

**UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA**

**Escuela Profesional de Ingeniería de Alimentos**



*Una Institución Adventista*

**Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del extracto acuoso de antocianina obtenida por extracción asistida por microondas a partir de la cáscara de Sauco (*Sambucus peruviana* H.B.K.)**

**Autor:**

Bach. Bill Tomas Aliaga

**Asesor:**

Ing. Oscar Amado Crisóstomo Gordillo

Lima, septiembre de 2019

## DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA DEL INFORME DE TESIS


Yo Oscar Amado Crisóstomo Gordillo de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura; Escuela profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, de la Universidad Peruana Unión.

### DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: **“Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del extracto acuoso de antocianina obtenida por extracción asistida por microondas a partir de la cáscara de Sauco (*Sambucus Peruviana* H.B.K.)”** constituye la memoria que presenta el **Bachiller Bill Tomas Aliaga**, para aspirar al título de Profesional de ingeniería de alimentos, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente constancia en Lima, 4 de septiembre del 2019.

  
Ing. Oscar Amado Crisóstomo Gordillo

Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del extracto acuoso de antocianina obtenida por extracción asistida por microondas a partir de la cáscara de Sauco (*Sambucus peruviana* H.B.K)

## TESIS

Presentada para optar el Título Profesional de Ingeniero de Alimentos

### JURADO CALIFICADOR

Dr. Rodrigo Alfredo Matos Chamorro  
**Presidente**

MSc. Silvia Pilco Quesada  
**Secretaria**

Dr. Julio Florencio Paredes Guzmán  
**Vocal**

Ing. Guido Fulgencio Anglas Hurtado  
**Vocal**

Ing. Oscar Amado Crisostomo Gordillo  
**Asesor**

Lima, 18 de setiembre de 2019

## **DEDICATORIA**

A Dios el que me da la fuerza y sabiduría para poder culminar mi carrera profesional.

Con mucho cariño a mis padres Julio Francisco Tomas Nieto y Grizel Aliaga Vigil, por su sacrificio y confianza, también a mis hermanos Miguel Ángel, Julio Francisco y Jazmin Liz por el apoyo incondicional que siempre me brindaron en mi vida universitaria.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darnos las fuerzas necesarias para cumplir nuestras metas y porque nos brinda sabiduría y conocimiento.

A mis padres: Julio Francisco Tomas Nieto y Grizel Aliaga Vigil, porque siempre están apoyándome moralmente dando sus consejos en los momentos indicados y por su gran apoyo incondicional para realización de este trabajo de investigación.

A mi asesor el Ing. Oscar Crisóstomo Gordillo, por su valioso tiempo prestado, la paciencia y apoyo en la búsqueda de informaciones científicas.

A la Facultad de Ingeniería y Arquitectura, a la Escuela Académico Profesional de Ingeniería de Industrias Alimentarias, de la misma manera a los encargados de los tres distintos laboratorios por habernos brindado el espacio para la ejecución de esta investigación.

A la docente Ing. Ketty Arellano Lino por su apoyo desinteresado y su disposición en resolver mis dudas.

## ÍNDICE GENERAL

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	17
CAPITULO II. REVISIÓN DE LA LITERATURA	21
2. Sauco	21
2.1. Generalidades del Sauco	21
2.2. Taxonomía del Sauco	22
2.3. Nombre Comunes	22
2.4. Descripción Botánica	23
2.5. Variedades	24
2.6. Fruto o Baya	24
2.6.1. Piel o hollejo	24
2.6.2. Pulpa	25
2.6.3. Semillas	25
2.7. Maduración	25
2.8. Beneficios en la salud	25
2.10. Antocianinas	26
2.11. Estructura general de las antocianinas	26
2.12. Factores fisicoquímicos que determinan la estabilidad de las Antocianinas	27
2.12.1. Efecto del pH	27
2.12.2. Efecto de temperatura	28
2.12.3. Efecto de la co-pigmentación	28
2.12.4. Efecto del oxígeno	28
2.13. Compuesto Fenólicos	29
2.14. Antioxidantes	29
2.15. Uso del Sauco	30

2.16. Vida Útil (Shelf life)	30
2.17. Colorantes Naturales	30
2.17.1. Carotenoides	31
2.17.2. Betalaínas	32
2.17.3. Antocianinas	32
2.17.4. Clorofilas	33
2.18. Espectrofometría	34
2.18. Método de Extracción	34
2.18.1. Extracción Asistida por Microondas (EAM)	34
2.19. Contenido de Antocianinas por el Método de pH Diferencial	35
2.20. Determinación de Compuesto fenólicos	35
2.21. Determinación de capacidad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	36
2.22. Diseño taguchi	36
2.22.1. Factor Ruido	37
2.22.2. Función de pérdida de calidad	37
2.23. Antecedentes bibliográficos	37
CAPITULO III. Materiales y Métodos	40
3.1. Lugar de Ejecución	40
3.2. Materia Prima	40
3.3. Materiales y equipos	40
3.3.1. Reactivos	40
3.3.2. Materiales	40
3.3.3. Equipos	41
3.4. Metodología Experimental	41

3.4.1. Caracterización de la materia prima	41
3.4.2. Obtención de cáscaras de sauco	41
3.4.2.1. Recepción de Materia Prima	41
3.4.2.2. Selección	41
3.4.2.3. Lavado	41
3.4.2.4. Desinfección	41
3.4.2.5. Separación	41
3.4.2.6. Secado	42
3.4.2.7. Molienda	42
3.4.2.8. Tamizado	42
3.5.3. Lixiviación del extracto acuoso de antocianina	42
3.5.3.1. Dilución	43
3.5.3.2. Extracción	43
3.5.3.3. Filtrado	43
3.5.3.4. Envasado	43
3.5.4. Validación del extracto acuoso de antocianina óptimo	44
3.5.5. Evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina	44
3.6. Método de Análisis	45
3.6.1. Análisis fisicoquímicos	45
3.6.1.1. Contenido de Humedad	45
3.6.1.2. Contenido de Proteína	46
3.6.1.3. Contenido de Grasa	46
3.6.1.4. Contenido de Ceniza	46
3.6.2 Análisis de Compuesto Bioactivos	47
3.6.2.1. Contenido de antocianinas por el método pH Diferencial	47



3.6.2.2. Determinación de rendimiento de extracción	48
3.6.2.3. Determinación de compuestos fenólicos (CF)	48
3.6.2.4. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH	48
3.7. Diseño Estadístico	49
3.7.1. Extracción del extracto acuoso de antocianina por EAM	49
3.7.2. Evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina	51
3.8. Análisis Estadístico	52
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1. Análisis proximal de la cáscara	53
4.2. Extracto acuoso de antocianina por EAM	54
4.2.1. Contenido de Antocianinas	56
4.2.2. Contenido de Compuestos Fenólicos	58
4.2.3. Rendimiento de antocianinas	60
4.3. Validación del extracto acuoso de antocianina optimo	61
4.4. Estabilidad del Extracto Acuoso de Antocianina	62
4.4.1. Estabilidad de Contenido de Antocianinas	63
4.4.2. Estabilidad de Compuestos Fenólicos	64
4.4.3. Estabilidad de Capacidad Antioxidante por DPPH	65
V. CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69
ANEXOS	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Identificación de antocianinas de sauco .....	22
<b>Figura 2.</b> Planta de Saucó.....	23
<b>Figura 3.</b> Estructura física del fruto del sauco .....	24
<b>Figura 4.</b> Localización de antocianinas a nivel subproducto .....	26
<b>Figura 5.</b> Estructura general de las antocianinas R1 y R2 (H) o Azúcares R (OH, H).....	27
<b>Figura 6.</b> Estructura de las antocianinas a diferentes pH .....	28
<b>Figura 7.</b> Ejemplos de estructuras de Compuestos Fenólicos .....	29
<b>Figura 8.</b> Estructura química de carotenoides tradicionales .....	31
<b>Figura 9.</b> Estructura química de indicaxantina (a), vulgaxantina (b) derivadas de betaxantina.; betanidina (c) y betanina (d), derivadas de betacianina. ....	32
<b>Figura 10.</b> Estructura química de las antocianinas .....	33
<b>Figura 11.</b> Estructura de 10-Hidroxiclorofila $\alpha$ (a) y 10-Metoxilactona de la clorofila (b)...	34
<b>Figura 12.</b> Captación del radical libre del DPPH $\cdot$ y formación de DPPH .....	36
<b>Figura 13.</b> Obtención de cáscara del sauco .....	42
<b>Figura 14.</b> Lixiviación del extracto acuoso de antocianina de cáscara de Saucó.....	44
<b>Figura 15.</b> Estabilidad del extracto acuoso de antocianina de cáscara de sauco .....	45
<b>Figura 16.</b> Gráfico señal/ruido, para cada factor y sus interacciones consideradas en el contenido de antocianinas .....	57
<b>Figura 17.</b> Gráfico señal/ruido, para cada factor y sus interacciones consideradas en la determinación de compuestos fenólicos. ....	60
<b>Figura 18.</b> Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de antocianinas .....	64
<b>Figura 19.</b> Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de compuesto fenólicos .....	65
<b>Figura 20.</b> Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre capacidad antioxidante	66
<b>Figura 21.</b> Recepción de materia prima.....	81
<b>Figura 22.</b> Acondicionamiento de la cáscara .....	81
<b>Figura 23.</b> Cáscara de sauco molido.....	82
<b>Figura 24.</b> Harina de cáscara de sauco.....	82
<b>Figura 25.</b> Extracción del extracto .....	82
<b>Figura 26.</b> Filtración del extracto .....	83

<b>Figura 27.</b> Extracto envasado .....	83
<b>Figura 28.</b> Extracto diluido para la lectura de absorbancia .....	83
<b>Figura 29.</b> Extracto diluido para la lectura de absorbancia de compuestos fenólicos .....	83
<b>Figura 30.</b> Extracto diluido para la lectura de absorbancia de capacidad antioxidante ....	84
<b>Figura 32.</b> Determinación de humedad .....	84
<b>Figura 31.</b> Determinación de proteína .....	84
<b>Figura 33.</b> Extractos con diferentes pH .....	85

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Paleta de color de luz absorbido y color de luz reflejado.....	34
<b>Tabla 2.</b> Validación de factores óptimos .....	44
<b>Tabla 3.</b> Factores o variables independientes con niveles codificados para la obtención del extracto. ....	49
<b>Tabla 4.</b> Arreglo ortogonal Taguchi L18(2x3 <sup>5-7</sup> ). ....	50
<b>Tabla 5.</b> Factores o variables independientes con niveles codificados para la evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina .....	51
<b>Tabla 6.</b> Diseño Factorial completo 4x2x4. ....	51
<b>Tabla 7.</b> Resultados de Análisis Proximal en base seca(bs).....	53
<b>Tabla 8.</b> Resultados de la extracción de antocianinas por extracción asistida por microondas .....	55
<b>Tabla 9.</b> ANOVA de contenido de antocianinas por extracción asistida por microondas..	56
<b>Tabla 10.</b> ANOVA del contenido de Compuestos Fenólicos por EAM .....	58
<b>Tabla 11.</b> Resultados de la evaluación de la estabilidad en almacenamiento.....	62

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Extracción de antocianinas por EAM .....	81
<b>ANEXO 2.</b> Análisis de concentración de antocianinas. ....	83
<b>ANEXO 3.</b> Análisis de compuesto fenólicos.....	83
<b>ANEXO 4.</b> Análisis de antioxidante por el método DPPH .....	83
<b>ANEXO 5.</b> Caracterización de materia prima .....	84
<b>ANEXO 6.</b> Extracción de la estabilidad fisicoquímica de antocianina.....	84
<b>ANEXO 7.</b> Curva estándar para la cuantificación de compuesto fenólico .....	85
<b>ANEXO 8.</b> Curva estándar de Inhibición para la cuantificación de antioxidante .....	86
<b>ANEXO 9.</b> ANOVA, de la estabilidad de antocianinas en el almacenamiento .....	86

## NOMENCLATURA Y/O SÍMBOLOS

ABTS	2,2' azinobis-3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico.
ANOVA	Análisis de Varianza
Bs	Base seca
CF	Compuesto Fenólicos
CICAL	Centro de Investigación de Ciencia de Alimentos
CITAL	Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos
DPPH	2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAM	Extracción asistida por microondas
FRAP	Reducción ferrica/ Poder antioxidante
GL	Grados de Libertad
MS	Medio Cuadrático
MP	Materia Prima
$P_i$	Potencia de irradiación (watts)
PW	Papel Whantan
$T_e$	Tiempo de extracción (seg)
$T_h$	Tiempo de homogenización (min)
SS	Suma de cuadros
UV	Ultravioleta
$V_f$	Variación funcional
$V_p$	Variación del proceso
VIS	Visible
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (CAET- Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox)

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del extracto acuoso de antocianina obtenida por extracción asistida por microondas a partir de la cáscara de Sauco (*Sambucus peruviana* H.B.K.). Se realizaron los análisis aproximales (humedad, proteína, grasa cruda y ceniza) de la harina de la cascara de sauco. Se extrajo el extracto acuoso de antocianina de la cáscara del sauco empleando el diseño ortogonal Taguchi L18(2x3<sup>5-7</sup>), con los siguientes factores de: dos diferentes tiempos de homogenización (10 y 20 min), tres diferentes diluciones (1:15,1:30 y 1:45), disolventes (0,25 y 50%), tiempo de extracción (30,60 y 90 seg) y potencia de irradiación. (400,550 y 700 watts). Posteriormente se estudió la máxima estabilidad del extracto acuoso de antocianina bajo diferentes condiciones de almacenamiento en Tiempo (0,7,14 y 21 días), Temperatura (4 y 20°C) y pH (2.5; 3.5;4.5) empleando el diseño factorial completo 4x2x4.El ANOVA mostro significancia (p-valor < 0.05) en el contenido de antocianinas y compuestos fenólicos del diseño ortogonal Taguchi, también en el diseño factorial completo 4x2x4, en el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. En el diseño Taguchi en los análisis experimentales se obtuvo que el tratamiento 9 un mayor contenido de antocianina de  $270 \pm 0.00$  mg/100ml, compuestos fenólicos  $101.60 \pm 0.00$  mg/100ml y rendimiento de  $55.43 \pm 0.01$   $\mu$ mol/100ml con factores de (10min,1:15,50%,90 seg y 700 watts) pero en la gráfica de señal de ruido se obtuvo mejores factores a (10min, 1:15,50%, 30 seg y 400 watts), de lo cual se validó con los factores de la gráfica haciendo un nuevo extracto acuoso de antocianina, donde se quedó con los mejores factores de la gráfica de señal de ruido porque se obtuvieron mejores resultados y finalmente se estudió la máxima estabilidad del extracto acuoso de antociana que fue extraído con los mejores factores del diseño taguchi L18, se aplicó el diseño factorial completo 4x2x4, donde se obtuvo que a temperatura 4°C con un pH 2.5 fueron más estables el contenido de antocianina, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante, mientras que a temperaturas de 20°C y pH 2.5 se observó una disminución mayor en el contenido de antocianina, compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes durante el almacenamiento.

**Palabra claves:** Sauco, Taguchi, Antocianinas, Fenólicos, Antioxidante

## ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of storage conditions on the stability of the aqueous anthocyanin extract obtained by microwave-assisted extraction from the Sauco shell (*Sambucus peruviana* H.B.K.). Approximate analyzes were performed (moisture, protein, crude fat and ash). of elderflower flour. The aqueous anthocyanin extract of the elder husk was extracted using the orthogonal design Taguchi L18 ( $2 \times 3^{5-7}$ ), with the following factors of: two different homogenization times (10 and 20 min), three different dilutions (1:15, 1:30 and 1:45), solvents (0.25 and 50%), extraction time (30.60 and 90 sec) and irradiation power. (400,550 and 700 watts). Subsequently, the maximum stability of the aqueous anthocyanin extract was studied under different storage conditions in Time (0,7,14 and 21 days), Temperature (4 and 20 ° C) and pH (2.5; 3.5; 4.5) using the factorial design Complete  $4 \times 2 \times 4$ . ANOVA showed significance (p-value <0.05) in the content of anthocyanins and phenolic compounds of the orthogonal design Taguchi, also in the complete  $4 \times 2 \times 4$  factorial design, in the content of anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity. In the Taguchi design in the experimental analyzes it was obtained that treatment 9 had a higher anthocyanin content of  $270 \pm 0.00$  mg / 100ml, phenolic compounds  $101.60 \pm 0.00$  mg / 100ml and yield of  $55.43 \pm 0.01$   $\mu$ mol / 100ml with factors of (10min, 1: 15.50%, 90 sec and 700 watts) but in the noise signal graph better factors were obtained (10min, 1: 15.50%, 30 sec and 400 watts), of which it was validated with the factors of the graph making a new aqueous extract of anthocyanin, where it remained with the best factors of the noise signal graph because better results were obtained and finally the maximum stability of the aqueous extract of anthocyanin that was extracted with the best factors was studied of the taguchi L18 design, the full  $4 \times 2 \times 4$  factorial design was applied, where it was obtained that at a temperature of 4 ° C with a pH 2.5 the anthocyanin content, phenolic compounds and antioxidant capacity were more stable, while at temperatures of 20 ° C and pH 2.5 A greater decrease in anthocyanin content, phenolic compounds and antioxidant capacity was observed during storage.

