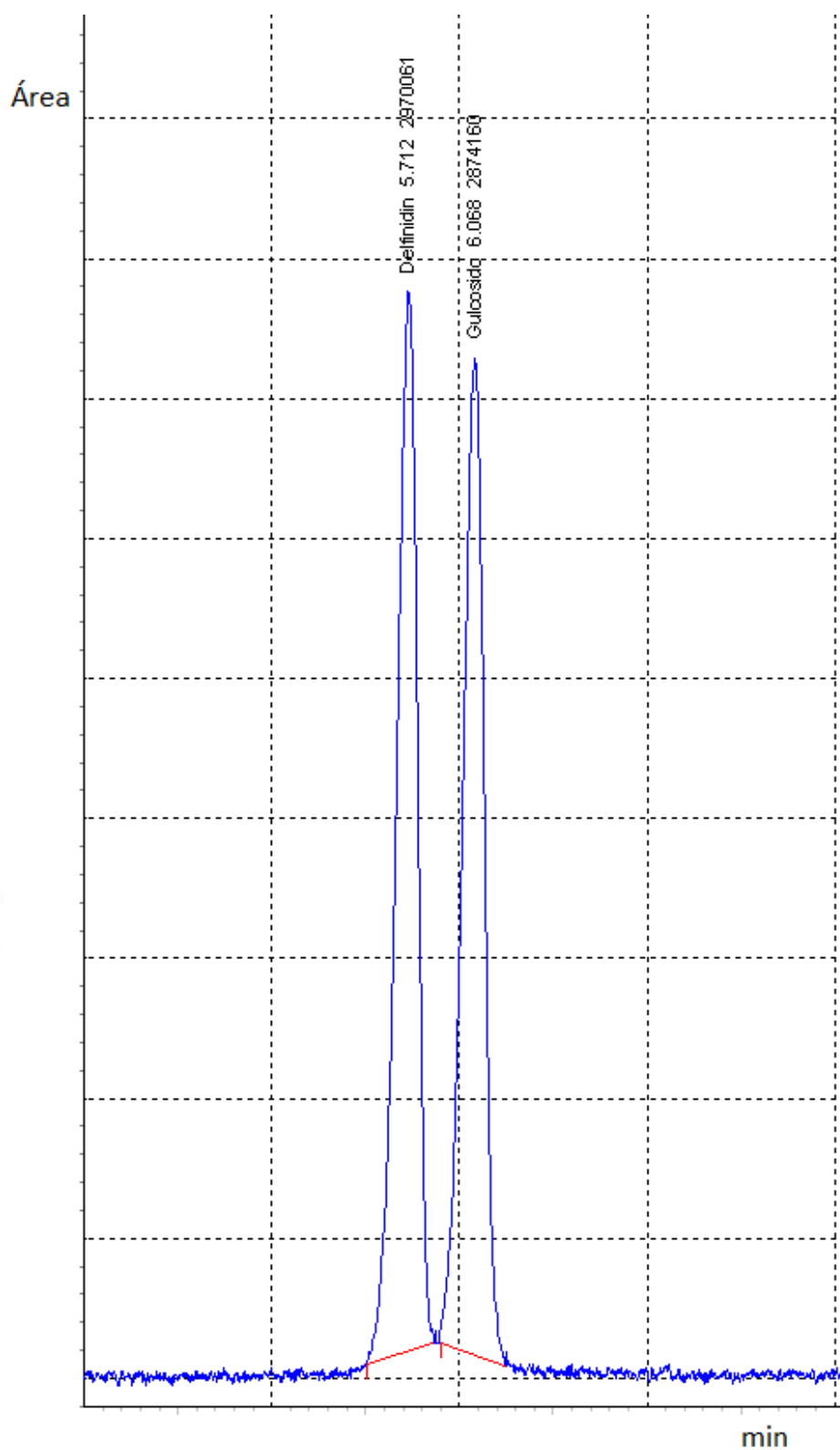


Figura N°39: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 10ppm.

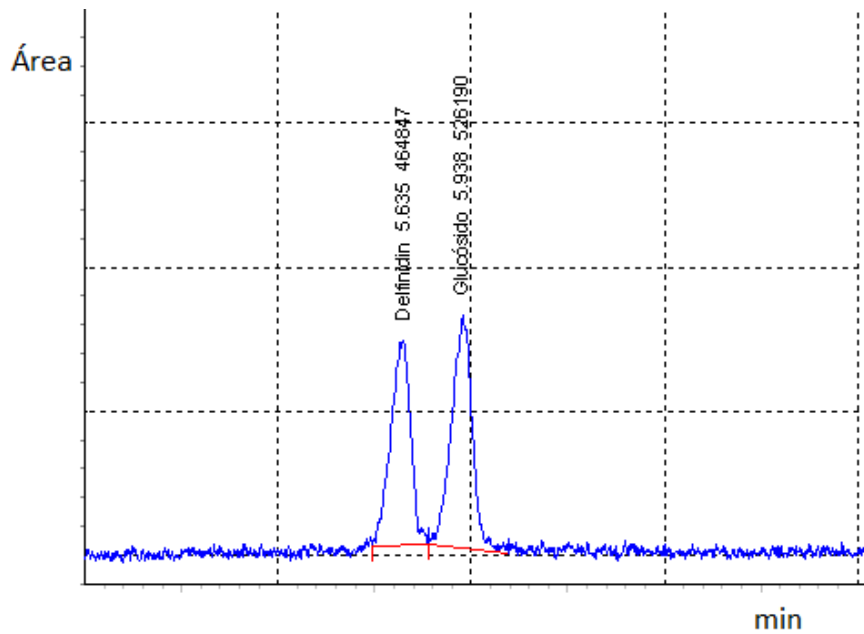


Figura N°40: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 2ppm.

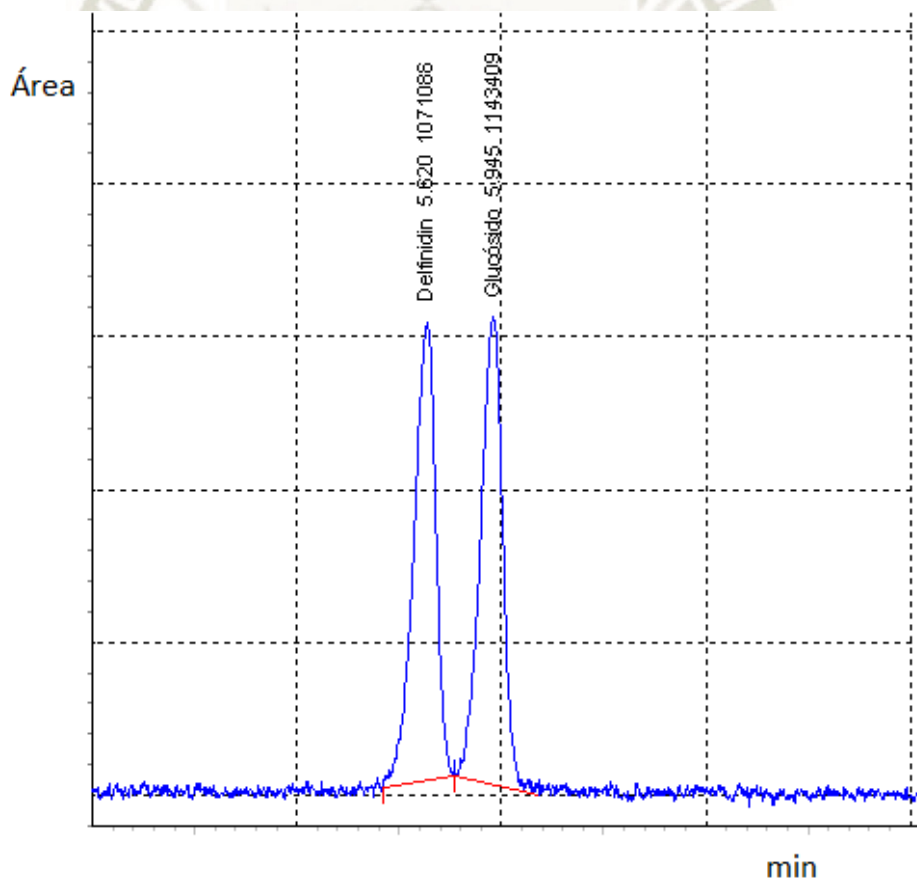


Figura N°41: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 4ppm.

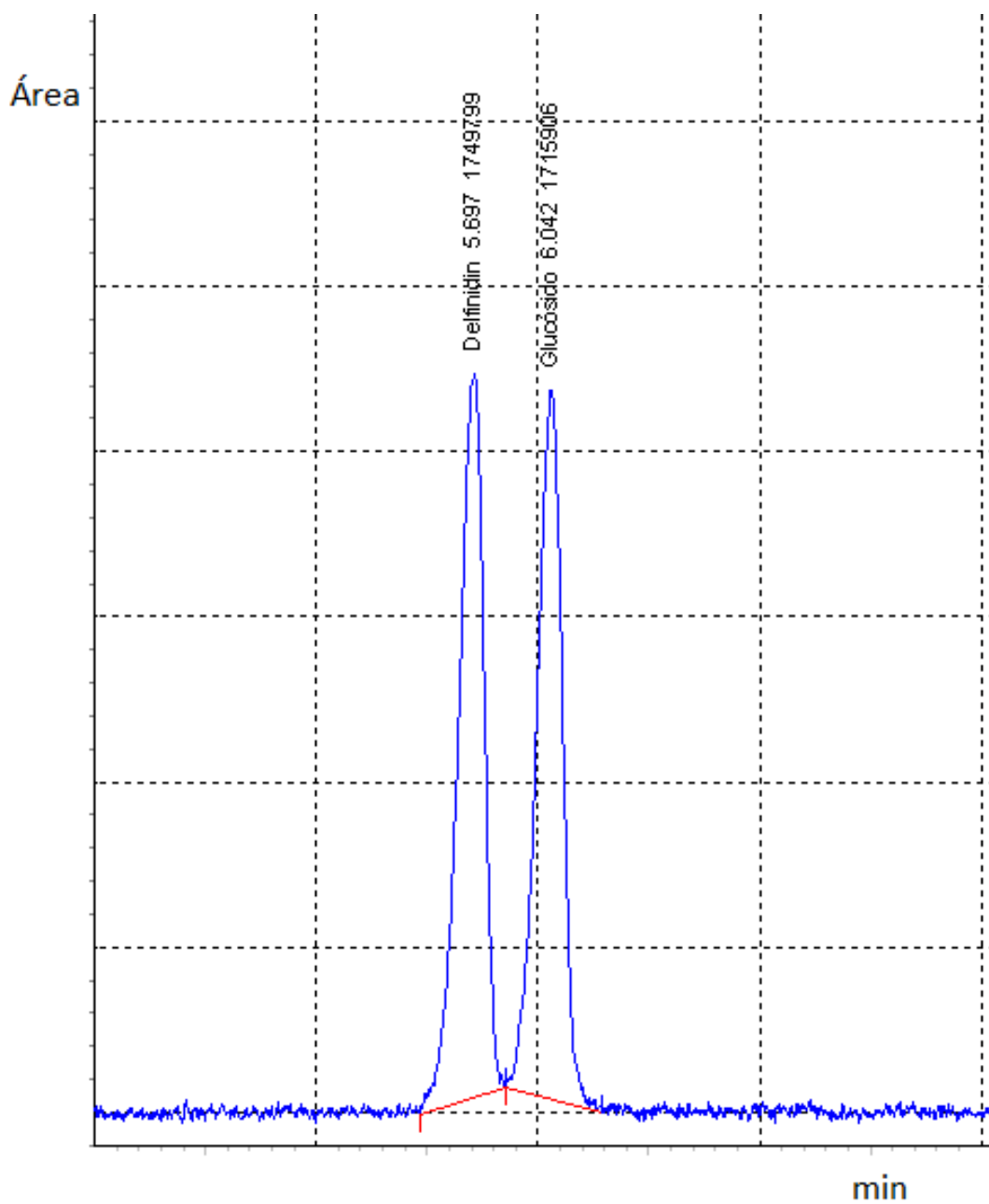


Figura N°42: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 6ppm.

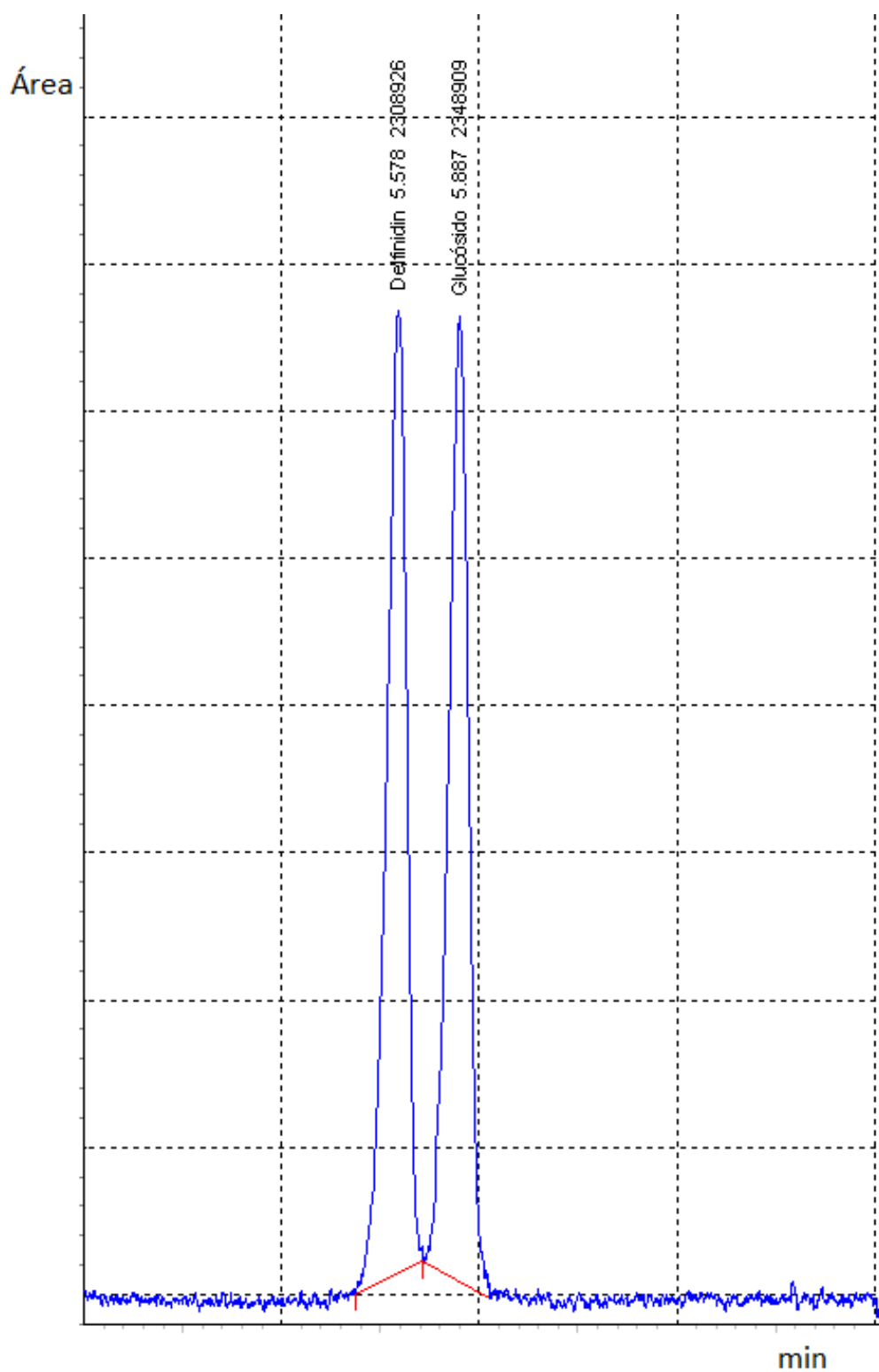


Figura N° 43: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 8ppm.

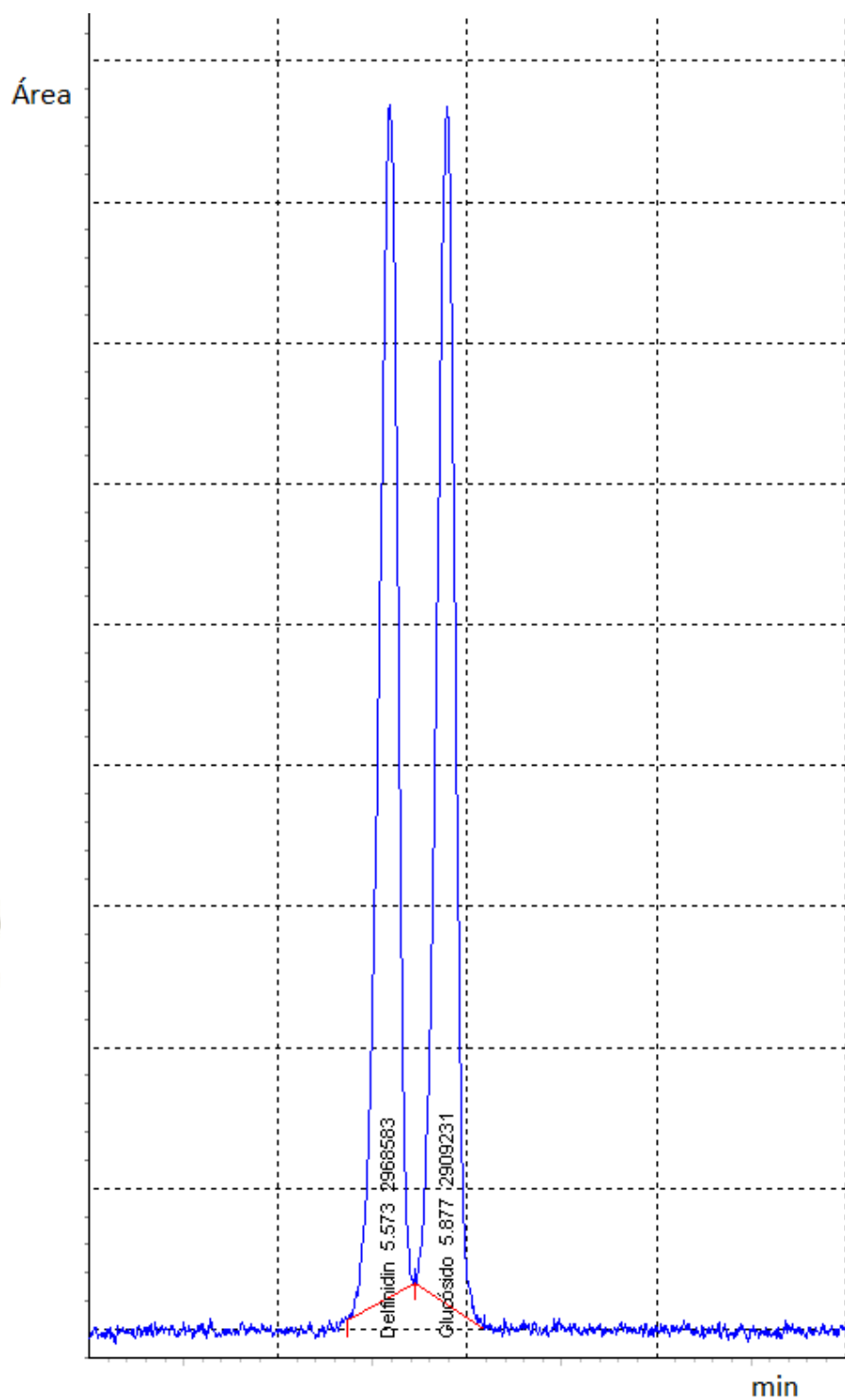


Figura N°44: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 10ppm.