**Keyword:** Elder, Taguchi, Anthocyanins, Phenolic, Antioxidant



## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

En el Perú se generan 22 mil 277 toneladas diarias de residuos sólidos, el 52,8% (11 mil 727 toneladas) tienen por destino final un relleno sanitario, el 41,9% (9 mil 339 toneladas) es dirigido a un botadero, el 4,8% (1 mil 79 toneladas) es tratado mediante reciclaje, el 0,4% (98 toneladas) son quemadas o incineradas y el 0,1% (34 toneladas) se destinan al compostaje o planta de tratamiento (Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2018). Hay pocas industrias que se interesa en aprovechar los residuos orgánicos como pigmentos naturales por su bajo contenido de sustancias químicas o por falta de estudios científicos (Harborne & Williams, 2000). Los residuos pueden ser manejados, pero si el hombre no le da un adecuado tratamiento se convierte en una potencial amenaza tanto para el hombre como para la naturaleza (Reyes, 2007).

Existen publicaciones sobre diversos temas en particular del Sauco, sin embargo, no se cuenta con un documento que contenga información total sobre el fruto en su transformación e industrialización de sus residuos (cáscara y semilla). El sauco contiene un alto contenido de antocianinas, antioxidantes, de los cuales se pueden obtener extractos muy ricos. Por lo tanto, las antocianinas, que pertenecen al grupo de flavonoides, son compuestos solubles en agua que proporcionan tonos rojos, morados y azules. (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). También son buenos antioxidantes capaces de prevenir problemas de toxicidades, reacciones de intolerancias y alérgicas, esto hacen que las antocianinas como colorante natural de las bayas del sauco sean sustitutos potenciales de los colorantes artificiales (Bratu, Doroftei, Negreanu, & Porta, 2012).

El consumo de antioxidante se asocia a la dieta rica en frutas es por eso que pocas personas conocen sobre los beneficios del sauco que ayuda tener un bajo riesgo de contraer enfermedades como pérdida de memoria, crónicas (algunos tipos de cáncer) y del corazón por su contenido alto de actividad antioxidante principalmente se debe a las condiciones de la naturaleza, protegen al organismo del daño producido por los rayos UV, estrés, sustancias químicas presentes en los alimentos, contaminación ambiental, debido a los flavonoides (Flores, 2017).

Las propiedades del antioxidante son moduladas por las diferentes hidroxilaciones y glucosilaciones, y la cianidina 3-glucósido es la antocianina con mayor poder antioxidante

(Prior, Cao, Martin, Sofic, Ewen, O'Brien, Lischner, Ehkenfeldt, Kalt, Krewer, Maily, 1998; Wang, Race, & Shrikhye, 2003). Atribuyen antocianinas y capacidad antioxidante en las bayas del sauco aproximadamente 50% (Kalt, Lawy, Ryan, McDonald, Donner, Forney, 2003). Las antocianinas son colorantes naturales permitidos por la Comunidad Económica Europea y por la Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos (FDA). Es beneficioso para la salud, debido a su capacidad antioxidante, para prevenir y combatir enfermedades como el cáncer, problemas al corazón, entre otros (Fuentes, 2005).

El color, la estabilidad química y las propiedades nutricionales de las antocianinas cambia bruscamente en los alimentos tratados térmicamente o durante el almacenamiento inadecuado (Xiani, Solène, & Weibiao, 2016). Las antocianinas son importantes por dos razones. La primera porque es tecnológico, es decir, sobre las características organolépticas que influye sobre el comportamiento tecnológico durante el procesamiento agroindustrial y la segunda razón es la implicación de la antocianina en la salud humana a través de diferentes vías (Pascual & Sanchez, 2007).

Las antocianinas se usan como colorante natural en la industria alimentaria debido a sus actividades biológicas, tales como sus propiedades neuroprotectoras y anticancerígenas (Philpott, Gould, Lim, & Ferguson, 2004; Talavéra, Felgines, Texier, Besson, Mazur, Lamaison, & Rémésy, 2006). Otra propiedad importante de las antocianinas es su actividad antioxidante, ya que los estudios de investigaciones sobre el consumo de antioxidantes en la actualidad indican que los alimentos, ricos en antioxidantes son provenientes de frutas y vegetales que son consumidos a través de una dieta que proporcionan innegables beneficios que desempeña un papel vital en la prevención de las enfermedades neuronales y cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, entre otros (Fuentes, 2005; Konczak & Zhang, 2004).

Los colorantes artificiales tienen baja estabilidad debido que sufren diversas transformaciones de pH, temperatura, oxígeno y luz, por esta razón se recomienda sustituir con colorantes naturales en los alimentos. El color juega un papel importante en todos los alimentos y las personas a menudo lo toman como un indicador de calidad. Una clase de colorantes son las antocianinas que generalmente se derivan de fuentes

naturales, como frutas, verduras, legumbres y cereales (Castañeda-Ovando,y otros, 2009).

Lo ideal del colorante natural sería que el color y el contenido de antocianina se mantuviera a lo largo del proceso de manipulación e industrialización ya que el color viene a ser un atributo de importancia dentro de la opinión publica de las personas, pero no es así debido a que sufre cambios de temperatura provocando pérdidas del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo, con la reproducción de chalconas incoloras, esto hace que el colorante natural pierda su intensidad de color al inicio de cada proceso. (Baudi, 2006).

### **Objetivo General**

- Evaluar el efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la estabilidad del extracto acuoso de antocianina obtenida por extracción asistida por microondas a partir de la cáscara de Sauco (*Sambucus peruviana* H.B.K.).

### **Objetivos Especifico**

- Extraer el extracto acuoso de antocianina de la cáscara del sauco empleando el diseño ortogonal Taguchi L18(2x3<sup>5-7</sup>), con los siguientes factores de: dos diferentes tiempos de homogenización, tres diferentes diluciones, disolventes, tiempo de extracción y potencia de irradiación.
- Estudiar la máxima estabilidad del extracto acuoso de antocianina bajo diferentes condiciones de almacenamiento en Tiempo, Temperatura y pH; empleando el diseño factorial completo 4x2x4.

## CAPITULO II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 2. Sauco

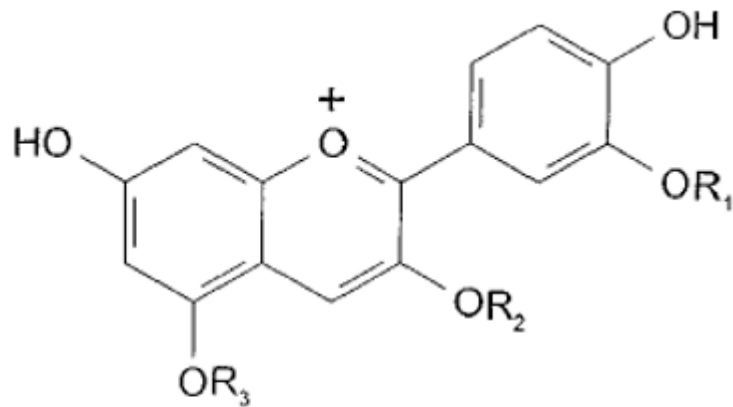
#### 2.1. Generalidades del Sauco

En la actualidad existe muchas variedades de sauco en el mundo, pero en Sudamérica y en el Perú las especies más utilizadas son, *Sambucus Peruviana H.B.K.*, *Sambucus Austrails* y *Sambucus Nigra*. Son originarias del Perú y regiones adyacentes, su distribución es desde Argentina hasta Costa Rica. En el Perú crece entre 2,800 a 3,900 msnm, pero el óptimo rango está entre 3,200 a 3,800 msnm, los departamentos de Ancash, Lima, Huánuco, Junín, Cusco y Apurímac, se favorecen con este rango altitudinal óptimo (Blanco & Sierra, 2005).

En el Perú son producidos mayormente en los departamentos de Huánuco, Ancash, Apurímac y Cusco. En Latinoamérica el mayor cultivo del sauco es en el Ecuador porque tiene uso medicinal, mientras que el Perú es más importante para las pequeñas industrias campesinas porque su fruto es empleado para elaboración de zumo, mermelada, además las hojas sirven para teñir de azul metálico para los vinos, el tronco del árbol se utiliza como leña, aunque no es de buena calidad, su tallo joven es empleado para hacer quenás y sopladores para atizar el fuego y finalmente en algunos lugares de la sierra a las flores se utiliza para preparar refresco (Comisión Nacional Contra la Biopiratería, 2017).

En el sauco se encuentra cuatro antocianinas primarias que son: cianidina-3-O-sambubiósido-5-O-glucósido, cianidina-3-O-sambubiósido, cianidina-3-O-glucósido y cianidina (Chandra, Rana, & Li, 2001; Mills, 1997), como se muestra en la figura 1. Otros flavonoides reportados son el hiperosido, isoquercetina y rutosido. Estos flavonoides polifenólicos son de particular interés debido a sus propiedades beneficiosas para la salud (anticancerígenas y antioxidantes), como se informa también para otros tipos de bayas (Häkkinen, Kärenlampi, Heinonen, Mykkänen , & Törrönen , 1999).

El sauco tiene alto contenido de antioxidante, vitamina C o E, son capaces de mejorar la respuesta del sistema inmunológico a través de la producción elevada de citoquinas y sobre todo se han utilizado en la medicina popular europea para evitar los estragos de resfriados, asma, artritis e incluso estreñimiento para miles de años (Kilham, 2000).



**Antocianinas de Sauco:**

1. Cianidina-3-O-sambubiósido-5-O-glucósido (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= sam, R<sub>3</sub>= hex)
  2. Cianidina-3-O-sambubiósido (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= sam, R<sub>3</sub>= H)
  3. Cianidina-3-O-glucósido (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>= hex, R<sub>3</sub>= H)
  4. Cianidina (R<sub>1</sub>= R<sub>2</sub>= R<sub>3</sub>= H)
- (hex= hexosa, sam= sambubiósido)

**Figura 1.** Identificación de antocianinas de sauco (Chandra, Rana, & Li, 2001)

**2.2. Taxonomía del Sauco**

Clasificación taxonómica del sauco (*Sambucus Peruvian*.H.B.K.) (Justo, 2017).

**Reino:** Vegetal

**División:** Fanerógamas

**Subdivisión:** Angiospermas

**Clase:** Rubiales

**Familia:** Caprifoliáceas

**Género:** Sambucus

**Especie:** Sambucus Peruvian H.B.K.

**2.3. Nombre Comunes**

Los nombres comunes varían de acuerdo a las zonas donde se distribuye esta especie como son: "Sauco" (Andahuaylas, Lima), "Rayan" (Cuzco), "Uvas de la sierra", "Uvilla del diablo", "Pochko uvas" (Ancash), "Layan", "Pintura de novia" (San Jeronimo), "Ccola ccola", "Kjola" (Aymara), "Sauco" (Bolivia y Colombia), "Sauco blanco", "Tilo" (Ecuador) (Pretell, Ocaaea, John, & Barahona, 1985).

## 2.4. Descripción Botánica

Se encuentra de 20 a 50 especies principalmente en zonas templadas y en los trópicos, no crece en forma silvestre, es decir, es cultivado y se propaga por estacas con facilidad. Es un frutal exento de plagas y enfermedades, es poco exigente en suelos. El peso promedio de 1000 frutos es de 763.45g, correspondiendo 45.73 g (5.99%) a las pieles u hollejos, 640.23g (83.86%) a la pulpa y 77.73 g (10.15%) a las semillas (Linares, 2013).

En el Perú, el periodo de fructificación del sauco se da en forma escalonada durante todo el año, depende de las condiciones climáticas, suministro de agua y el piso altitudinal en el que se desarrolla; después de realizada la fecundación. lo normal de la etapa de floración es de noviembre a diciembre y se cosecha en el mes enero a marzo y también florecen en el mes de abril a junio y se cosecha en el mes de agosto a septiembre. (Caballero & Soria, 2017; Linares, 2013).

Sus flores que son de color blanco, el fruto es una baya negra de 3 a 5 huesecillos, Es arbusto con muchas ramas que alcanza 5 m de altura, con la copa redondeada y muy densa. Las hojas son compuestas, formadas por 5 ó 7 hojuelas dispuestas por parejas, con una impar en la terminación, de forma aovada con el borde regularmente aserrado. (Linares, 2013). Como se muestra en la figura 2.



**Figura 2.** Planta de Sauco (Schellenberg & Wilhelm, 1914)

## 2.5. Variedades

Existen entre 20 y 50 variedades diferentes de saúco. Pero todas estas variedades están destinadas al uso ornamental. No se han desarrollado variedades para el cultivo extensivo. Los arbustos de saúco crecen de forma silvestre en gran parte de Europa el saúco (*Sambucus Nigra L.*), y los principales saucos son: *Sambucus australis* ("Saúco austral"; zona templada del Este de Sudamérica) y el *Sambucus canadensis*; *Sambucus Nigra L.* ("Saúco de Canadá"; Este de Norteamérica); con frutos negro azulado (Tapia & Fries, 2007).

## 2.6. Fruto o Baya

El fruto del saúco posee una estructura similar a los frutos de uva y se compone con las siguientes características de piel u hollejo, pulpa y semillas descrito por (Cahuana, 1991). También se puede apreciar en la figura 3.

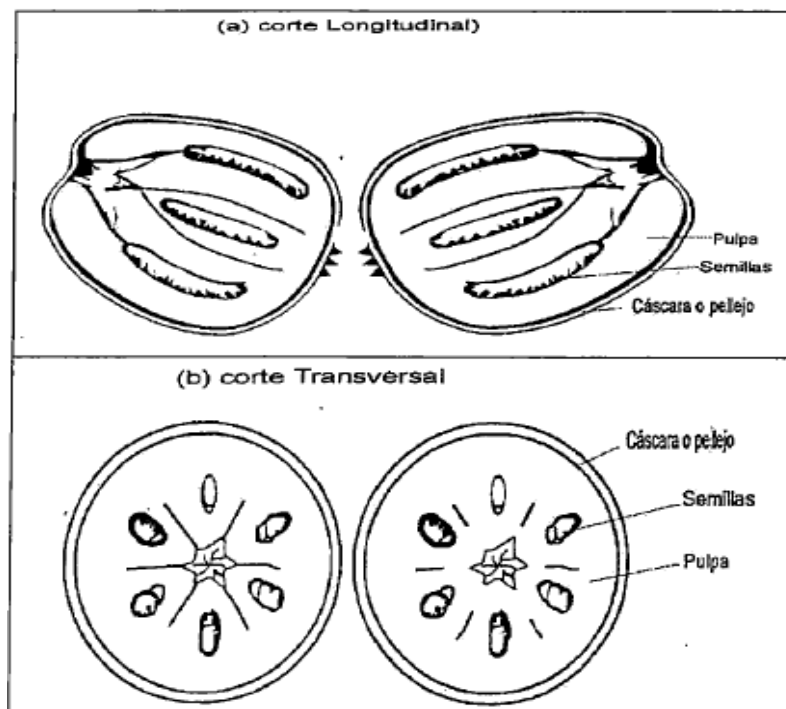


Figura 3. Estructura física del fruto del saúco (Cahuana, 1991)

### 2.6.1. Piel o hollejo

Es una membrana fija que rodea al fruto, en el hollejo se encuentran sustancias aromáticas, y el color del fruto se debe a la presencia de la cianidina, los cuales son pigmentos naturales que están presentes en las células de la piel, cuya cantidad e intensidad de color desempeñan, un papel importante en el fruto. (Cahuana, 1991).



### **2.6.2. Pulpa**

Constituye la mayor parte del fruto que es de color verde transparente brillante, muy jugoso y agridulce. En ella se encuentran alojadas las semillas y es la parte del fruto que contiene la mayor cantidad de agua, ácidos, compuestos nitrogenados, azúcares y sales minerales. (Cahuana, 1991).

### **2.6.3. Semillas**

En los frutos de sauco normalmente desarrollados existen pepitas o semillas cuyo número oscila de 4 a 6. Son de color crema, forma alargada y ligeramente arqueadas. Tiene sabor amargo y astringente. Las semillas se encuentran comúnmente cubiertas por una gruesa capa incolora y transparente de naturaleza coloidal. (Cahuana, 1991).

### **2.7. Maduración**

El progreso de la maduración de las bayas es conocido exteriormente por su coloración y por la facilidad en el desprendimiento de los frutos del racimo (Lovera, 2007). En el inicio de su estado de madurez son de coloración verdosa, luego cambian de tonalidad a marrón verdoso y en su madurez presentan una tonalidad de morado intenso, pulpa color guinda, semillas pequeñas e infértiles en su mayoría las bayas alcanza a desarrollar un contenido máximo de azúcar y menor contenido de ácidos en los meses de Febrero a Marzo (Pérez, 2014).