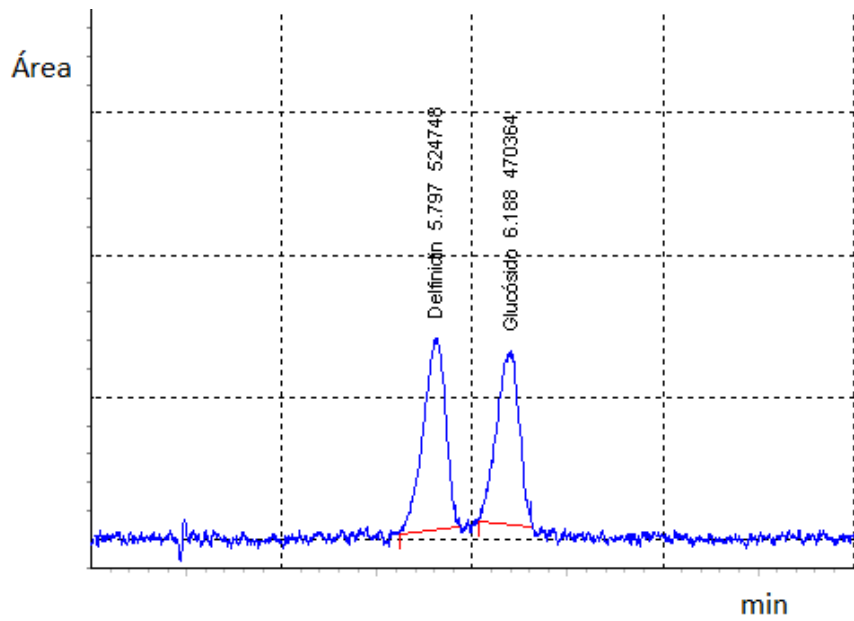


Figura N°45: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 2ppm.

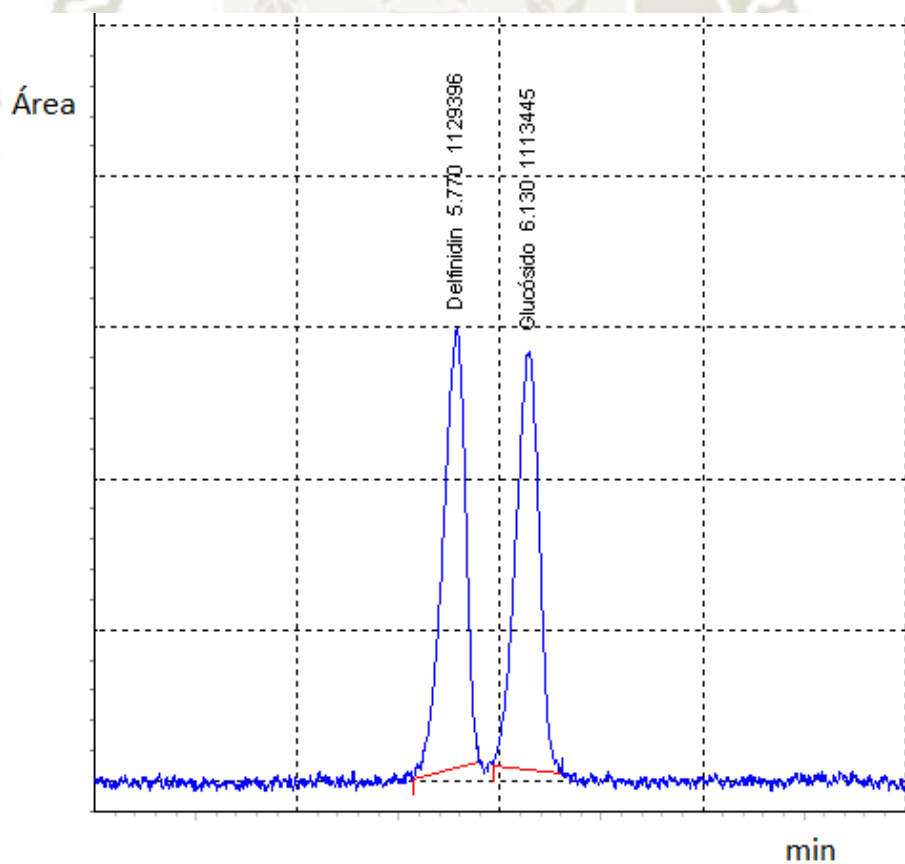


Figura N°46: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 4ppm.

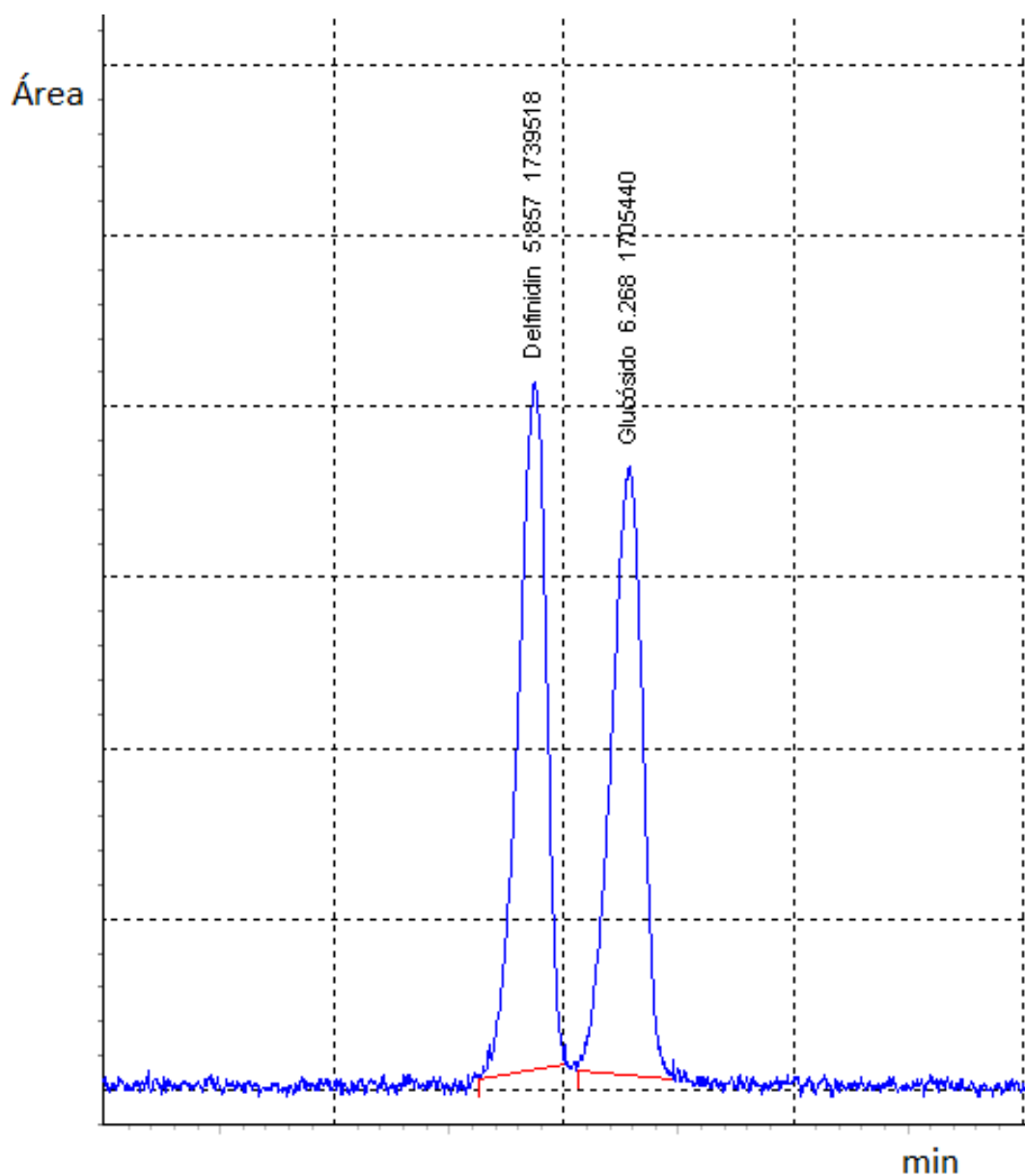


Figura N°47: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 6ppm.