La maduración del sauco al iniciar se torna rojizos, por la producción de un pigmento rojo en la célula de la piel (Pigmento predominante Cianidina). En la etapa de maduración al iniciar es de 2,3 °Brix, con una acidez de 1,75 a 1,93% y pH 1,6 a 2,2 y al finalizar logra tener 7,2 °brix, con una acidez de 0,92 a 1,37 % y pH 3,2 a 3,8 (Justo, 2017).

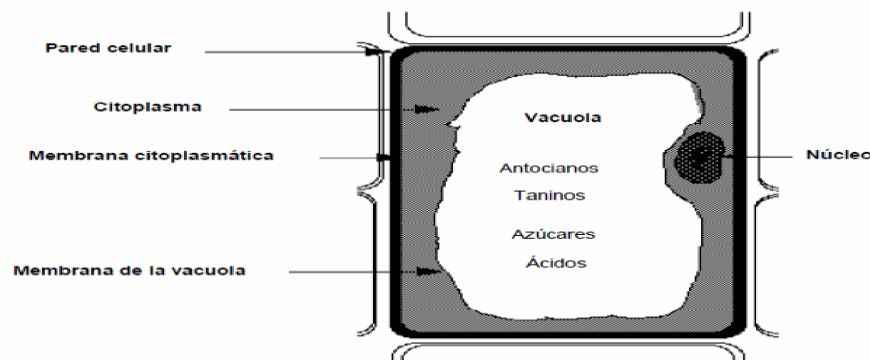
### **2.8. Beneficios en la salud**

Las hojas, flores y el fruto del sauco se emplean en medicina tradicional para la curación de reumatismos, “chupus” tumores) y también en la preparación de formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de algunas dolencias en las afecciones de la garganta. Tienen principios activos que favorecen la sudoración, facilitan la expulsión de la mucosidad y contribuyen a reducir la inflamación de las vías respiratorias, por lo que su empleo es muy útil en afecciones respiratorias como los resfriados, la bronquitis, la gripe, las alergias respiratorias (Tejero, 2012; De Callier, 1981), como un alimento aperitivo Influye favorable en la digestión y asimilación (Justo,2017).

Las bayas contienen compuestos flavonoides (incluyendo antocianinas y proantocianidinas) en mayores cantidades en frutos antocionaco, y también otros compuestos secundarios como (glucósidos iridoides, sesquiterpenos, triterpenos y fitoesteroles) han demostrado la capacidad para contrarrestar o interferir con el progreso de muchas enfermedades crónicas (Flores, 2017).

## 2.10. Antocianinas

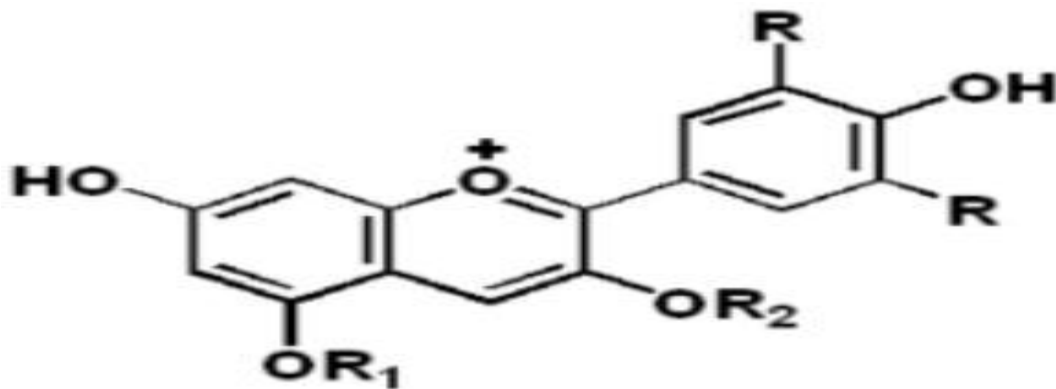
El color del fruto se debe a la presencia de cianidina, que son pigmentos naturales que se encuentra en las células de la piel, cuya cantidad e intensidad de color y están presentes en las hojas, sobre todo al final del ciclo vegetativo. A nivel subcelular, estas moléculas hidrosolubles se encuentran normalmente dentro de las vacuolas (Figura 4), donde se acumulan en unas vesículas esféricas denominadas “antocianoplastos” o “inclusiones antocianinas vacuolares” (Markham, Gould, Winefield, Mitchell, Bloor, & Boase, 2000). Logra tener una mayor longitud en el detrimento del citoplasma en la etapa de maduración.



**Figura 4.** Localización de antocianinas a nivel subproducto (Romero, 2008)

## 2.11. Estructura general de las antocianinas

Son compuestos de pigmentos solubles en agua ampliamente distribuidos en las plantas y contribuyen a una amplia gama de colores que incluyen: azul, violeta y rojo que pertenecen al grupo flavonoide de compuestos fenólicos y se ha informado que los flavonoides tienen muchos efectos potenciales para la salud. (Jackman & Smith 1996, Andersen & Jordheim, 2006; Schwartz, Von-Elbe, & Giusti, 2008). como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Estructura general de las antocianinas R1 y R2 (H) o Azúcares R (OH, H) (Fenema, 2000).

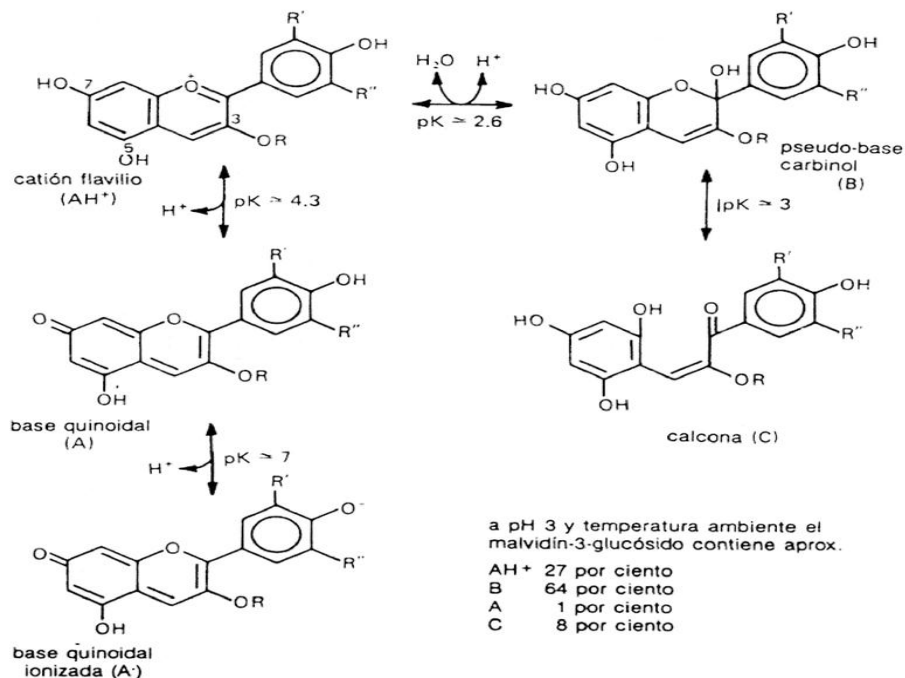
## 2.12. Factores fisicoquímicos que determinan la estabilidad de las Antocianinas

Las investigaciones sobre la estabilidad de antocianinas y la variación de color con pH concluyen que los cambios en el color de estos compuestos son más significativos en la región alcalina debido a su inestabilidad (Cabrita, Fossen, & Andersen, 2000). Una de sus mayores ventajas de las antocianinas se puede sustituir con los colorantes sintéticos, en la industria alimentaria, pero es limitada, por su baja estabilidad durante el procesamiento y el almacenamiento (Cevallos-Casals & Cisneros-Zevallos, 2004).

### 2.12.1. Efecto del pH

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ión oxonio o catión flavilio (AH<sup>+</sup>) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta.

Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A<sup>-</sup>) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999), como se muestra en la, figura 6.



**Figura 6.** Estructura de las antocianinas a diferentes pH (Coultrate,1984)

### 2.12.2. Efecto de temperatura

Al incremento de temperatura resultan en pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de cetonas aromáticas incoloras (Timberlake, 1980).

### 2.12.3. Efecto de la co-pigmentación

Es un fenómeno en el cual los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros, o iones metálicos, forman asociaciones moleculares o complejas, generando un cambio o un incremento en la intensidad del color (Boulton, 2001). En la ciencia de los alimentos, este fenómeno se considera una interacción muy importante porque el color es uno de los principales factores de calidad cruciales en la aceptación de un producto (Eiro & Heinonen, 2002).

### 2.12.4. Efecto del oxígeno

La pérdida de antocianinas ante la presencia de oxígeno depende del pH y se relaciona a la concentración presente de la pseudo-base. La presencia de oxígeno acelera la destrucción de pelargonina-3-glucósido en ambas soluciones de buffer de pH

1-4.5 y tiene una retención de color mejorada cuando el oxígeno es removido por calentamiento, que también puede ser por vacío (Kallio, Pangborn, & Jennings, 1986).

### 2.13. Compuesto Fenólicos

El término compuesto fenólico, engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenolicas (nombre popular del hidroxibenceno), unidas a estructuras aromáticas o alifáticas (Gimeno, 2004).

Los compuestos fenólicos comprenden aproximadamente ocho mil compuestos que aparecen en la naturaleza, todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol, un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo, son uno de los principales metabolismos secundarios de las plantas y también están asociados al color, las características sensoriales (sabor, astringencia, dureza), las características nutritivas y las propiedades antioxidantes de los alimentos de origen vegetal. Sus características antioxidantes se deben a la reactividad del grupo fenol (Kähkönen, Hopia, & Aleinonen, 2001; Paladino, 2008). Como se aprecia en la figura 7.

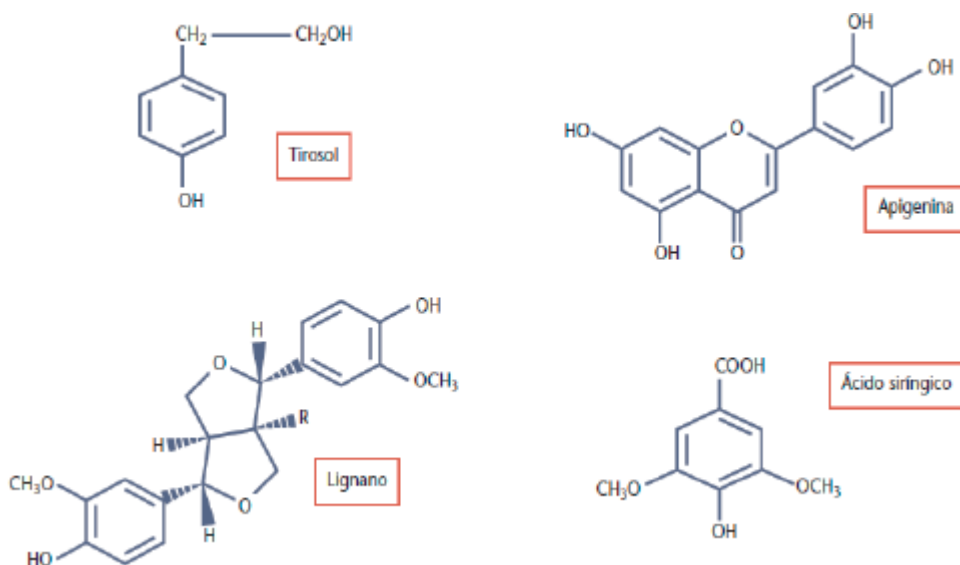


Figura 7. Ejemplos de estructuras de Compuestos Fenólicos (Gimeno, 2004)

### 2.14. Antioxidantes

Se consume habitualmente alimentos ricos en antioxidantes en frutas y vegetales, que previene efectos perjudiciales sobre las funciones fisiológicas normales de los seres humanos. (Patthamakanokporn, Puwastien, & Nitithamyong, 2008). El antioxidante

neutraliza la oxidación de los radicales libres mediante la liberación de electrones, que son aprovechados por los radicales libres, cumpliendo una función preventiva en el crecimiento del envejecimiento y de ciertas enfermedades neurodegenerativas. El antioxidante, al interactuar con el radical libre le cede un electrón, debilitando su acción y en algunos casos, como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes (Lourdes, García, Rojo, & Sanchez, 2002).

Los radicales libres tienen un electrón desapareado en su orbital mas externo, por lo que son muy reactivos, llegando a tener una buena estabilidad al captar un electrón en moléculas estables. El radical libre consigue robar el electrón que necesita, la molécula estable que lo cede se convierte en un nuevo radical libre porque tiene un electrón desapareado, empezando así una verdadera reacción de cadena que puede eventualmente destruir las células (Avello & Suwalsky, 2006).

### **2.15. Uso del Sauco**

Se cultiva de manera ornamental y medicinal en climas templados y fríos. Se elaborarán mermeladas, jarabes y vinos con los frutos frescos y maduros. (Alzate, Idárraga, Díaz, & Rodríguez, 2013). Es de mayor importancia el sauco para tener en las chacras porque es una especie melífera. Se consumen en estado maduro, si esta pinto o demasiado verde originan toxicidad. Produce indigestión la semilla estando maduro, por esta razón no se debe exagerar el consumo directo del fruto fresco (Grajales, Botero, & Ramírez, 2015).

### **2.16. Vida Útil (Shelf life)**

La vida útil o Shelf life, se define en los alimentos como el tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento, en las que tendrá una pérdida de sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas, y sufrirá un cambio en su perfil microbiológico. (Carrillo, 2013).

### **2.17. Colorantes Naturales**

Los diversos colores de las plantas se deben normalmente a cuatro clases de compuestos pigmentados: carotenoide, betalaína, antocianina y clorofila. Además de estas cuatro clases principales de pigmentos, hay algunos pigmentos menos comunes. Por lo general, los pigmentos de las cuatro clases (carotenoides, betalaínas,

antocianinas, clorofilas), están presentes, pero en diversas cantidades en diferentes partes de la planta. Los diferentes compuestos de pigmentos tienen colores variables, pero en las plantas estos compuestos son importantes para sus otras propiedades y funciones. Posiblemente para la planta, el color es solo importante para la coloración de flores, frutas para atraer insectos y otros animales para la polinización y la dispersión de semillas (Kaimainen, 2014).

### 2.17.1. Carotenoides

Son compuestos terpenoides solubles en aceite de color rojo, naranja o amarillo ubicados en los cloroplastos y cromoplastos de las plantas y tienen muchas funciones en las plantas, incluida la recolección de luz y la foto protección. Los carotenoides se encuentran en todos los tejidos vegetales fotosintéticos y son probablemente los pigmentos más difundidos en la naturaleza, los seis carotenoides tradicionales son:  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína, zeaxantina, violaxantina y fucoxantina, que se muestra en la Figura 8 (Schwartz, Von-Elbe, & Giusti, 2008).

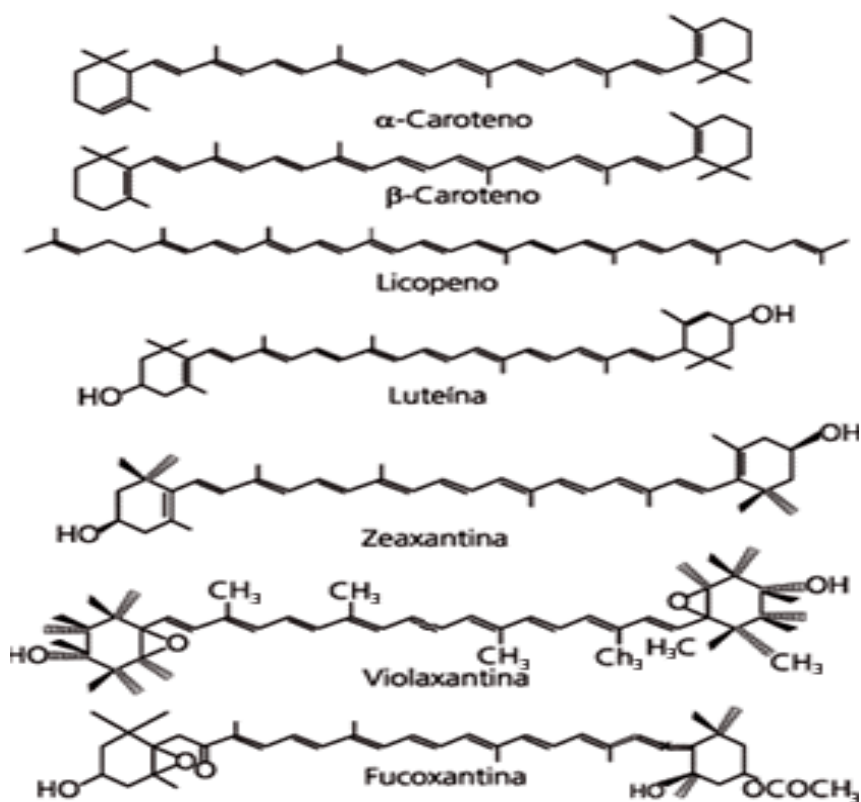
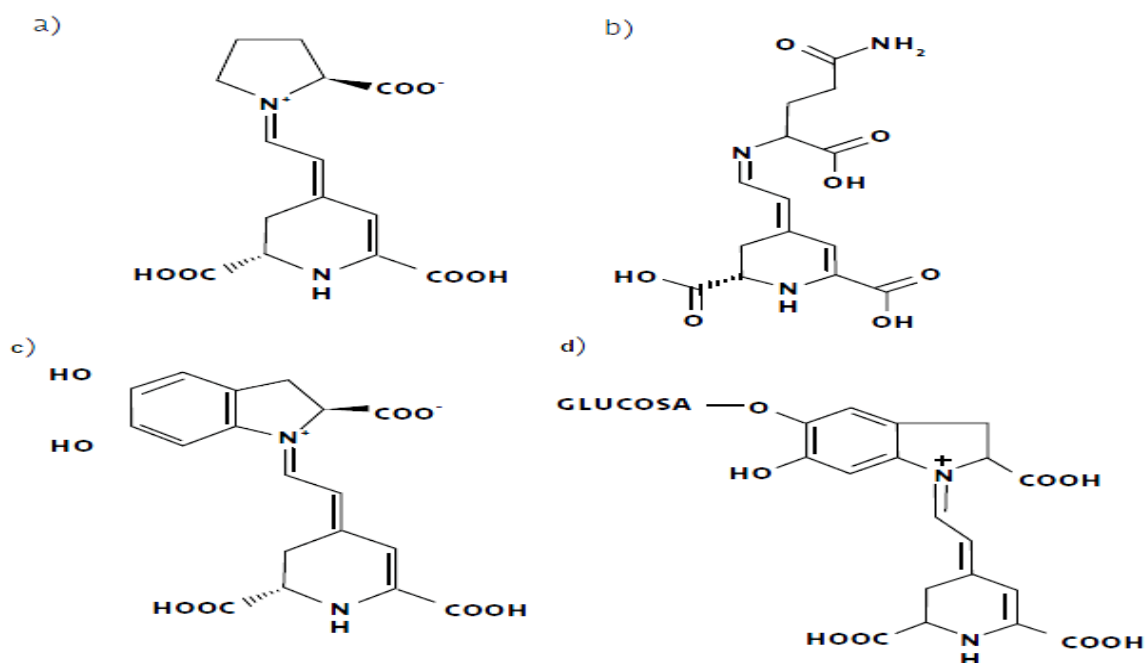


Figura 8. Estructura química de carotenoides tradicionales (López, 2003)

### 2.17.2. Betalaínas

Las betalaínas son alcaloides derivados de la tirosina que se encuentran de manera restringida en el mundo vegetal. Se han identificado dos tipos diferentes de betalaínas: las betaxantinas, de color amarillo/naranja, que son los productos de condensación del ácido betalámico y compuestos amino clasificados; y las betacianinas, de color rojo, que se forman por la glicosilación y acilación de ciclo-Dopa (ciclo-dehidroxifenilalanina), como se muestra en la Figura 9 (Ayala & Beltrán, 2007). Las betalaínas y antocianinas nunca se han encontrado en la misma planta y parece que las rutas biosintéticas de estos dos grupos de pigmentos son mutuamente excluyentes (Strack, Vogt, & Schliemann, 2003; Schwartz, Von-Elbe, & Giusti, 2008).



**Figura 9.** Estructura química de indicaxantina (a), vulgaxantina (b) derivadas de betaxantina.; betanidina (c) y betanina (d), derivadas de betacianina (González & Guerrero, 2008).

### 2.17.3. Antocianinas

Las antocianinas son glucósidos, corresponde de la familia de los flavonoides, que se compone por dos anillos aromáticos A y B asociadas por una cadena de 3 C. Variaciones estructurales del anillo B que resulta ser seis antocianinas conocidas. (Figura 10). El tipo de sustitución glucosídica y de acilación producen efectos en el tono de las antocianinas; por ejemplo: producen un desplazamiento hacia la tonalidad púrpura y también el color va



depender del número y orientación de los grupos hidroxilo y metoxilo de la molécula (Stintzing, Stintzing, Carle, & Frei, 2002).

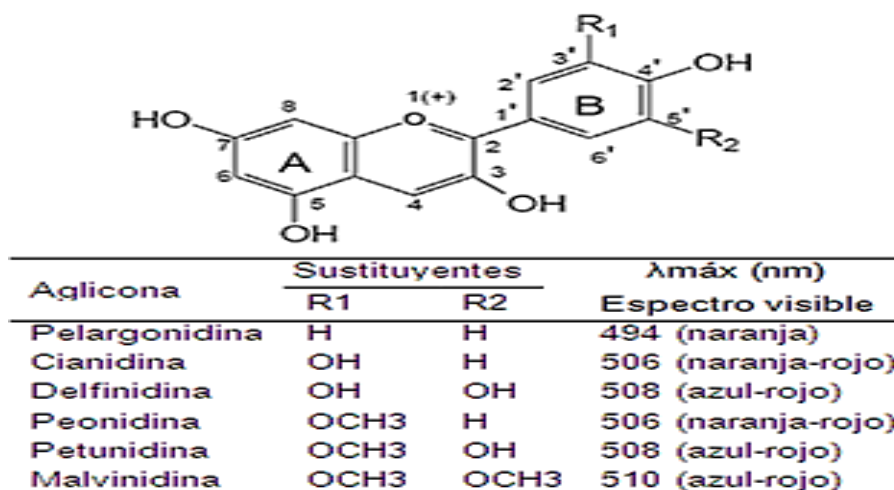
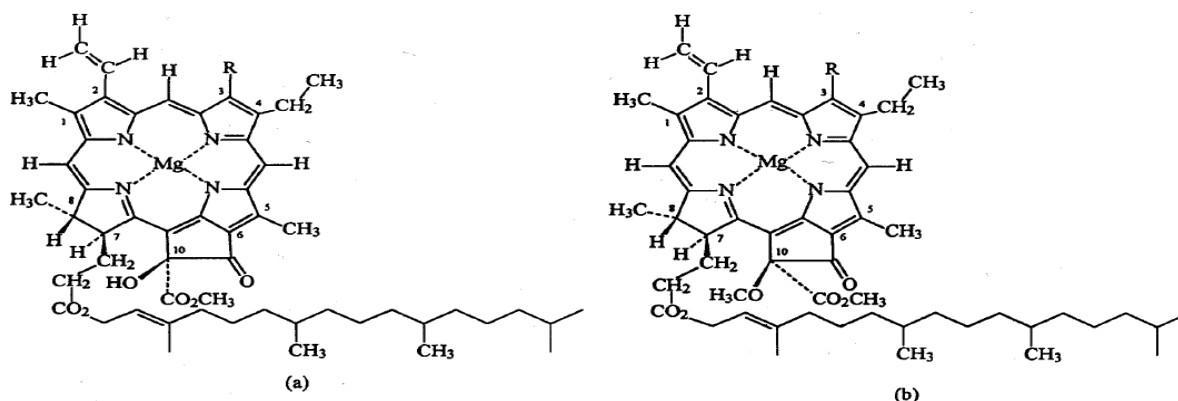


Figura 10. Estructura química de las antocianinas (Durst & Wrolstad, 2001)

#### 2.17.4. Clorofilas

Existen dos tipos de clorofila en los pigmentos se menciona que la clorofila A son esencial en la fotosíntesis, porque debe a su habilidad de absorber longitudes de onda de luz que están en el espectro de la luz, para transformar la energía del sol en energía química (en forma de glucosa) y finalmente en nutriente. (Kaimainen, 2014). La clorofila B son los principales pigmentos verdes fotógenos en organismos fotosintéticos, incluidas las plantas verdes, las algas y las bacterias, esto incrementa la habilidad de la clorofila A para absorber la luz del sol. (Schwartz, Von-Elbe, & Giusti, 2008). (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura de 10-Hidroxiclorofila  $\alpha$  (a) y 10-Metoxilactona de la clorofila (b) (Fenema, 2000)

## 2.18. Espectrofometría

Es el estudio de la interacción de las ondas electromagnéticas y la materia. La dispersión de los rayos del sol por las gotas de lluvia para producir un arco iris y la apariencia de un espectro colorido cuando un rayo de luz estrecho pasa a través de un prisma de vidrio triangular son los ejemplos simples donde la luz blanca se separa en el espectro visible de los colores primarios. Esta luz visible es simplemente una parte de todo el espectro de la radiación electromagnética, que se extiende desde las ondas de radio hasta los rayos cósmicos. Todas estas formas aparentemente diferentes de radiaciones electromagnéticas viajan a la misma velocidad, pero característicamente difieren entre sí en términos de frecuencias y longitud de onda (Kurmar, 2006).

La espectrofotometría ultravioleta (UV) y visible (VIS) se ha convertido en el método de elección en la mayoría de los laboratorios dedicados a la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos e inorgánicos en una amplia gama de productos y procesos. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta (UV cercano, de 200-400 nm) y el visible (400-780 nm). Por tanto, para realizar mediciones de absorción es necesario utilizar la longitud de onda en la que absorbe luz la solución coloreada (Evans, 2004; Abril, Bárcena, Fernández, Galván, Jorrín, & Peinado, 2010).

**Tabla 1.** Paleta de color de luz absorbido y color de luz reflejado.

Longitud de Onda $\lambda$ (nm)	Color de luz absorbido	Color de luz reflejado
390 – 435	Violeta	Amarillo- Verdoso
435 – 490	Azul	Amarillo
490 – 580	Verde	Rojo
580 – 595	Amarillo	Azul
595 – 650	Naranja	Azul- Verdoso
650 – 780	Rojo	Verde-Azulado

Fuente: (Kurmar, 2006)

## 2.18. Método de Extracción

### 2.18.1. Extracción Asistida por Microondas (EAM)

La extracción asistida por microondas se ha incrementado significativamente como resultado de sus ventajas inherentes (reducción en el tiempo de extracción, volumen de

solvente mayor y tener mejor eficiencia de extracción) sobre técnicas de extracción convencionales como extracción solvente sólido-líquido (Ballard, Mallikarjunan, Zhou, & O'Keefe, 2010). La EAM es un proceso de uso de energía de microondas para calentar solventes de manera efectiva, de forma que los analíticos puedan dividirse fácilmente de la matriz de muestra en el solvente; puede reducir significativamente el tiempo de extracción y el consumo de solventes (Pérez-Serradilla & Luque de Castro, 2011). Es considerado como una alternativa potencial para la extracción de extractos acuoso, sólido-líquido de fitoquímicos, determinación de compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes (Li, H; Deng, Z; Wu, T; Liu, R; Loewen, S & Tsao, R, 2012).

### 2.19. Contenido de Antocianinas por el Método de pH Diferencial

Es un método seguro y rápido donde se mide el contenido total de antocianinas. Las antocianinas desarrollan transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH manifestado por el espectro a diferentes absorbancias. La forma del oxonio coloreado predomina a pH 1 y la forma hemiacetal incolora a pH 4,5. El método del pH diferencial se basa en esta reacción y se utiliza un espectrofotómetro UV- visible; las mediciones se realizan a las longitudes de onda de 520 nm (máxima longitud de onda determinada) y a 700 nm. (Hendry, 1996). Se empleará la siguiente ecuación1:

$$\left(\frac{mg}{lt}\right) = \frac{A \times PM \times Df \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (1)$$

Donde

A= Diferencia de absorbancia entre la solución de pH 1 y 4,5.

PM= Peso Molecular

Df = Factor de dilución

$\epsilon$ = Absorbancia Molar

L= Longitud

La concentración final de antocianos (mg/l) se calcula en base al volumen de extracto y peso de muestra. Se expresa en cianidina 3-glucósido g (PM= 449,9 g/mol y  $\epsilon$  = 26900)

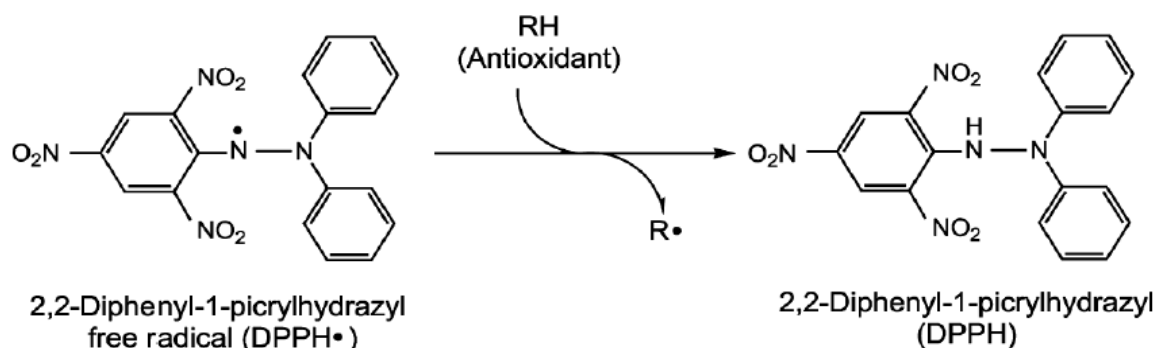
### 2.20. Determinación de Compuesto fenólicos

Según Sánchez & Paniagua (2008), se ha desarrollado un gran número de técnicas analíticas para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, pero el método más empleado es el método de Folin-Ciocalteu, para la determinación de fenoles

totales, se emplea como curva estándar el ácido gálico. En este método se utiliza como reactivo el Folin-Ciocolteu contiene una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico, en medio básico, lo que genera una mezcla de óxidos de tungsteno y molibdeno, originando óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ); y la absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm.

### 2.21. Determinación de capacidad antioxidante por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, estable en medio orgánico. La reducción del DPPH• se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. Existen varios métodos para su monitorización, pero el más común es mediante espectrofotometría UV, por su facilidad y precisión. Este radical presenta un máximo de absorción a 517 nm, volviéndose amarillo cuando se forma DPPH, de forma que el efecto antioxidante puede ser fácilmente evaluado siguiendo la pérdida de absorción UV a 517 nm. esta absorción desaparece. Los resultados se expresan como Capacidad Antioxidante Equivalente de



**Figura 12.** Captación del radical libre del DPPH• y formación de DPPH (Barea, 2015) Trolox (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995) como se observa en la figura 8.

### 2.22. Diseño taguchi

El diseño de Taguchi proporciona un método poderoso y eficiente para diseñar procesos que operan de manera consistente y óptima en una variedad de condiciones. El método de diseño experimental de Taguchi es una de las técnicas ampliamente aceptadas para el control de calidad fuera de línea de productos y procesos. El enfoque de Taguchi para el diseño de experimentos es fácil de adoptar y aplicar para usuarios con

un conocimiento limitado de estadísticas; por lo tanto, ha ganado una amplia popularidad en la comunidad científica y de ingeniería (Montgomery, 1997).

### **2.22.1. Factor Ruido**

Según Gutierrez & De la Vara (2008) los factores de ruido que actúan sobre el producto o sobre el proceso se clasifican como:

Ruido externo: se refiere al ambiente en el cual el proceso (o producto) se desempeña y a la carga de trabajo a que es sometido. Por ejemplo, es ruido externo la humedad ambiental, el polvo o los errores en la operación del equipo.

Ruido interno o deterioro: se refiere a la variación generada por el proceso de unidad a unidad producida, y que se debe a su propia naturaleza o tecnologías y la diversidad de sus componentes.

Ruido de unidad a unidad: Diferencias entre unidades que son producidas con las mismas especificaciones.

### **2.22.2. Función de pérdida de calidad**

La pérdida de la que estamos hablando es la pérdida debida a la variación funcional ( $v_f$ ) / variación del proceso ( $v_p$ ). Taguchi cuantificó esta pérdida a través de una función de pérdida de calidad. La característica de calidad es el objeto de interés de un producto o proceso. En general, la característica de calidad tendrá un objetivo. Hay tres tipos de objetivos. (Krishnaiah & Shahabudeen, 2012).

- Entre más pequeño mejor: son variables o característica de calidad medible no negativa que tiene un objetivo ideal como cero.
- Entre más grande mejor: también es una característica de calidad medible no negativa que tiene un objetivo ideal como infinito.
- Valor nominal es el mejor: cuando tenemos una característica de calidad con tolerancia bilateral, el valor nominal es el objetivo. Es decir, si todas las partes se hacen a este valor, la variación será cero y es la mejor.