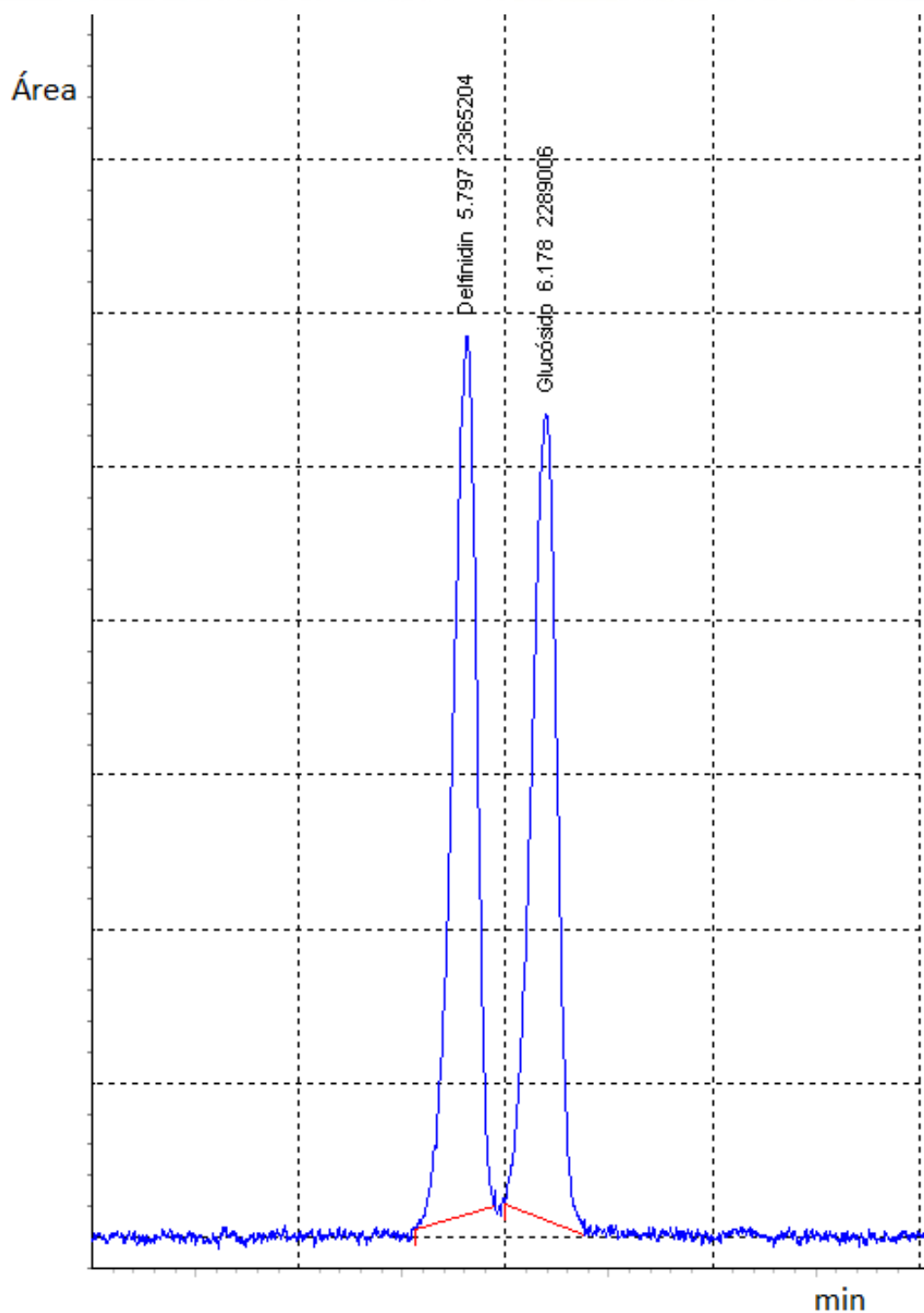


Figura N°48: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 8ppm.

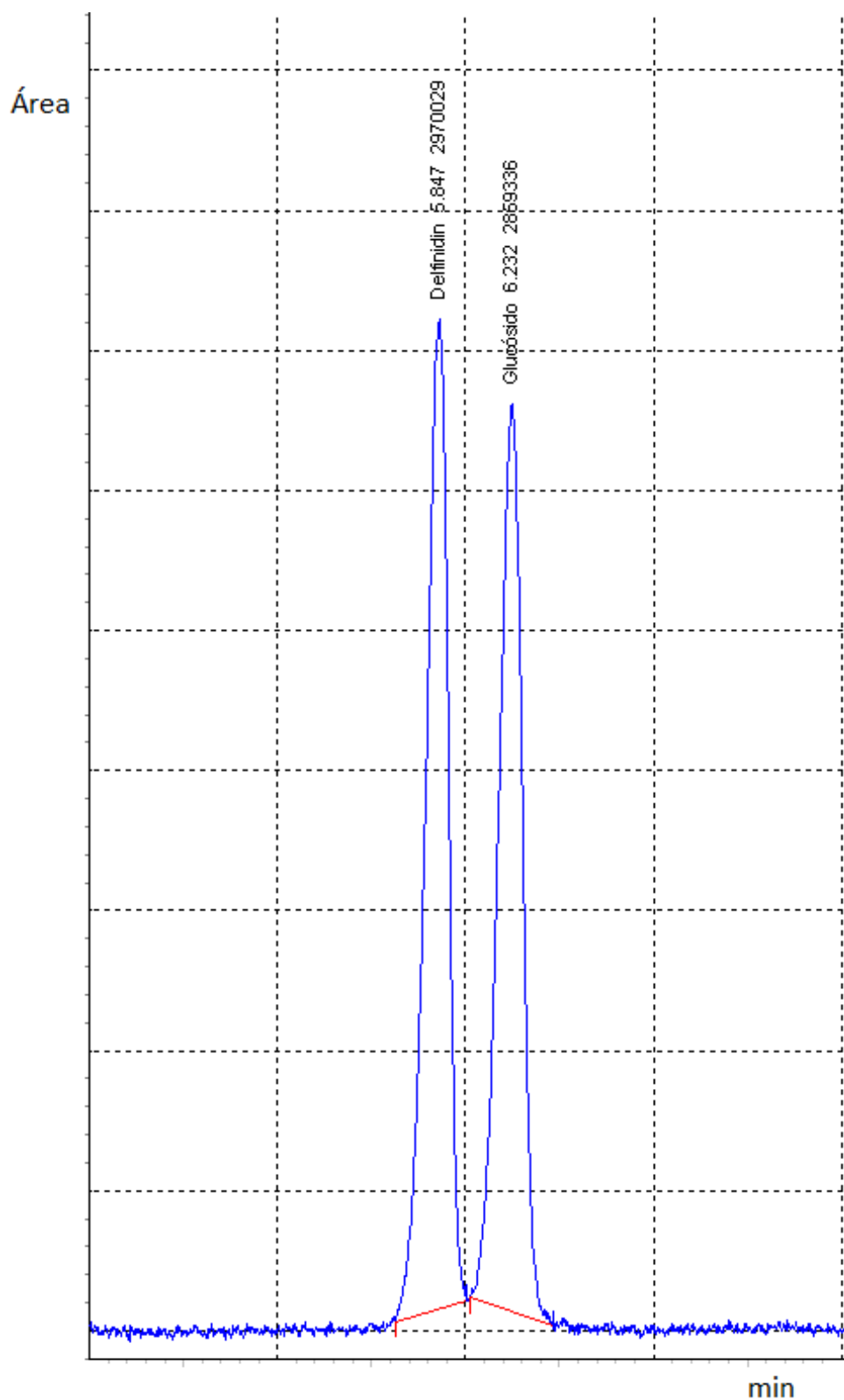
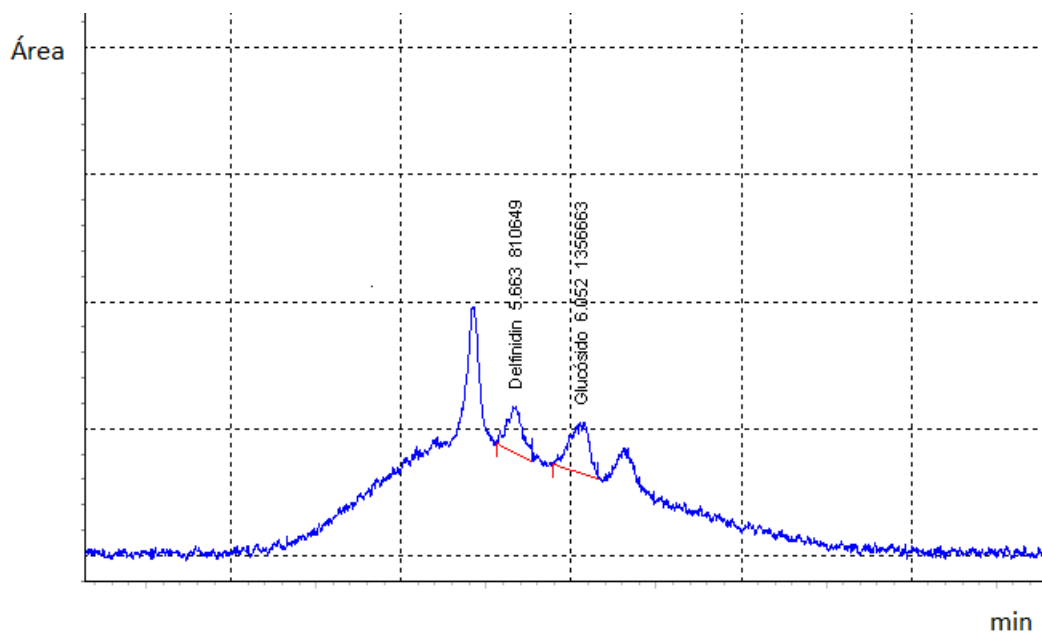
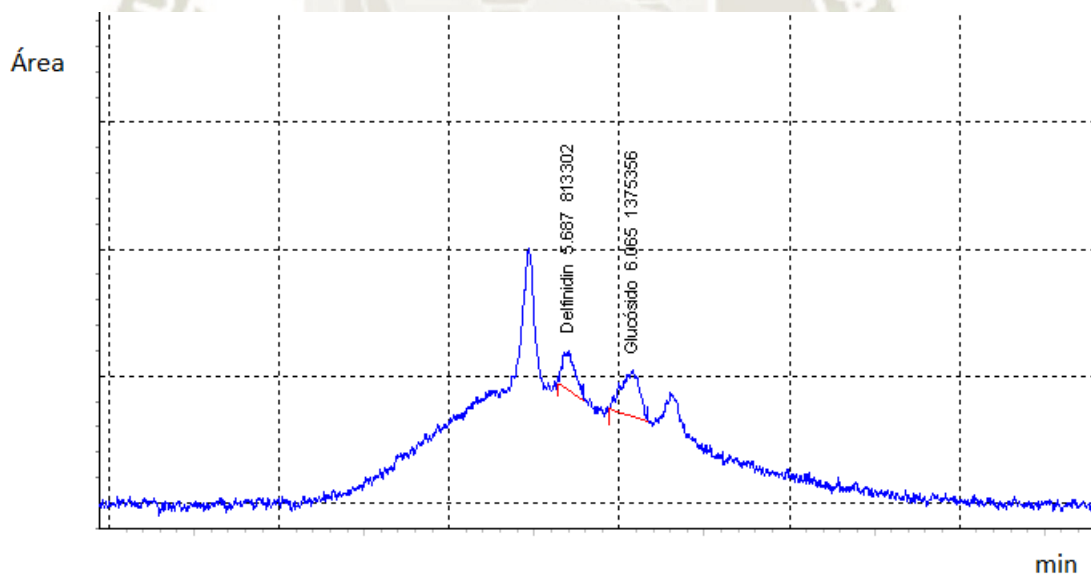