### **2.23. Antecedentes bibliográficos**

**Artículo:** Extracción asistida por microondas de antocianinas de cascara de uva,

**Autores:** Liazid, A., Guerrero R., Cantos, E., Palma, M., Barroso, C. Año:2011.

La extracción asistida por microondas se aplicó como una etapa previa a la determinación cromatográfica de antocianinas en los extractos. La estabilidad de las antocianinas en las condiciones de extracción se verificó utilizando un extracto estandarizado de pieles de uva. Se evaluaron temperaturas desde 50°C hasta 150 °C. Se desarrolló un diseño experimental factorial fraccionado para analizar la influencia en el proceso de extracción de seis variables de extracción diferentes: solvente (mezclas de metanol y agua), agitación, temperatura de extracción, tiempo de extracción, potencia de microondas y volumen de extracción. El disolvente de extracción fue la variable más importante para la recuperación de la mayoría de las antocianinas de las uvas. Finalmente, también se estudió la influencia del tiempo de extracción. Con este nuevo método, las antocianinas se pueden extraer de las uvas en 5 minutos, utilizando 100 ° C como temperatura de extracción y 40% de metanol en agua como disolvente de extracción.

**Artículo:** Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. peruviana) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la obtención de Zumos Funcionales. **Autor:** Edilberto Flores **Año:**2017

El objetivo de esta investigación fue evaluar el uso de enzimas, ultrasonido, microondas y maceración para mejorar la extracción de antioxidantes de las bayas de sauco. El estudio se justifica por el gran interés por parte de los consumidores y sector empresarial en bebidas que contienen antioxidantes; El contenido de antocianinas se determinó por el método diferencial de pH, fenoles totales por el método de Folin, la capacidad antioxidante por la reducción del ion cúprico y captura del radical catión del ácido 2,2'-azino- bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico). La maceración a 70 °C por 20 minutos origina mejores características antioxidantes, seguida del uso de microondas, enzimas y ultrasonido. La combinación de enzimas-microondas mejora el proceso de extracción, dependiendo del tipo de enzima. El empleo de enzimas permitió mayores rendimientos de extracción en volumen de zumo. Con el zumo obtenido por maceración se elaboró una bebida de sauco con buenas características antioxidantes y sensoriales.

**Artículo:** Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions Autores: Mustafa Özgen, J., Scheerens, N. R., & Raymond, M. **Año:**2010.

Catorce accesiones de saúco americano púrpura-negro (*Sambucus canadensis* L.) obtenidas de varios sitios en el medio oeste de los EE. UU. Y luego cultivadas en un solo sitio de producción de Ohio en los EE. UU. Se analizaron para determinar su contenido total de antocianinas fenólicas (TP) y monoméricas totales (TMA) y su capacidad antioxidante mediante el poder antioxidante reductor férrico (FRAP) y los ensayos de eliminación de radicales DPPH. El contenido total de fenólicos y antocianinas se midió utilizando el reactivo Folin-Ciocalteu y los métodos de diferencia de pH, respectivamente. En general, el contenido de fitonutrientes y la capacidad antioxidante de nuestras accesiones de saúco fueron similares a los reportados típicamente para las frambuesas negras, moras y otras frutas pequeñas de carne oscura. La variabilidad entre las accesiones fue mayor para el contenido de TMA (CV 37.5%); los individuos oscilaron casi tres veces de 1308 a 4004  $\mu\text{g}$  de  $\text{cy3-GE}$  / g en base a un peso fresco. La variación entre las accesiones también fue evidente para los valores de TP, FRAP y DPPH (CV 14.4, 21.7 y 26.8%, respectivamente). Los valores de TP y TMA estaban muy altamente correlacionados ( $r = 0,93$ ), aunque los individuos diferían en la proporción estimada de fenoles totales atribuibles a las antocianinas. Tanto TP como TMA también están altamente correlacionados con los valores de capacidad antioxidante ( $r = 0.70\text{--}0.85$ ). Dentro de este estudio limitado de 14 accesiones, la variabilidad del contenido de fitonutrientes y la capacidad antioxidante sugirió el empleo de germoplasma silvestre dentro de un programa de mejoramiento de saúco para incorporar una variedad de rasgos superiores de horticultura, poscosecha o procesamiento en cultivares nuevos o existentes con perfiles de fitonutrientes superiores.

## **CAPITULO III. Materiales y Métodos**

### **3.1. Lugar de Ejecución**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Ciencias Químicas, Centro de Investigación en Tecnología de Alimentos (CITAL), y en el Centro de investigación en Ciencia de alimentos (CICAL), perteneciente a la Universidad Peruana Unión, km 19.5 Carretera Central, Ñaña-Lurigancho.

### **3.2. Materia Prima**

Se utilizó baya de saúco (*Sambucus peruviana* H.B.K), proveniente de Apurímac, adquiridas del mercado de frutas de Lima.

### **3.3. Materiales y equipos**

#### **3.3.1. Reactivos**

- Etanol 25% y 50%
- Agua destilada
- Buffer Cloruro de Potasio 0.025 M pH 1
- Buffer Acetato de Sodio 0.4 M pH 4.5

#### **3.3.2. Materiales**

- Gradillas
- Vaso precipitado (volumen:500ml)
- Probeta (volumen:1000ml)
- Erlenmeyer (volumen:500ml)
- Embudos
- Tubos de ensayo (volumen:10ml)
- Micropipeta (volumenes:1000 y 100  $\mu$ l)
- Cubeta de cuarzo
- Tamiz de acero inoxidable (mesh 0.60mm)
- Placa Petri
- Papel filtro N°40
- Fiolas (volumenes: 25 y 50 ml)
- Bagueta
- Film oscuro N° 15



### **3.3.3. Equipos**

- Molino Manual; Marca: Corona
- Agitador mecánico; Modelo: Typ RM18 Serie: 131-4
- UV Espectrofotómetro; Marca: MOD-UV 721
- Microondas; Marca: Moulinex, Modelo: Optimo
- pHmetro; Marca: EuroLab. Modelo: ATC
- Secador de Bandejas de tunel; Modelo: HSB01, Serie: 201803

### **3.4. Metodología Experimental**

#### **3.4.1. Caracterización de la materia prima**

Se adquirió las bayas de sauco del mercado de frutas de Lima, proveniente del Apurímac, posteriormente se almaceno a 4°C

Para su caracterización de la cáscara de sauco se realizarán los siguientes análisis:

- Contenido Humedad, Proteína, Grasa cruda y Ceniza.

#### **3.4.2. Obtención de cáscaras de sauco**

Se seguirá el procedimiento mostrado en la figura 13

##### **3.4.2.1. Recepción de Materia Prima**

Se recibió 23 kg de materia prima (bayas de sauco), envasado en polietileno, para luego ser transportadas a CITAL (Centro de Investigación de Tecnología de Alimentos).

##### **3.4.2.2. Selección**

Se separó las bayas con las ramas y se obtuvo 20 kg de baya de sauco.

##### **3.4.2.3. Lavado**

Se lavó con agua hasta que se desprenda de partículas sucias de la superficie de la baya

##### **3.4.2.4. Desinfección**

Se procedió a la desinfección con hipoclorito de sodio a 100ppm y de ahí se enjuago con agua.

##### **3.4.2.5. Separación**

De ahí se obtuvo 20 kg de baya de sauco de los cuales se metió a la maquina despulpadora agregándole 6 Litros de agua para su uso. Se obtuvo con resultado 14kg de cáscara con semilla de ahí separó manualmente y se obtuvo en este proceso 9kg de cáscara y 5 kg de semilla.

### 3.4.2.6. Secado

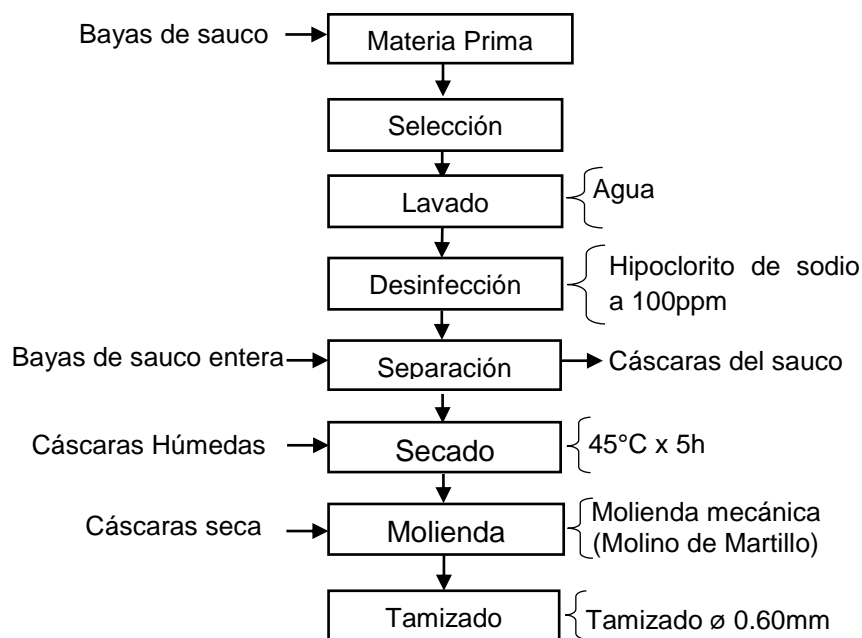
Los 9 kg de cáscara se extendieron en bandejas cubiertas con papel aluminio con una altura de 1cm, se sometieron a secarse en el secador de túnel de ventilación forzada con aire paralelo a 45°C por 5 horas, se obtuvo 3 kg de cáscara seca.

### 3.4.2.7. Molienda

La cáscara seca se introdujo en el molino de martillo manual y como resultado se obtuvo 3 kg de harina.

### 3.4.2.8. Tamizado

La harina se sometió a un análisis de distribución de tamaño de partícula, en un tamiz



con mesh de  $\varnothing$  0.60mm, para su posterior extracción.

**Figura 13.** Obtención de cáscara del sauco

### 3.5.3. Lixiviación del extracto acuoso de antocianina

La extracción de la harina de la cáscara de sauco se determinó con la metodología de extracción asistida por microondas descrito por (Li, H; Deng, Z; Wu, T; Liu, R; Loewen, S & Tsao, R, 2012). Como se muestra en la figura 14.

### 3.5.3.1. Dilución

En un vaso de precipitación se prepararon 500 ml de solución de harina de cáscara de sauco utilizando distintas proporciones de relación materia prima: solvente (1:15, 1:30, 1:45). Para ello se utilizó soluciones de 0, 25 y 50% de etanol.

Estas soluciones fueron homogenizadas en un agitador mecánico a una velocidad de 2500 rpm a 10 y 20 min

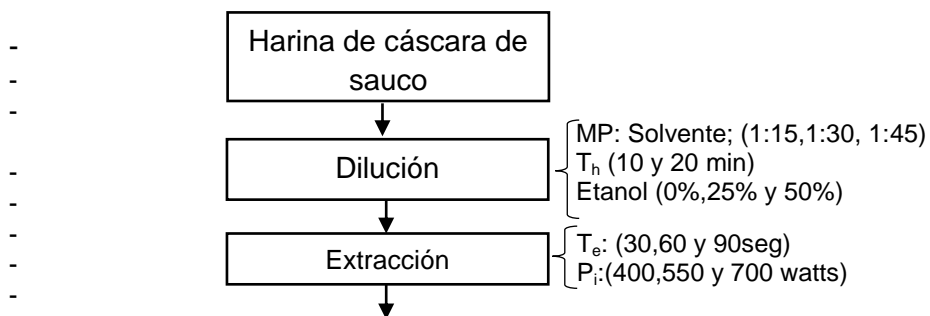
### 3.5.3.2. Extracción

Para ser posteriormente introducidas en un horno microondas para la obtención de extracto antociánico durante 30, 60 y 90 seg con potencias de irradiación de 400, 550 y 700 watts.

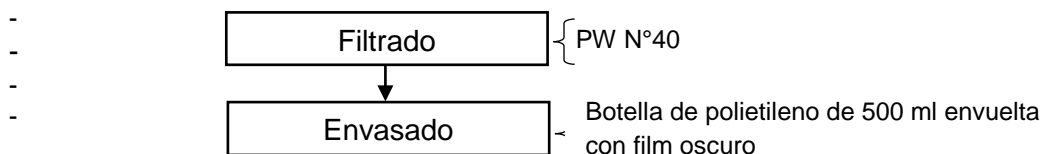
### 3.5.3.3. Filtrado

Se filtró utilizando papel Whatman N°40 que se colocó sobre un embudo en un erlenmeyer

### 3.5.3.4. Envasado



Los extractos antociánicos fueron almacenado en botella de propileno de 500ml, envuelto con film oscuro para su respectivo análisis.



**Figura 14.** Lixiviación del extracto acuoso de antocianina de cáscara de Sauco

### 3.5.4. Validación del extracto acuoso de antocianina óptimo

A partir de los parámetros óptimos obtenidos por Taguchi L18(2x3<sup>5-7</sup>) se procedió a la obtención de un extracto acuoso de antocianinas a los cuales se les realizó los análisis de compuestos bioactivos: Contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y rendimiento de antocianinas. Tabla 2.

**Tabla 2.** Validación de factores óptimos

<b>Factores</b>	<b>Cantidad</b>
Tiempo de homogenización (min)	10
Materia Prima: Solvente (g/ml)	1:15
Etanol (%)	50
Tiempo de extracción (seg)	30
Potencia de irradiación (Watts)	400
Contenido de antocianinas (mg/100ml)	273.93 ± 0.20
Compuestos fenólicos (mg/100ml)	102.69 ± 0.13
Rendimiento (µmol/100ml)	55.43 ± 0.01

### 3.5.5. Evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina

A partir del extracto acuoso de antocianina óptimo se realizó la prueba de estabilidad utilizando el método de Mojica, Berhow & Gonzalez (2017). En la figura 16.

Se tomó 500 ml de extracto acuoso y se reguló el pH utilizando ácido sulfúrico 2N y bicarbonato de sodio al 10% hasta obtener valores de 2.5; 3.5; 4.5 y 5.5.

Estas soluciones estandarizadas fueron vertidas 10ml en tubos de boro silicato con tapa rosca, envueltos con film oscuro y colocados en gradillas, los cuales serán almacenados bajo sombra a temperaturas de 4°C y 20°C, durante un período de 21 días, se empezará como Día 0, que será el primer día, de ahí se evaluará cada 7 días el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes.

**Figura 15.** Estabilidad del extracto acuoso de antocianina de cáscara de sauco

### 3.6. Método de Análisis

#### 3.6.1. Análisis fisicoquímicos

##### 3.6.1.1. Contenido de Humedad

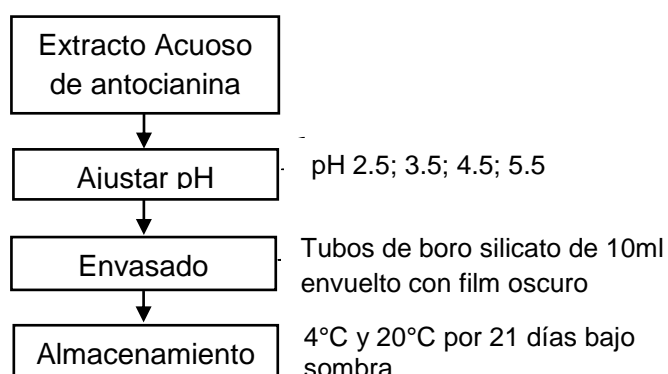
Se determinará la humedad por el método Gravimétrico mediante el método de la AOAC, Official Methods of Analysis, 1997. El Contenido de Humedad se calculará mediante la ecuación 1.

$$\text{Contenido de Humedad (\%)} = \frac{B - C}{B - A} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

A: Cápsula vacía (g)

B: Cápsula tapada + muestra (antes del secado), (g)



C: Cápsula con tapa más la muestra desecada, (g)

### 3.6.1.2. Contenido de Proteína

Se determinará mediante el método Kjeldhal de la AOAC, Official Methods of Analysis, 1997. Se calculará mediante la ecuación 2 y 3.

$$\text{Nitrógeno en la muestra (\%)} = 100x \left[ \frac{(A \times B)}{C} \times 0.014 \right] \quad (2)$$

Donde:

A = Ácido clorhídrico usado en la titulación (ml).

B = Normalidad del ácido estándar.

C = Peso de la muestra (g).

$$\% \text{ Proteína Cruda} = \text{Nitrógeno en la muestra} \times 6.25 \quad (3)$$

$$\text{Factor de conversión} = \frac{100g \text{ Proteína}}{16g \text{ Nitrógeno}} = 6.25$$

### 3.6.1.3. Contenido de Grasa

Se determinó mediante el método de soxhlet de la AOAC, Official Methods of Analysis, 1997. El contenido de % de grasa se calculará mediante la ecuación 4.

$$\text{Grasa Cruda}(\%) = \left( \frac{B - A}{C} \right) \times 100 \quad (4)$$

Cálculos

A = Peso del matraz limpio y seco (g)

B = Peso del matraz con grasa (g)

C = Peso de la muestra (g)

### 3.6.1.4. Contenido de Ceniza

Se determinó mediante el método gravimétrico de la AOAC, Official Methods of Analysis, 1997a. El contenido de % de cenizas se calculará mediante la ecuación 5.

$$\text{Cenizas Totales (\%)} = \frac{C-A}{B-A} \times 100 \quad (5)$$

Donde:

A: Crisol vacío, (g)

B: Crisol+ muestra, (g)

C: Crisol+ Ceniza, (g)

### 3.6.2 Análisis de Compuesto Bioactivos

#### 3.6.2.1. Contenido de antocianinas por el método pH Diferencial

Para determinar la concentración de antocianinas por pH diferencial se empleó la metodología descrito por (Mónica & Wrolstad, 2001):

Se prepara dos Buffers que son; Cloruro de Potasio a 0.025 M con pH 1,0 y Acetato de Sodio a 0.4 M con pH 4.5, para proceder a la lectura, de la muestra almacenada se diluirá los buffers de Cloruro de Potasio y Acetato de Sodio. La dilución debe ser tal que la muestra a pH 1.0 tenga una absorbancia menor a 1y preferentemente en el rango de 0.4 a 0.6. El factor de dilución será el mismo para ambas muestras (pH 1,0 y pH 4,5), se introduce una porción de la solución en la celda de cuarzo, y en la celda cuarzo se añadirá agua destilada para utilizar como muestra blanca. Se procederá la lectura de los tubos en el espectrofotómetro- UV, con las siguientes mediciones espectrales de 520 y 700 nm. Se aplicará con la ecuación 6.

$$\left(\frac{mg}{lt}\right) = \frac{A \times PM \times Df \times 1000}{\epsilon \times l} \quad (6)$$

Donde:

$$A = (A_{520} - A_{700})_{pH_{1.0}} - (A_{520} - A_{700})_{pH_{4.5}}$$

$$PM = 449,9 \text{ g/mol}$$

Df = Factor de dilución.

$\epsilon$  = 26900 coeficiente de extinción molar para cianidina-3- glucósido, 1000= factor de conversión de g a mg

L= Longitud de paso de celda en cm.

La concentración final de antocianina (mg/l) se calcula en base al volumen de extracto y peso de muestra. Se expresa en cianidina 3-glucósido g (PM 1000 y  $\epsilon$  = 26900).

### 3.6.2.2. Determinación de rendimiento de extracción

Se determinará el rendimiento de extracción de antocianinas totales, aplicando con la ecuación 7. descrita por:

$$\text{Rendimiento} = \frac{V_{\text{extracto}} \times C_{\text{Antocianinas}}}{M_a} \quad (7)$$

Donde:

$V_{\text{extracto}}$  : Volumen del extracto (g)

$C_{\text{Antocianinas}}$ : Concentración de antocianinas totales (mg cianidina-3 glucósido/100g EDA)

$M_a$ = Masa del Sauco (g)

### 3.6.2.3. Determinación de compuestos fenólicos (CF)

Para la determinación de compuestos fenólicos se empleó la metodología de (Márquez, Otero, & Osorio, 2004):

Primero se tomó 50 $\mu$ L de extracto, se añadieron 800 $\mu$ L con H<sub>2</sub>O, 400 $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (1:5 H<sub>2</sub>O destilada) y 2000 $\mu$ L de carbonato de sodio al 10% de ahí se homogenizo por completo. El contenido reposó una hora y se procedió a la lectura de absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro. Finalmente, la concentración de compuestos fenólicos, fue determinada utilizando una curva estándar de ácido gálico (0.04 – 0.3 mg/ml). los resultados se expresan en mg/100 ml acido Gálico. Se aplicará la ecuación 8.

$$TPC \left( mg \frac{EAG}{100ml} \right) = \frac{(Abs_{\text{Muestra}} - Valor_{\text{intercepto}}) \times Valor_{\text{Muestra}} \times F.D}{Valor_{\text{pendiente}}} \times 100 \quad (8)$$

### 3.6.2.4. Determinación de capacidad antioxidante por el método DPPH

La capacidad antioxidante se determinó por el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), siguiendo la metodología de (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995), con algunas modificaciones:

La solución de stock fue preparada con 12 mg de DPPH en 100 ml de etanol puro de ahí la solución se almacenó en congelación a -18°C.hasta su uso. La solución de trabajo se calibró a una absorbancia de  $1 \pm 0.02$  a una longitud de onda de 515 nm. Para la cuantificación de la capacidad antioxidante en un tubo de ensayo se adicionó 150  $\mu$ L de



extracto, luego con 2850  $\mu\text{L}$  de la solución de DPPH. La solución reposó 30 min de ahí se procedió a la lectura de la muestra a 515 nm en el espectrofotómetro (MOD-UV 721). Utilizando como blanco etanol puro. Los resultados se expresan como TEAC ( $\mu\text{mol trolox/L}$ ). Para cuantificar la inhibición se elaboró una curva de patrón de cual se pesó 6,3 mg de trolox y enrasando a 25 ml con metanol al 80% en una fiola aforada, en concentraciones de 100 a 1000 ( $\mu\text{mol/L}$ ).se aplicarán las ecuaciones 9 y 10.

$$\% \text{ Inhibición} = \left( \frac{Abs_{Blanco} - Abs_{Muestra}}{Abs_{Blanco}} \right) \times 100 \quad (9)$$

$$TEAC \left( \frac{\mu\text{mol trolox}}{100\text{ml}} \right) = \left( \frac{\% \text{ inhibición} - \text{Intercepto}}{\text{Pendiente}} \right) \times 100 \quad (10)$$

### 3.7. Diseño Estadístico

Para este trabajo de investigación se emplearán dos diseños experimentales, que consistente de la siguiente manera, el primero es el diseño ortogonal taguchi L18 ( $2 \times 3^{5-7}$ ) que es para la extracción del extracto acuoso de antocianina y el segundo es el diseño factorial  $4 \times 2 \times 4$  se empleó para determinar la estabilidad del extracto acuoso de antocianina que se realizarón con el programa Stastica.7.1®.

#### 3.7.1. Extracción del extracto acuoso de antocianina por EAM

Se estudió como factores: A (Tiempo de extracción), B (Etanol), C (Tiempo de Irradiación), D (Materia Prima:Solvente), E (Potencia de irradiación), F(Etanol (%) – Potencia de Irradiación (watts)), G(Materia Prima: Solvente - Potencia de Irradiación(watts)) y H(Tiempo de Irradiación(seg)- Potencia de Irradiación(watts), para lo cual se aplicó el método Taguchi con un arreglo ortogonal  $L_{18}(2 \times 3^{5-7})$ . Como se aprecia en la Tabla 3, se tienen 5 factores de procesamiento y 3 factores de Interacciones.

**Tabla 3.** Factores o variables independientes con niveles codificados para la obtención del extracto.

Factores	Variables Independientes	Niveles Codificados		
		1	2	3
A	Homogenización (min)	10	20	-
B	Etanol (%)	0	25	50
C	Tiempo de extracción (seg)	30	60	90
D	Materia Prima: Solvente (g/ml)	(1:15)	(1:30)	(1:45)
E	Potencia Irradiación (Watts)	400	550	700
F	Etanol (%) – Potencia de Irradiación(watts), (Interacción)	-	-	-

G	Materia Prima: Solvente (g/ml) – Potencia de Irradiación (watts), (Interacción)	-	-	-
H	Tiempo de Extracción(seg)- Potencia de Irradiación (watts), (Interacción)	-	-	-

Las variables dependientes analizadas fueron antocianinas totales monomérica, compuesto fenólicos y rendimiento con el método Taguchi se efectuó 18 tratamientos con un nivel de significancia de 95%(p-valor 0.05) tal como se aprecia en la Tabla 4. Se realizó por triplicado, se consideró también la razón señal/ ruido y la condición mayor es mejor.

**Tabla 4.** Arreglo ortogonal Taguchi L18(2x3<sup>5-7</sup>).

Tratamientos	FACTORES							
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1(10)	1(0)	1(30)	1(1:15)	1(400)	-	-	-
2	1(10)	1(0)	2(60)	2(1:30)	2(550)	-	-	-
3	1(10)	1(0)	3(90)	3(1:45)	3(700)	-	-	-
4	1(10)	2(25)	1(30)	1(1:15)	2(550)	-	-	-
5	1(10)	2(25)	2(60)	2(1:30)	3(700)	-	-	-
6	1(10)	2(25)	3(90)	3(1:45)	1(400)	-	-	-
7	1(10)	3(50)	1(30)	2(1:30)	1(400)	-	-	-
8	1(10)	3(50)	2(60)	3(1:45)	2(550)	-	-	-
9	1(10)	3(50)	3(90)	1(1:15)	3(700)	-	-	-
10	2(20)	1(0)	1(30)	3(1:45)	3(700)	-	-	-
11	2(20)	1(0)	2(60)	1(1:15)	1(400)	-	-	-

12	2(20)	1(0)	3(90)	2(1:30)	2(550)	-	-	-
13	2(20)	2(25)	1(30)	2(1:30)	3(700)	-	-	-
14	2(20)	2(25)	2(60)	3(1:45)	1(400)	-	-	-
15	2(20)	2(25)	3(90)	1(1:15)	2(550)	-	-	-
16	2(20)	3(50)	1(30)	3(1:45)	2(550)	-	-	-
17	2(20)	3(50)	2(60)	1(1:15)	3(700)	-	-	-
18	2(20)	3(50)	3(90)	2(1:30)	1(400)	-	-	-

### 3.7.2. Evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina

En el segundo diseño estadístico, se empleó el diseño factorial completo de 4x2x4 (AxBxC), Los factores son: A\* (Día), B\* (Temperaturas) y C\* (tipos de pH) con 4, 2 y 4 niveles, respectivamente obteniendo un total de 32 experimentos. Los niveles codificados se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Factores o variables independientes con niveles codificados para la evaluación de la estabilidad del extracto acuoso de antocianina

Factores	Variables Independientes	Niveles Codificados			
		1	2	3	4
A*	Tiempo (Día.)	0	7	14	21
B*	Temperatura (°C)	4	20	—	—
C*	pH	2.5	3.5	4.5	5.5

Las variables de respuesta fueron antocianinas, fenoles y antioxidantes. Se ejecutó el análisis de varianza (p-valor 0.05), prueba de comparaciones múltiples de diferencias mínimas significativas. Tabla 6.

**Tabla 6.** Diseño Factorial completo 4x2x4.

Tratamientos	Tiempo	Temperatura	pH
1	0	4	2.5
2	0	4	3.5
3	0	4	4.5
4	0	4	5.5
5	0	20	2.5
6	0	20	3.5
7	0	20	4.5
8	0	20	5.5
9	7	4	2.5
10	7	4	3.5
11	7	4	4.5

12	7	4	5.5
13	7	20	2.5
14	7	20	3.5
15	7	20	4.5
16	7	20	5.5
17	14	4	2.5
18	14	4	3.5
19	14	4	4.5
20	14	4	5.5
21	14	20	2.5
22	14	20	3.5
23	14	20	4.5
24	14	20	5.5
25	21	4	2.5
26	21	4	3.5
27	21	4	4.5
28	21	4	5.5
29	21	20	2.5
30	21	20	3.5
31	21	20	4.5
32	21	20	5.5

### 3.8. Análisis Estadístico

Para la extracción de antocianinas por microondas asistida, se ejecutó el análisis de varianza (ANOVA), y un gráfico de señal ruido con la condición mayor es mejor, para evaluar la importancia de los efectos de los factores independientes sobre la variable respuesta, utilizando un nivel de significancia del 5 % (0.05).

Para la evaluación de la estabilidad de Antocianina, se ejecutó el análisis de varianza, prueba de comparaciones múltiples. En todos los análisis se utilizó un nivel de significancia del 5% (0.05).

## CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Análisis proximal de la cáscara

La composición proximal de la harina de cáscara de sauco en base seca se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Resultados de Análisis Proximal en base seca(bs)

Procedencia	Humedad(%)	Grasa Cruda(%)	Proteína (%)	Ceniza (%)
Apurímac	-	2.51 ± 0.00	0.29 ± 0.10	3.20 ± 0.06
Tarma <sup>1</sup>	-	3.53	0.61	10.22
Lima <sup>2</sup>	-	4.57	0.26	9.65

Nota: <sup>1</sup>Meza, 2011 y <sup>2</sup>Beltran, 2010

Fuente elaboración propia

El análisis proximal expresado en base seca de la cáscara del sauco es mostrado en la Tabla 7. Los resultados fueron comparados con los análisis proximales de diferentes procedencias (Apurímac, Tarma y Lima) de la cáscara de sauco, según (Meza, 2011) se observó un mayor contenido de grasa cruda, proteína y ceniza, comparando con el estudio realizado por (Beltran, 2010) y en el presente estudio. Las variaciones de la composición química son atribuidas por diferentes factores tales como la heterogeneidad de la fruta (manejo agronómico y condiciones ecológicas), procedencia, mes de realización de la cosecha, estado de madurez y almacenado; esto influye en la síntesis

de estos compuestos (Lovera, 2007; Rodrigo, Alvarez, De la rosa, Mercado, & Herrera, 2006). Esto explica las diferencias existentes entre los resultados obtenidos y aquellos reportados por los autores anteriormente mencionados.

#### **4.2. Extracto acuoso de antocianina por EAM**

Los resultados obtenidos con el método Taguchi con arreglo ortogonal  $L_{18}$ , se muestran en la tabla 8. El análisis de varianza (ANOVA) para la extracción asistida por microondas, las variables estudiadas fueron (Tiempo de extracción, Etanol, Tiempo de Irradiación, Materia prima: Solvente, Potencia de Irradiación) generaron cambios significativos en el contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y contenido de rendimiento con un (p-valor  $<0.05$ ), en las variables (Etanol, MP:Solvente). Se muestra en la tabla 8 y 9.

Por otro lado, se determinó en el análisis de señal ruido del contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y rendimiento, esto se puede observar en la figura 15 y16.

**Tabla 8.** Resultados de la extracción de antocianinas por extracción asistida por microondas

Tiempo de Homogenización (min)	Etanol (%)	Tiempo de Extracción (Seg)	Relación Materia Prima: Solvente (g/ml)	Potencia de Irradiación (Watts)	Etanol (%) – Potencia de Irradiación (watts), (Interacción)	Materia Prima: Solvente (g/ml) – Potencia de Irradiación(watts) , (Interacción)	Tiempo de Extracción(seg)- Potencia de Irradiación (watts), (Interacción)	Antocianinas (mg/100ml)	Compuesto Fenólicos (mg/100ml)	Rendimiento (µmol/100ml)
10	0	30	1:15	400	-	-	-	235.26 ± 0.20	86.89 ± 0.00	47.04 ± 0.01
10	0	60	1:30	550	-	-	-	141.49 ± 0.00	75.77 ± 0.26	28.30 ± 0.00
10	0	90	1:45	700	-	-	-	111.05 ± 0.00	66.16 ± 0.00	22.21 ± 0.00
10	25	30	1:15	550	-	-	-	261.13 ± 0.20	96.66 ± 0.00	52.22 ± 0.03
10	25	60	1:30	700	-	-	-	199.25 ± 0.20	86.89 ± 0.00	39.80 ± 0.03
10	25	90	1:45	400	-	-	-	158.22 ± 0.00	77.77 ± 0.17	31.64 ± 0.00
10	50	30	1:30	400	-	-	-	219.77 ± 0.00	98.41 ± 0.09	43.95 ± 0.00
10	50	60	1:45	550	-	-	-	178.40 ± 0.40	86.89 ± 0.00	35.71 ± 0.00
10	50	90	1:15	700	-	-	-	270.27 ± 0.00	101.16 ± 0.00	54.05 ± 0.00
20	0	30	1:45	700	-	-	-	100.01 ± 0.00	56.99 ± 0.00	20.10 ± 0.00
20	0	60	1:15	400	-	-	-	218.43 ± 0.00	76.07 ± 0.00	43.83 ± 6.81
20	0	90	1:30	550	-	-	-	134.24 ± 0.00	61.05 ± 0.00	26.83 ± 0.00
20	25	30	1:30	700	-	-	-	192.34 ± 0.00	81.98 ± 0.17	38.47 ± 0.00
20	25	60	1:45	400	-	-	-	132.80 ± 0.00	73.11 ± 0.09	26.56 ± 0.00
20	25	90	1:15	550	-	-	-	224.45 ± 0.00	90.05 ± 0.00	44.89 ± 0.00
20	50	30	1:45	550	-	-	-	153.53 ± 0.00	82.73 ± 0.35	30.70 ± 0.00
20	50	60	1:15	700	-	-	-	245.19 ± 0.00	98.66 ± 0.43	49.04 ± 0.00
20	50	90	1:30	400	-	-	-	211.96 ± 0.19	90.85 ± 0.17	42.41 ± 0.00

#### 4.2.1. Contenido de Antocianinas

En la tabla 9, podemos observar el ANOVA del contenido de antocianinas, la cual nos indica estadísticamente que existe una diferencia significativa en todos los factores estudiados con un p-valor < 0.05.