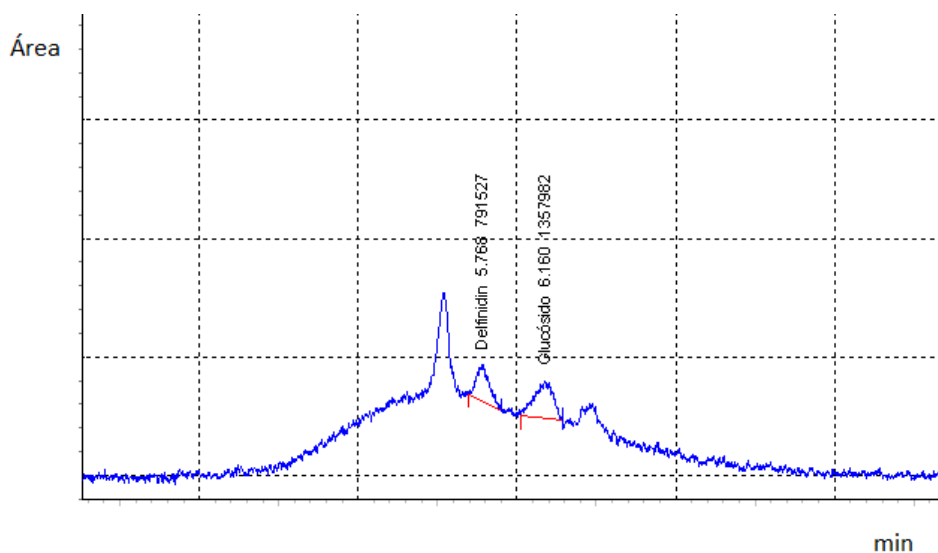
Figura N°49: Espectro de los estándares: (definidina-3-glucósido) pico izquierdo y (cianidina-3-glucósido) pico derecho a 10ppm.



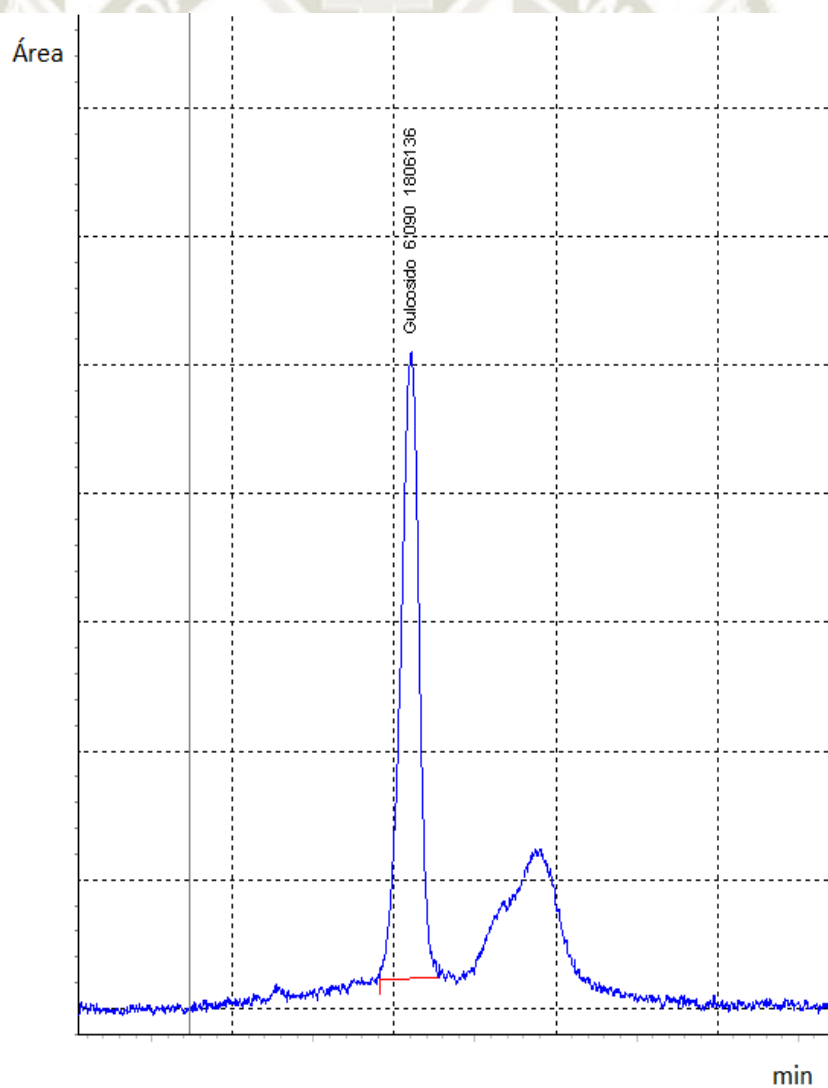
FiguraN°50: Espectro de la muestra de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).



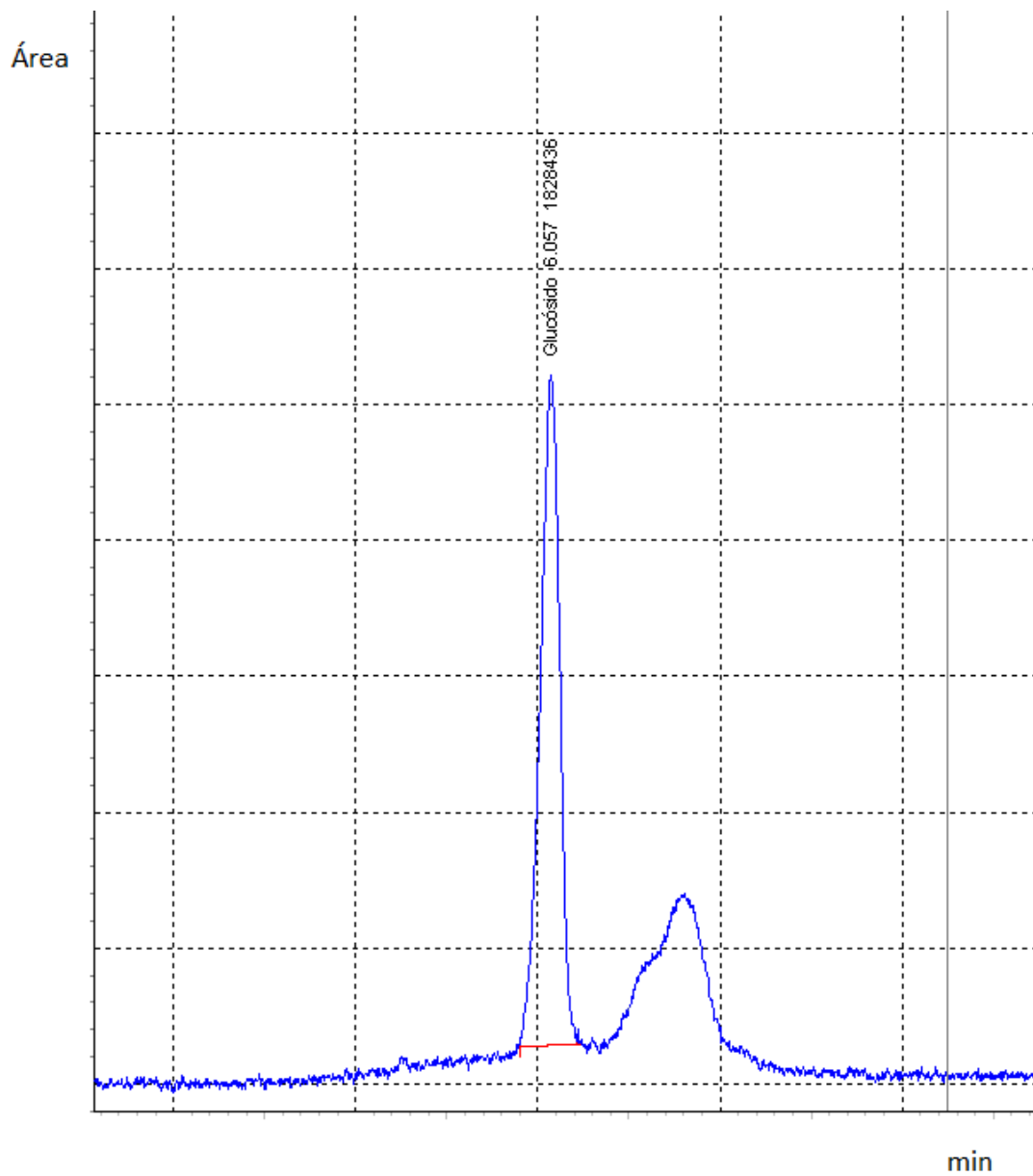
FiguraN°51: Espectro de la muestra de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).



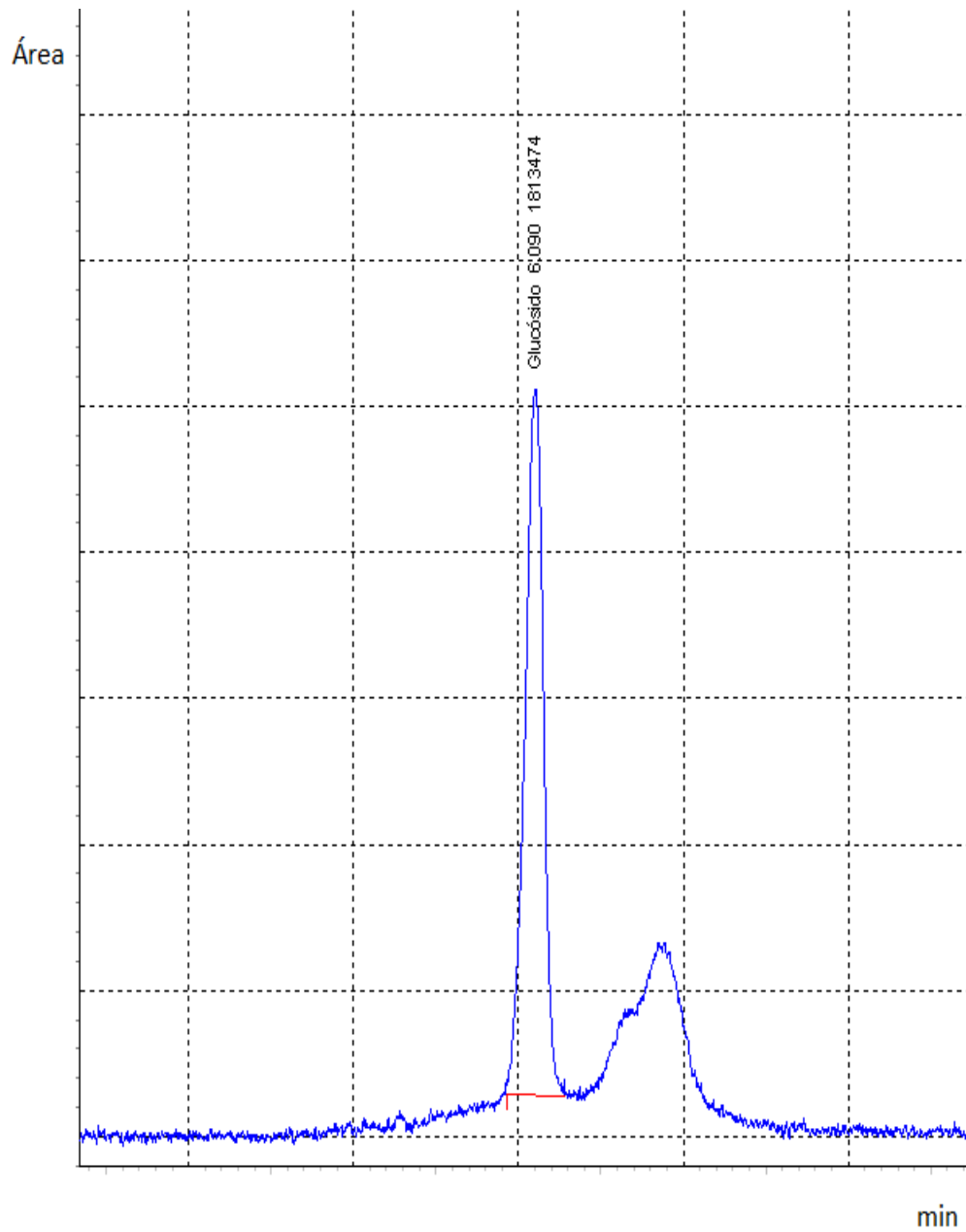
FiguraN°52: Espectro de la muestra de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua).



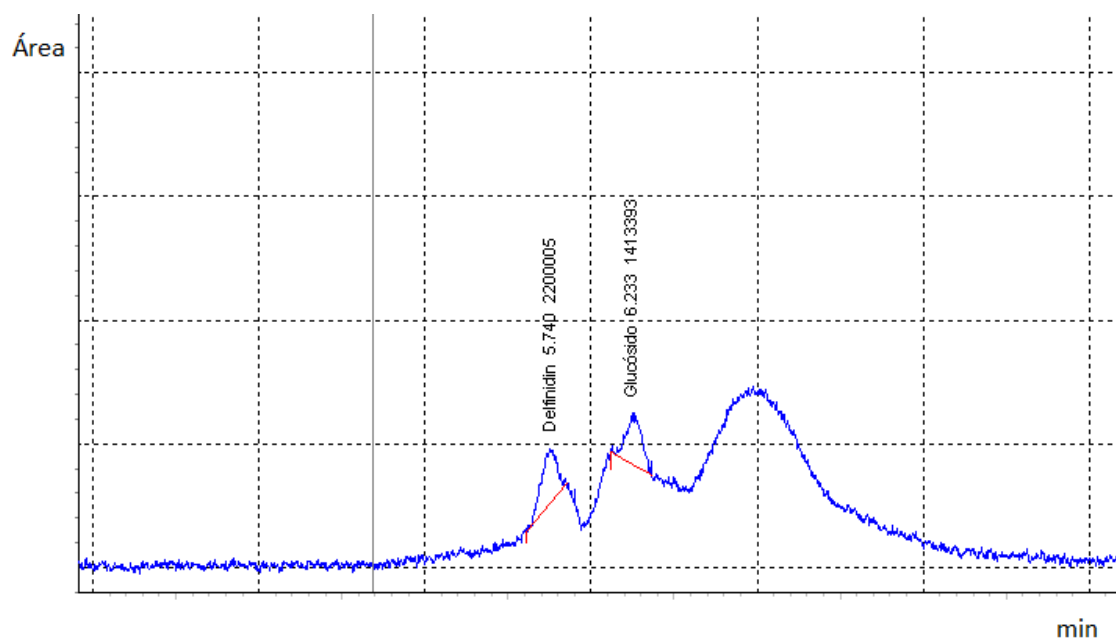
FiguraN°53: Espectro de la muestra de *Zea mays L.* (Maíz morado).