**Tabla 9.** ANOVA de contenido de antocianinas por extracción asistida por microondas

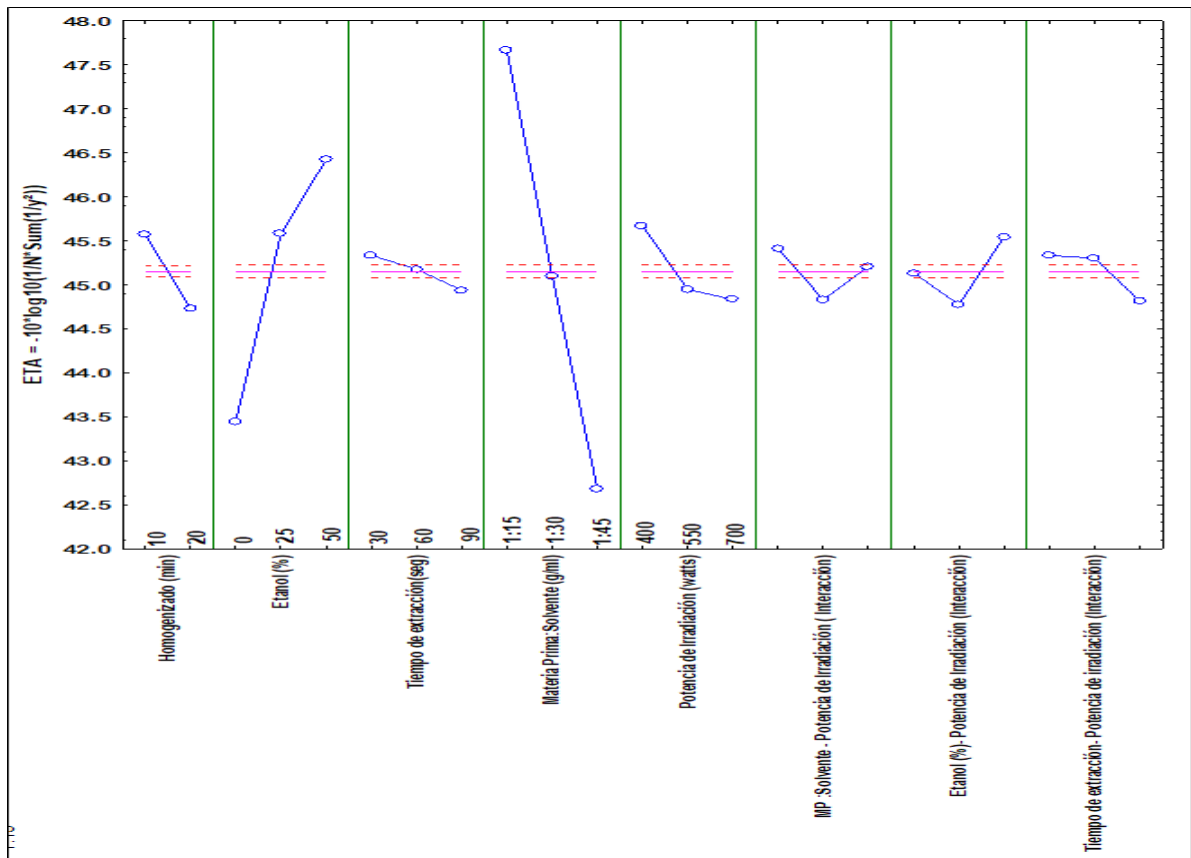
Factores	SS	GL	MS	Valor F	p-valor
Tiempo de Extracción(min)	9.6714	1	9.6714	1127.93	0.000
Etanol (%)	84.534	2	42.267	4929.41	0.000
Tiempo de Irradiación(seg)	1.4324	2	0.7162	83.53	0.000
Materia Prima:Solvente (g/ml)	223.436	2	111.7168	13029.02	0.000
Potencia de Irradiación (watts)	7.4338	2	3.7169	433.49	0.000
Materia Prima : Solvente - Potencia de Irradiación (Interacción)	3.1541	2	1.5771	183.92	0.000
Etanol (%)- Potencia de Irradiación (Interacción)	5.3342	2	2.6671	311.05	0.000
Tiempo de Irradiación- Potencia de Irradiación (Interacción)	3.0319	2	1.516	176.8	0.000
Residual	0.3258	38	0.0086		

Media = 45.1512; Desviación estandar = 2.52666

En la Figura 16 se observa que los factores de tiempo de extracción (min), etanol (%), tiempo de irradiación (seg), relación materia prima: solvente (g/ml), potencia de irradiación (watts) y las interacciones relación materia prima:solvente - potencia de irradiación, Etanol-Potencia de Irradiación, tiempo de irradiación-potencia de irradiación, influyen significativamente porque se obtuvo rango de p-valor <0.05, en el contenido de antocianinas respecto al extracto acuoso de antocianina de la cáscara de sauco ya que a más alejados se ubiquen los límites de cada factor respecto a las líneas punteada (líneas de significancia), mayor es su grado de significancia

Los factores quedan ordenados de la siguiente manera con un tiempo de homogenización de 10 minutos, 50% de etanol, con 30 segundos de extracción, con una dilución de Materia prima (1):solvente (15) y finalmente con una potencia de irradiación de 400 watts. Influyen significativamente en el contenido de antocianinas.





**Figura 16.** Gráfico señal/ruido, para cada factor y sus interacciones consideradas en el contenido de antocianinas

Los resultados obtenidos reportan que los factores de etanol al 50% y una relación de materia prima: solvente 1:15, se obtuvo un mejor contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes. Este resultado concuerda con lo reportado por (Sousa, 2016), esto se debe que la relación soluto/disolvente es uno de los factores más críticos durante la transferencia de masa, a un mayor % de concentración de solvente ayuda a acelerar el proceso de difusión (Muñiz, Martínez, Won, & Belmares, 2013).

Las ondas electromagnéticas del microondas interaccionan con el extracto del sauco, produciendo vibración o rotación de las moléculas lo cual genera calor. Mientras menor es el tiempo de extracción, menor es la alteración de sus estructuras moleculares a menos que la potencia de irradiación sea demasiado alta. (Sinha, Das Saha, & Datta, 2012).

Mientras tanto (Flores, 2017) concuerda con la extracción por la metodología EAM, se determinó que a ciclo de 30 seg de irradiación se obtiene un contenido de antocianinas 506 a 664 mg/100g. obteniendo un valor mayor de antocianinas a lo estudiado.

La baja potencia de irradiación estaría favoreciendo la extracción obteniendo una buena solubilidad de las antocianinas (Cacace & Mazza, 2003), con respecto a escala altas de irradiación, (Mendes,Carvalho,Magalhaes,Moreira, Guido, Gomes, & Delerue-Matos, 2016), pero en tiempos cortos de se obtiene un buen rendimiento de extracción debido a que la penetración es fácil en el disolvente.

#### 4.2.2. Contenido de Compuestos Fenólicos

En la tabla 10, podemos observar el ANOVA del contenido de compuestos fenólicos, la cual nos indica estadísticamente que existe una diferencia significativa en los factores Tiempo de extracción, Etanol, Tiempo de Irradiación, Materia Prima: Solvente, Potencia de irradiación con un (p-valor < 0.05), según el diseño experimental realizado, a diferencia de los factores interacciones; materia prima: Solvente-Potencia de irradiación, Etanol-Potencia de irradiación, pero en las interacciones no influyen de manera significativa (p>0.05) en el contenido de compuesto fenólicos en el extracto antociánico a partir de cáscara de Sauco.

**Tabla 10.** ANOVA del contenido de Compuestos Fenólicos por EAM

Factores	SS	GL	MS	Valor F	p-valor
Tiempo de Extracción(min)	8.93326	1	8.93326	125.4885	0.000000
Etanol (%)	57.25615	2	28.62807	402.1481	0.000000
Tiempo de Irradiación(seg)	0.98534	2	0.49267	6.9207	0.002735
Materia Prima:Solvente (g/ml)	32.62810	2	16.31405	229.1689	0.000000
Potencia de Irradiación (watts)	0.99698	2	0.49849	7.0025	0.002577
Materia Prima : Solvente - Potencia de Irradiación (Interacción)	0.36563	2	0.18282	2.5681	0.089929
Etanol (%)- Potencia de Irradiación (Interacción)	0.23329	2	0.11665	1.6386	0.207688
Tiempo de Irradiación- Potencia de Irradiación (Interacción)	0.25829	2	0.12915	1.8142	0.176808
Residual	2.70514	38	0.07119		

Media = 38.2401; Desviación estándar =1.403325

En la figura 17, se observa que los factores de homogenización(min), etanol (%), tiempo de extracción(seg), relación de materia prima: solvente(g/ml), potencia de

irradiación(watts) y las interacciones relación de materia prima: solvente- potencia de irradiación, Etanol-Potencia de irradiación, Tiempo de extracción-Potencia de irradiación. Influyen significativamente (p-valor <0.05) en el contenido de antocianinas respecto al extracto antociánico de la cáscara de sauco ya que a más alejados se ubiquen los límites de cada factor respecto a las líneas punteada (líneas de significancia), mayor es su grado de significancia

Los factores quedan ordenados de la siguiente manera con un tiempo de extracción de 20min, 50% de etanol, con 30 segundos de irradiación, con una dilución de Materia prima(1):Solvente (15) y finalmente con una potencia de irradiación de 400 watts. Influyen significativamente en el contenido de antocianinas.

Según Flores (2017) estudio la baya de sauco de la variedad de la especie (*sumbucus nigra L subsp. peruviana*) por el método de extracción asistida por microondas en ciclo de extracción de 30 segundos y una temperatura de 20°C, encontró concentraciones de compuesto fenólico de 55.71 mg/100ml, por otro lado (Mustafa Özgen, Scheerens, & Raymond, 2010) estudiaron el contenido fenólico total, antocianina y capacidad antioxidante de la variedad de sauco (*Sambucus canadensis L.*) contiene 50.06 mg/100g, los valores reportado se encuentra con lo estudiado con la variedad del sauco estudiado. Por ello, la variación de los compuestos fenólicos se debe a su estado de maduración y variedad de la fruta. Además, se obtiene una mayor cantidad de compuesto fenólicos en los frutos maduros, disminuyendo en el estado intermedio (pintón) y por último el verde (Hernandez , Pabón, & Rodriguez , 2015).

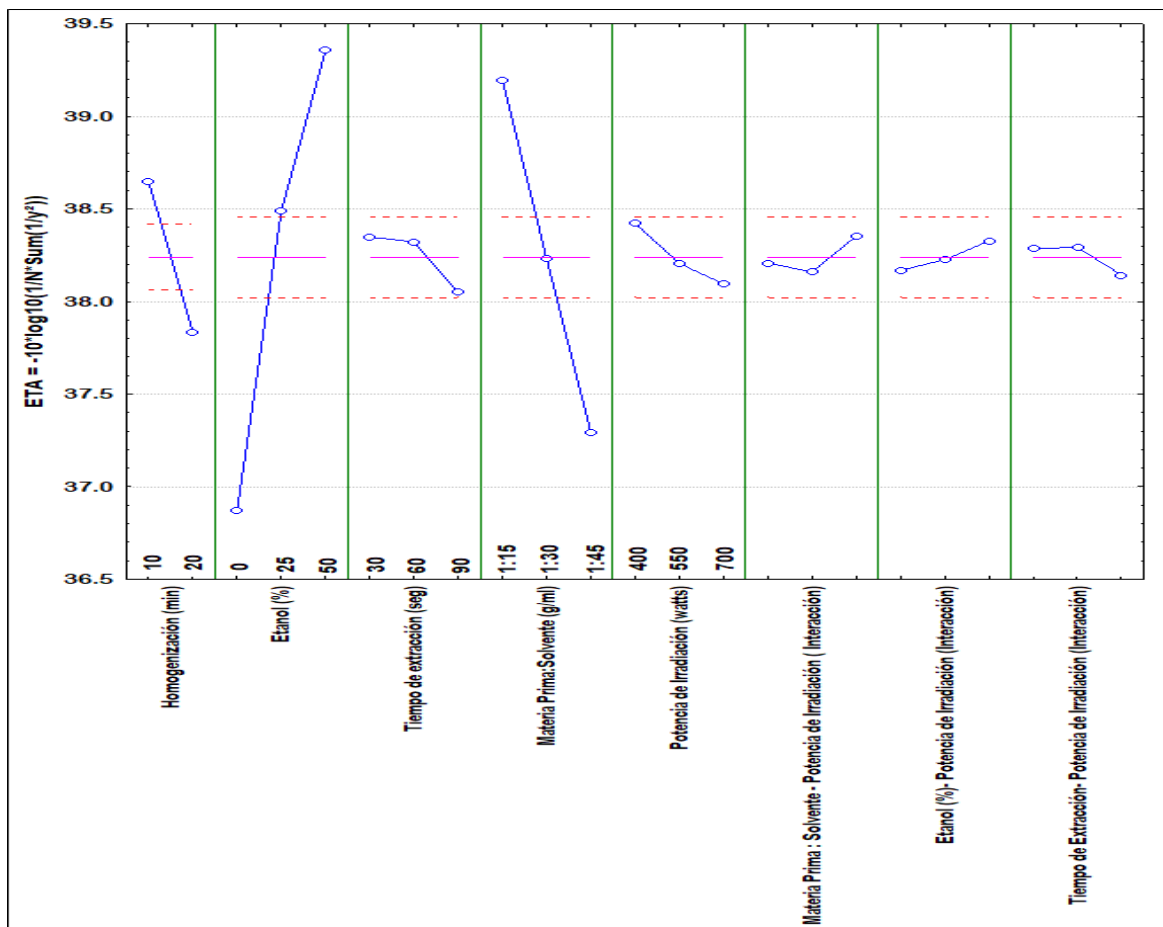


Figura 17. Gráfico señal/ruido, para cada factor y sus interacciones consideradas en la determinación de compuestos fenólicos.

#### 4.2.3. Rendimiento de antocianinas

La hidrólisis como consecuencia a la cantidad de azúcares recuperados en residuo depende del tiempo de reacción, temperatura y concentración, siendo este último parámetro el que afecta, en mayor medida, al rendimiento en azúcares, mientras que, en la formación de productos de degradación, la temperatura causa el mayor efecto permitiendo romper los enlaces tipo éster liberando los ácidos fenólicos con menores pérdidas respecto a una hidrólisis ácida (Roberto, Mussatto, & Rodríguez, 2003) esto se debe que el sauco, es una fuente de pigmentos naturales por su contenido de antocianinas, también tiene alto compuesto fenólicos y antioxidantes se consume en la población en sus diferentes presentaciones y derivados.

Para obtener un buen rendimiento en antocianinas (Rodríguez-Saona, Giusti, & Wrolstad, 1998), señalan que el carácter polar de la molécula de antocianina permite su

solubilidad en variados solventes, tales como alcoholes, acetona y agua. Esto se debe que el método de extracción con etanol se obtuvo un buen rendimiento de antocianinas y compuesto fenólicos, corroborando lo señalado por otro lado autores como (Revilla, Ryan, & Ortega, 1998) indica que las antocianinas son compuestos solubles en solventes polares y comúnmente se extraen de sus fuentes naturales usando metanol o etanol con pocas cantidades de algunos ácidos como ácido clorhídrico, acético y fórmico, ya que el ácido mantiene el pH ácido lo que previene el desplazamiento de los equilibrios químicos de hidratación y formación de chalconas.

#### **4.3. Validación del extracto acuoso de antocianina optimo**

Con el diseño taguchi ortogonal L18(2x3<sup>5-7</sup>), estadísticamente se obtuvo parámetros mejores que a 10 min de homogenización, 1:15 Relación materia prima:Solvente, 50% de etanol, 30 seg de tiempo de extracción, 400 watts de irradiación, de lo cual se validó haciendo experimentalmente un nuevo extracto acuoso de antocianina para verificar con lo estadísticamente y se obtuvo un contenido de antocianinas de  $273.93 \pm 0.20$  mg/100ml, compuestos fenólicos de  $102.69 \pm 0.13$  mg/100ml y con un rendimiento de  $55.43 \pm 0.01$   $\mu$ mol/100ml, con la validación de los parámetros óptimo se realizó el nuevo extracto para la determinación de la estabilidad de antocianinas donde se aplicó el diseño factorial completo 4x2x4

Los resultados del extracto acuoso de antocianina empleando el método de extracción por microondas asistida se obtuvieron valores similares con los autores (Liazid, Guerrero, Cantos, Palma, & Barroso, 2011) sostienen que a potencia de irradiación menor y aun mayor porcentaje de solvente, se obtiene un mejor rendimiento de antocianina y compuestos fenólicos.

Por otro lado, el tiempo de extracción es un importante factor en la extracción de pigmentos antocianicos, sin embargo, durante un tiempo excesivo, podría no ser significativo para la extracción de pigmentos antocianicos, ya que la ley de difusión de Fick, predice que después de cierto tiempo, habrá un equilibrio final entre el soluto de la matriz sólida y el solvente de extracción (Silva, Rogez, & Larondelle, 2007).