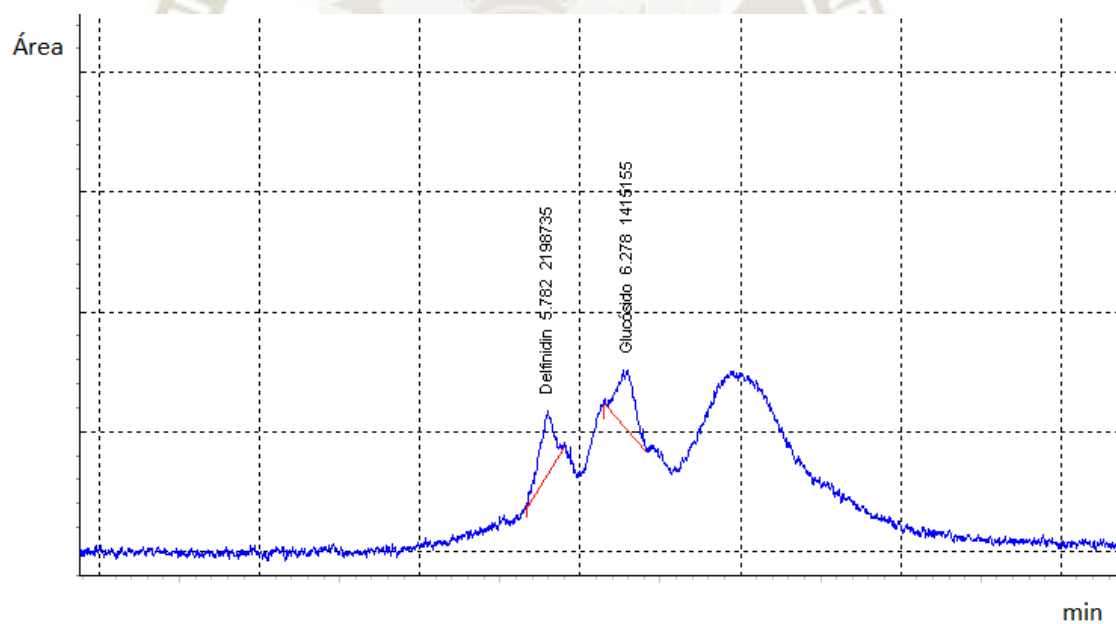
FiguraN°54: Espectro de la muestra de *Zea mays L.* (Maíz morado).



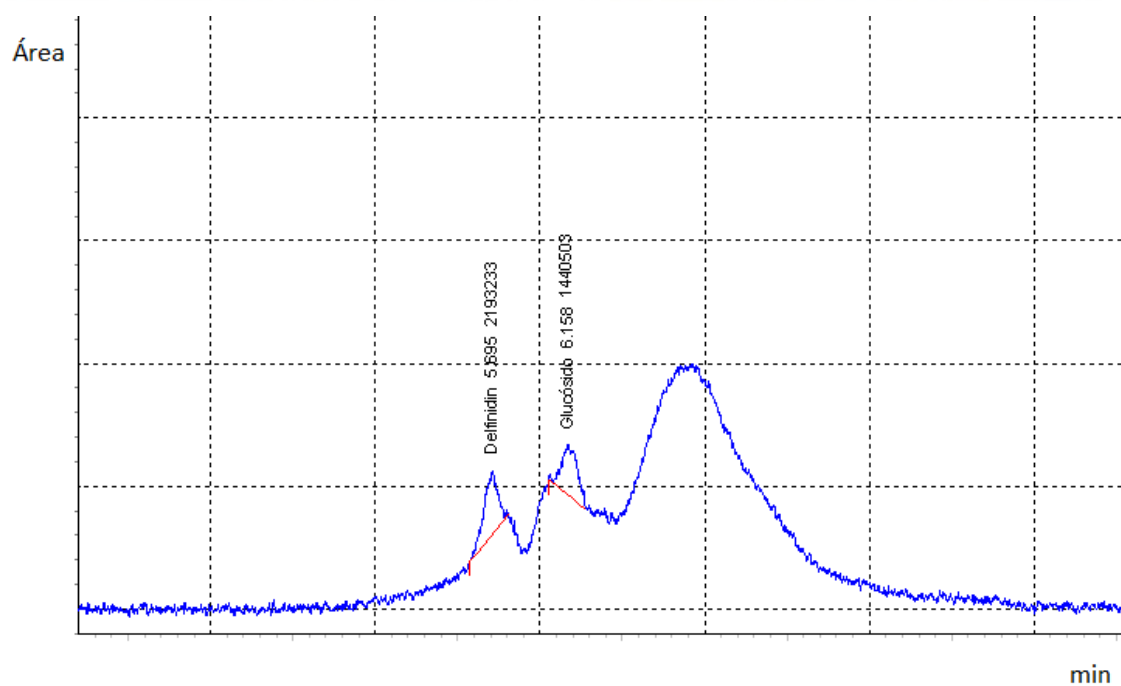
FiguraN°55: Espectro de la muestra de *Zea mays L.* (Maíz morado).



FiguraN°56: Espectro de la muestra de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano).



FiguraN°57: Espectro de la muestra de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano).



FiguraN°58: Espectro de la muestra de *Vaccinium corymbosum* L. (Arándano).

TABLAS

ANTOCIANINAS TOTALES

Tabla N°1: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

| Mashua | | | | |
|---------------------|----|--|----------|----------|
| Variables | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Repeticiones | | |
| | | 1ra | 2da | 3ra |
| 15 | 2 | 166.3626 | 152.5861 | 160.1006 |
| | 3 | 154.4647 | 153.2123 | 155.0909 |
| | 4 | 94.1400 | 102.9069 | 104.3680 |
| | 5 | 69.0916 | 68.2567 | 70.5528 |
| | 6 | 70.3441 | 80.1546 | 72.6401 |
| 21 | 2 | 169.2849 | 168.8675 | 165.5277 |
| | 3 | 171.1636 | 178.6781 | 179.3043 |
| | 4 | 140.0619 | 138.3920 | 138.8095 |
| | 5 | 116.0572 | 116.6835 | 113.7612 |
| | 6 | 106.0379 | 100.4020 | 104.3680 |
| 30 | 2 | 168.2413 | 161.5617 | 166.3626 |
| | 3 | 190.9935 | 192.0372 | 192.2459 |
| | 4 | 128.1639 | 117.3097 | 123.1543 |
| | 5 | 120.4407 | 118.5621 | 110.2126 |
| | 6 | 77.2323 | 66.7955 | 76.8149 |
| 35 | 2 | 77.4411 | 69.3004 | 74.7275 |
| | 3 | 113.9699 | 118.3533 | 115.8485 |
| | 4 | 135.2610 | 110.0039 | 134.0086 |
| | 5 | 130.0426 | 128.3727 | 126.4941 |
| | 6 | 103.3243 | 94.3487 | 96.6448 |
| 45 | 2 | 161.5617 | 161.1442 | 160.5180 |
| | 3 | 146.5327 | 150.0812 | 149.0375 |
| | 4 | 128.3727 | 127.3290 | 131.2950 |
| | 5 | 105.4117 | 98.5234 | 107.7078 |
| | 6 | 113.9699 | 115.4310 | 96.2273 |

Tabla N°2: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado).

| Maíz morado | | | | |
|-----------------------------|-----------|--|------------|------------|
| Variables | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Repeticiones | | |
| | | 1ra | 2da | 3ra |
| 15 | 2 | 158.4307 | 163.6491 | 156.3433 |
| | 3 | 164.4840 | 162.6054 | 165.1102 |
| | 4 | 157.8045 | 159.4743 | 158.0132 |
| | 5 | 188.6974 | 176.3820 | 192.4546 |
| | 6 | 222.3039 | 220.8428 | 221.8864 |
| 21 | 2 | 235.4543 | 239.2115 | 247.1435 |
| | 3 | 179.0955 | 179.3043 | 178.6781 |
| | 4 | 180.7654 | 181.1829 | 179.9305 |
| | 5 | 90.3827 | 91.6351 | 92.6788 |
| | 6 | 145.4890 | 141.7318 | 142.1493 |
| 30 | 2 | 263.6336 | 257.5803 | 261.7550 |
| | 3 | 135.4697 | 142.9842 | 140.0619 |
| | 4 | 111.2563 | 103.5331 | 107.4991 |
| | 5 | 136.9309 | 127.7465 | 129.8338 |
| | 6 | 85.1643 | 82.8682 | 84.7468 |
| 35 | 2 | 228.9835 | 216.8768 | 222.7214 |
| | 3 | 169.9112 | 173.6684 | 167.6151 |
| | 4 | 125.8678 | 119.6058 | 123.5717 |
| | 5 | 165.3190 | 161.7704 | 159.6831 |
| | 6 | 151.7511 | 150.2900 | 153.6297 |
| 45 | 2 | 211.4496 | 234.8281 | 228.7747 |
| | 3 | 122.1106 | 127.5377 | 131.5037 |
| | 4 | 105.8292 | 110.0039 | 108.7515 |
| | 5 | 95.6011 | 98.1059 | 98.3147 |
| | 6 | 94.9749 | 94.1400 | 95.8099 |

Tabla N°3: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentado de *Vaccinium corymbosum* L.(Arándano).

| Arándano | | | | |
|---------------------|----|--|---------|---------|
| Variables | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Repeticiones | | |
| | | 1ra | 2da | 3ra |
| 15 | 2 | 30.6842 | 29.6405 | 29.4318 |
| | 3 | 12.7329 | 13.3591 | 15.4465 |
| | 4 | 37.9900 | 36.3201 | 36.5288 |
| | 5 | 18.3688 | 15.6552 | 19.2037 |
| | 6 | 6.8883 | 5.8446 | 6.0533 |
| 21 | 2 | 35.4851 | 33.6065 | 34.2327 |
| | 3 | 40.4948 | 41.7472 | 38.6162 |
| | 4 | 15.4465 | 10.8543 | 14.4028 |
| | 5 | 20.0387 | 19.2037 | 20.4561 |
| | 6 | 17.1164 | 18.1600 | 18.9950 |
| 30 | 2 | 34.4414 | 31.5191 | 32.1454 |
| | 3 | 47.1743 | 46.1307 | 46.3394 |
| | 4 | 23.3784 | 20.4561 | 22.1260 |
| | 5 | 28.1794 | 26.3007 | 25.8833 |
| | 6 | 21.0823 | 21.2911 | 20.0387 |
| 35 | 2 | 27.1357 | 26.7182 | 26.3007 |
| | 3 | 31.3104 | 30.4755 | 30.0580 |
| | 4 | 29.2230 | 28.5968 | 29.0143 |
| | 5 | 9.1844 | 8.9757 | 8.3494 |
| | 6 | 30.2667 | 31.1017 | 29.6405 |
| 45 | 2 | 16.0727 | 17.1164 | 16.9076 |
| | 3 | 14.6115 | 15.8639 | 15.0290 |
| | 4 | 11.4805 | 12.9416 | 11.6892 |
| | 5 | 3.3398 | 2.9223 | 3.1310 |
| | 6 | 11.2717 | 12.1067 | 11.4805 |

ANTOCIANINAS TOTALES EN EL TIEMPO

Tabla N° 4: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) en relación al tiempo

| Mashua | | | | | |
|---------------------|----|------------------|--|----------|----------|
| Variables | | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Tiempo (Días) | Repeticiones | | |
| | | | 1ra | 2da | 3ra |
| 30 | 3 | 1 | 174.9208 | 178.2606 | 171.9985 |
| 30 | 3 | 2 | 180.7654 | 180.1392 | 184.1052 |
| 30 | 3 | 3 | 203.3089 | 202.8914 | 200.1779 |
| 30 | 3 | 4 | 189.5323 | 188.0711 | 189.5323 |

Tabla N°5: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado) en relación al tiempo

| Maíz morado | | | | | |
|---------------------|----|------------------|--|----------|----------|
| Variables | | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Tiempo (Días) | Repeticiones | | |
| | | | 1ra | 2da | 3ra |
| 30 | 3 | 1 | 156.5520 | 157.3869 | 158.2219 |
| 30 | 3 | 2 | 162.3966 | 165.5277 | 164.0665 |
| 30 | 3 | 3 | 205.3962 | 210.6147 | 208.5273 |
| 30 | 3 | 4 | 101.4457 | 130.0426 | 110.2126 |

Tabla N° 6: Repeticiones de antocianinas totales del extracto fermentados de *Vaccinium corymbosum L.*(Arándano). en relación al tiempo

| Arándano | | | | | |
|---------------------|----|------------------|--|---------|---------|
| Variables | | | Contenido de antocianinas totales (AT) (mg Cianidina/100 mL extracto) | | |
| Temperatura (°C) | pH | Tiempo (Días) | Repeticiones | | |
| | | | 1ra | 2da | 3ra |
| 30 | 3 | 1 | 34.8589 | 29.0143 | 31.3104 |
| 30 | 3 | 2 | 45.2957 | 46.3394 | 45.7132 |
| 30 | 3 | 3 | 92.4701 | 88.9216 | 90.5914 |
| 30 | 3 | 4 | 48.4268 | 47.3831 | 52.6015 |

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla N°7: Repeticiones de la capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Tropaeolum tuberosum* (Mashua)

| Mashua | | | |
|----------------------------------|----------------------------|---------|---------|
| | Capacidad antioxidante (%) | | |
| Concentración de extractos (g/L) | Repeticiones | | |
| | 1ra | 2da | 3ra |
| 4 | 101.8750 | 93.1250 | 92.1875 |
| 3 | 85.0000 | 79.6875 | 86.8750 |
| 2 | 82.1853 | 81.5025 | 81.3124 |
| 1 | 64.3750 | 55.6250 | 56.2500 |

Tabla N° 8: Repeticiones de la capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Zea mays L.* (Maíz morado)

| Maíz morado | | | |
|----------------------------------|----------------------------|---------|---------|
| | Capacidad antioxidante (%) | | |
| Concentración de extractos (g/L) | Repeticiones | | |
| | 1ra | 2da | 3ra |
| 4 | 77.1875 | 85.9375 | 90.0000 |
| 3 | 82.8125 | 83.4375 | 84.3750 |
| 2 | 84.3750 | 79.6875 | 80.0000 |
| 1 | 81.5625 | 73.7500 | 75.3125 |

Tabla N° 9: Repeticiones de la capacidad antioxidante del extracto fermentado de *Vaccinium corymbosum L.* (Arándano).

| Arándano | | | |
|----------------------------------|----------------------------|---------|---------|
| | Capacidad antioxidante (%) | | |
| Concentración de extractos (g/L) | Repeticiones | | |
| | 1ra | 2da | 3ra |
| 4 | 74.0625 | 77.1875 | 74.375 |
| 3 | 71.5625 | 72.1875 | 64.6875 |
| 2 | 58.4375 | 52.8125 | 52.8125 |
| 1 | 52.5000 | 50.9375 | 51.2500 |

Tabla N° 10: Repeticiones de la capacidad antioxidante del Trolox

| Trolox | | | |
|--|-----------------------------------|------------|------------|
| | Capacidad antioxidante (%) | | |
| Concentración de extractos (u/mL) | Repeticiones | | |
| | 1ra | 2da | 3ra |
| 1 | 36.2500 | 38.1250 | 33.7500 |
| 2 | 57.8125 | 55.6250 | 58.4375 |
| 3 | 74.0625 | 75.0000 | 74.3750 |
| 4 | 85.3125 | 87.1875 | 84.0625 |

PURIFICACION DE ANTOCIANINAS

Tabla N° 11: Repetibilidad de Antocianinas (Cianidina-3-glucósido)

| | Cianidina-3-glucósido (área) | | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|
| Concentración del estándar (ppm) | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Cianidina promedio | Desviación estándar | CV |
| 2 | 486231 | 523498 | 505869 | 505199 | 18643 | 3.69 |
| 4 | 1123658 | 1098625 | 1158963 | 1127082 | 30314 | 2.69 |
| 6 | 1756982 | 1635896 | 1785693 | 1726190 | 79504 | 4.61 |
| 8 | 2269852 | 2285698 | 2368547 | 2308032 | 53003 | 2.30 |
| 10 | 2896547 | 2965834 | 2963587 | 2941989 | 39370 | 1.34 |

| | Cianidina-3-glucósido (área) | | | | | |
|---|-------------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|-----------|
| Concentración del estándar (ppm) | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Cianidina promedio | Desviación estándar | CV |
| 2 | 493256 | 503569 | 523698 | 506841 | 15483 | 3.05 |
| 4 | 1135698 | 1082568 | 1125689 | 1114652 | 28232 | 2.53 |
| 6 | 1853269 | 1793325 | 1723659 | 1790084 | 64866 | 3.62 |
| 8 | 2256894 | 2356987 | 2365897 | 2326593 | 60525 | 2.60 |
| 10 | 2836574 | 2965314 | 2864578 | 2888822 | 37708 | 234 |

Tabla N° 12: Repetibilidad de Antocianinas (Delfinidina-3-glucósido)

| Concentración del estándar (ppm) | Delfinidina-3-glucósido (Área) | | | | | CV |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|---------------------|------|
| | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Delfinidina promedio | Desviación estándar | |
| 2 | 501526 | 506846 | 517843 | 508738 | 8321 | 1.64 |
| 4 | 1144607 | 1162292 | 1135062 | 1147320 | 13816 | 1.20 |
| 6 | 1736602 | 1704642 | 1707559 | 1716268 | 17670 | 1.03 |
| 8 | 2320168 | 2278001 | 2340562 | 2312910 | 31906 | 1.38 |
| 10 | 2900498 | 2867031 | 2900884 | 2889471 | 19435 | 0.67 |

| Concentración del estándar (ppm) | Delfinidina-3-glucósido (Área) | | | | | CV |
|----------------------------------|--------------------------------|--------------------|----------------|----------------------|---------------------|------|
| | Día del análisis | Analista diferente | Solvente nuevo | Delfinidina promedio | Desviación estándar | |
| 2 | 490532 | 513864 | 519543 | 507980 | 15375 | 3.03 |
| 4 | 1133613 | 1168310 | 1136762 | 1146228 | 19188 | 1.67 |
| 6 | 1725608 | 1710660 | 1709259 | 1715175 | 9062 | 0.53 |
| 8 | 2309174 | 2284019 | 2342262 | 2342262 | 29211 | 1.26 |
| 10 | 2889504 | 2873049 | 2902584 | 2888379 | 14800 | 0.51 |

Carbosynth



CERTIFICATE of ANALYSIS

Cyanidin-3-O-glucoside chloride

Batch Number : MC094731602
 Product Code: MC09473
 Synonyms: Kuromanin chloride
 CAS Number: 7084-24-4
 Chemical Formula: $C_{21}H_{21}O_{11}\cdot Cl$
 Molecular Weight: 484.85

| | SPECIFICATION | RESULTS |
|----------------|------------------|------------------|
| Appearance: | Red-brown powder | Red-brown powder |
| Purity (HPLC): | min 96% | 99.7% |

Carbosynth



CERTIFICATE of ANALYSIS

Delphinidin 3-glucoside chloride

Batch Number : MD448951601
Product Code: MD44895
Synonyms: Myrtilin chloride
CAS Number: 6906-38-3
Chemical Formula: $C_{21}H_{21}O_{12}Cl$
Molecular Weight: 500.84

SPECIFICATION

Appearance: Orange to dark red to black powder
Purity (HPLC): min 95%

RESULTS

Black powder
Conforms