#### 4.4. Estabilidad del Extracto Acuoso de Antocianina

Los resultados obtenidos con el diseño factorial completo 4x2x4, como se muestra en la tabla 11.

**Tabla 11.** Resultados de la evaluación de la estabilidad en almacenamiento.

Tiempo (Día)	Temperatura (°C)	pH	Antocianinas (mg/100ml)	Compuesto Fenólicos (mg/100ml)	DPPH (μmol/100ml)
0	4	2.5	235.26 ± 0.19	159.22 ± 0.00	102.87 ± 0.07
0	4	3.5	204.38 ± 0.00	139.48 ± 0.10	94.96 ± 0.00
0	4	4.5	189.66 ± 0.00	127.63 ± 0.00	89.59 ± 0.00
0	4	5.5	172.60 ± 0.00	95.55 ± 0.00	77.91 ± 0.00
0	20	2.5	207.72 ± 0.58	147.09 ± 0.10	94.30 ± 0.07
0	20	3.5	187.76 ± 0.19	123.50 ± 0.00	85.74 ± 0.00
0	20	4.5	168.03 ± 0.19	114.73 ± 0.00	82.00 ± 0.00
0	20	5.5	157.10 ± 0.19	83.64 ± 0.17	69.62 ± 0.00
7	4	2.5	230.13 ± 0.00	155.09 ± 0.10	88.27 ± 0.07
7	4	3.5	191.00 ± 0.00	134.14 ± 0.10	82.08 ± 0.07
7	4	4.5	181.30 ± 0.00	122.12 ± 0.09	78.03 ± 0.00
7	4	5.5	162.57 ± 0.00	90.97 ± 0.09	64.95 ± 0.00
7	20	2.5	193.67 ± 0.00	132.43 ± 0.00	80.60 ± 0.00
7	20	3.5	171.93 ± 0.00	107.62 ± 0.00	71.96 ± 0.00
7	20	4.5	150.97 ± 0.19	97.70 ± 0.00	64.91 ± 0.07
7	20	5.5	138.92 ± 0.19	69.42 ± 0.00	56.07 ± 0.00
14	4	2.5	221.44 ± 0.00	147.48 ± 0.00	82.16 ± 0.07
14	4	3.5	186.32 ± 0.00	127.80 ± 0.00	76.16 ± 0.00
14	4	4.5	174.27 ± 0.00	116.61 ± 0.10	73.94 ± 0.00
14	4	5.5	155.21 ± 0.00	83.58 ± 0.10	60.39 ± 8.70
14	20	2.5	171.40 ± 0.19	121.68 ± 0.17	67.75 ± 0.00
14	20	3.5	144.50 ± 0.00	92.73 ± 0.00	57.71 ± 0.00
14	20	4.5	134.80 ± 0.00	79.45 ± 0.00	45.21 ± 0.00
14	20	5.5	120.75 ± 0.00	57.01 ± 0.20	41.28 ± 0.00
21	4	2.5	217.09±0.00	134.19 ± 0.20	78.73 ± 0.00
21	4	3.5	182.64±0.00	117.65 ± 0.00	72.11 ± 0.07
21	4	4.5	170.93±0.00	111.92 ± 0.00	71.26 ± 0.00
21	4	5.5	152.20±0.00	80.22 ± 0.20	54.59 ± 0.07
21	20	2.5	148.18 ± 0.00	113.13 ± 0.20	57.75 ± 0.07
21	20	3.5	118.75 ± 0.00	82.81 ± 0.00	45.56 ± 0.00
21	20	4.5	105.37 ± 0.00	71.57 ± 0.00	33.06 ± 0.00
21	20	5.5	98.34 ± 1.70	51.83 ± 0.20	30.03 ± 0.00

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de las variables estudiadas de (Tiempo, Temperatura y pH) generaron cambios significativos en los contenidos de antocianinas, compuestos fenólicos y antioxidantes con un p-valor ( $<0.05$ ). Como se observa en él, Anexo 9. También se generaron las gráficas de efecto de las condiciones de almacenamiento, como se puede observar en la figura 18,19 y 20.

En la tabla 10, se indica que el extracto antociánico estudiado durante las tres semanas de almacenamiento de 4°C y 20°C se ve muy afectado por el pH, por lo cual se obtuvo una mejor estabilidad de contenido de antocianinas, compuestos fenólicos y antioxidante a Temperatura 4°C con un pH 2.5, los resultados estudiado se asemeja con (Mojica, y otros, 2017), reporto que la estabilidad de contenido de antocianinas, compuesto fenólicos del frejol negro durante cinco semanas de almacenamiento a 4°C y 22°C, fueron más estables en condiciones de refrigeración y pH bajo, estos resultados también concuerda con los autores (Kirca & Cemeroglu, 2003; Hou, Qin, Zhang, Cui, & Ren, 2013).

#### **4.4.1. Estabilidad de Contenido de Antocianinas**

Se observa en la figura 18, que el contenido de antocianina a pH 2.5 tiene una menor degradación en las temperaturas (4 y 20°C) durante el periodo de las 3 semanas del almacenamiento. Este comportamiento también ha sido reportado por otros autores, como (Wang & Xu, 2007; De Rosso & Mercadante, 2007; Tonon, Brabet, & Hubinger, 2010)

Esto se debe a varios factores que afectan la estabilidad del extracto antociánico, que son las condiciones de procesamiento, almacenamiento, pH, temperatura, presión, luz, oxígeno, enzimas, ácido ascórbico, dióxido de azufre, sales de sulfito, iones metálicos, azúcares y algunos co-pigmentos contribuyen a su degradación (Hernandez-Herrero & Frutos, 2014; Zoric, Dragovic-Uzelac, Pedisic, Kurtanjek, & Garofuli, 2014).

Cuando las antocianinas se encuentran en solución acuosa, el efecto de la copigmentación es dependiente del tipo de la solución, la concentración del solvente, la temperatura y la composición del medio (Rain, 2005; Baulis et al., 1994).

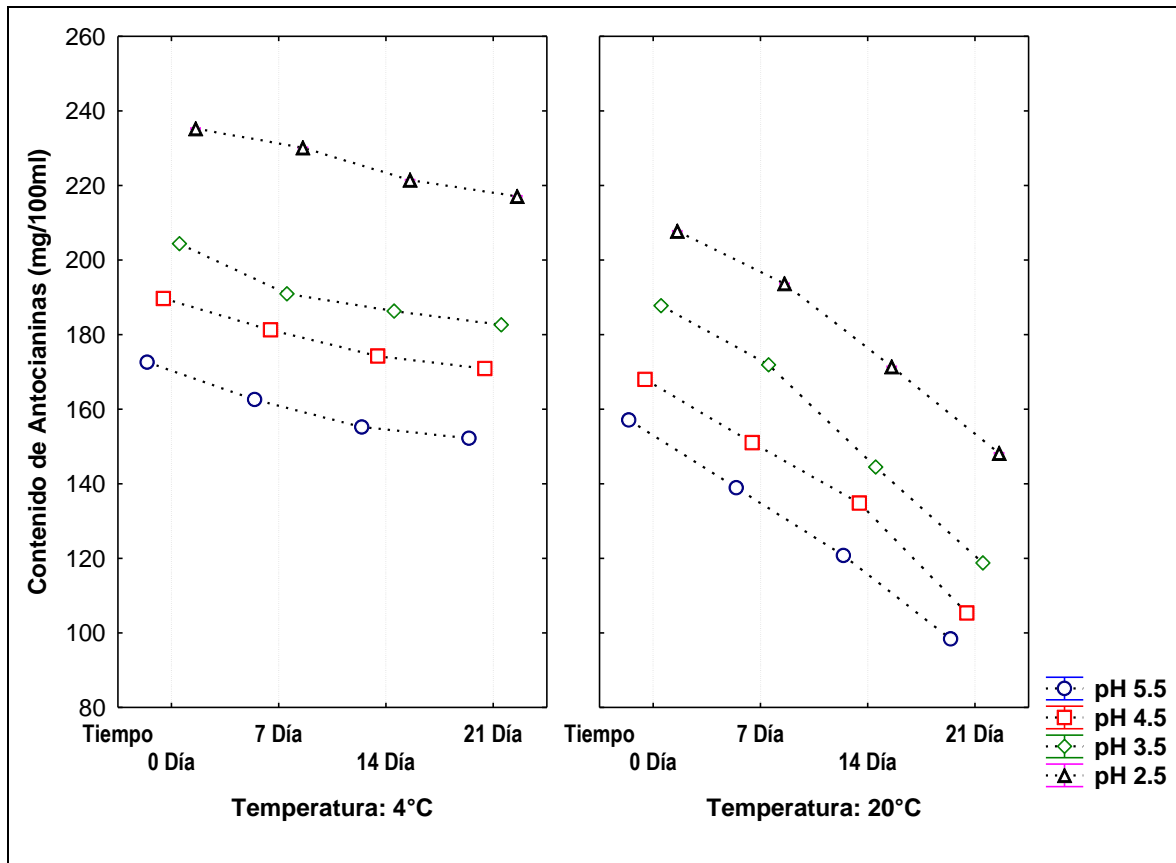


Figura 18. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de antocianinas

#### 4.4.2. Estabilidad de Compuestos Fenólicos

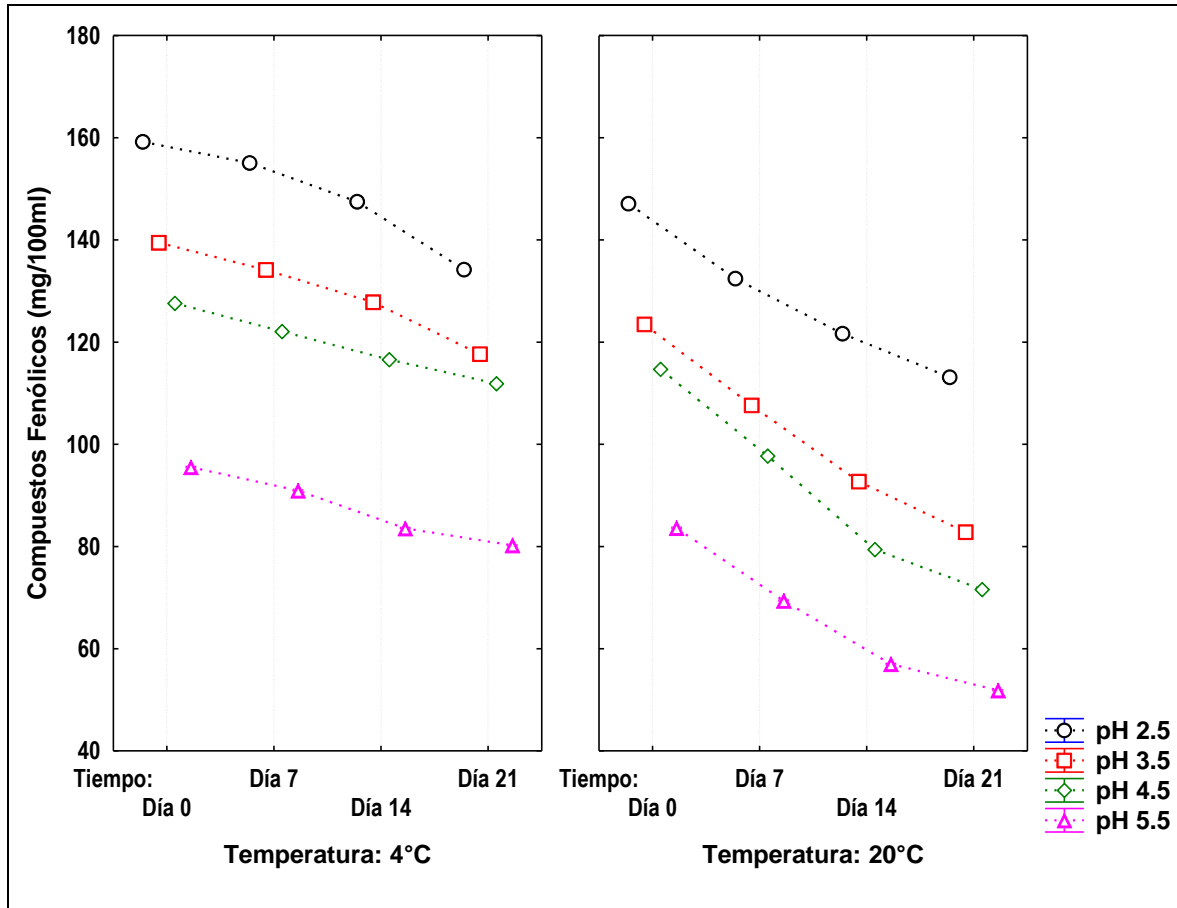
Se observa en la figura 19, que el contenido del compuesto fenólico fue más estable a pH 2.5 teniendo una menor degradación durante el almacenamiento a temperaturas (4 °C y 20°C) durante el periodo de las 3 semanas.

Los compuestos poli fenólicos de la baya del saúco, promueven la quinona reductasa (una enzima protectora) e inhiben la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y ornitina descarboxilasa (enzimas promotoras) asociadas con las fases de iniciación y promoción de la carcinogénesis (Thole, Kraft, Sueiro, Kang, Gills & Cuendet, 2006).

Los compuestos fenólicos, incluidas las antocianinas, muestran una fuerte actividad antioxidante y, en muchos estudios, se ha demostrado que contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante (Velioglu, Mazza, Gao, & Oomah, 1998). Específicamente, las



frutas con una pulpa altamente pigmentada contienen compuestos fenólicos, así como las bayas del saúco, que tiene una capacidad de antioxidantes más alta que las moras y las frambuesas negras (Moyer, Hummer, Finn, Frei, & Wrolstad, 2002).



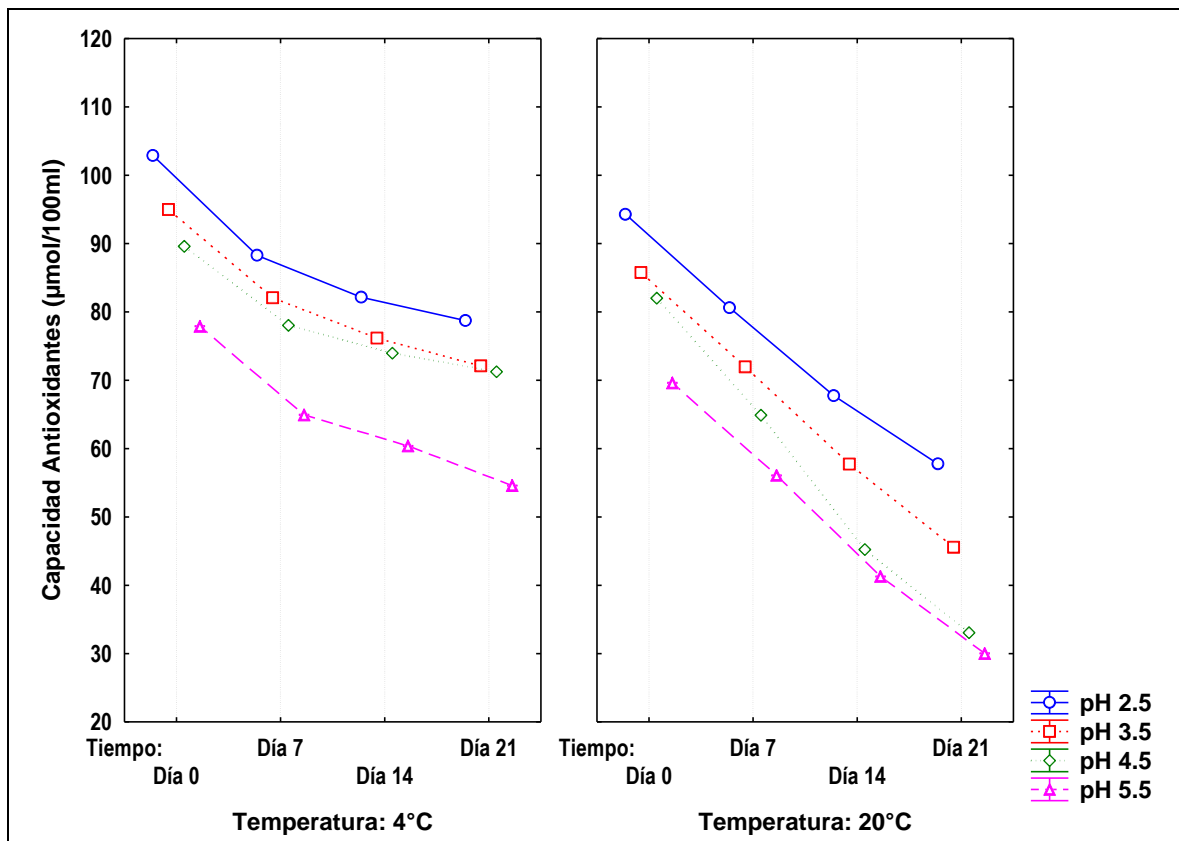
**Figura 19.** Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre el contenido de compuesto fenólicos

#### 4.4.3. Estabilidad de Capacidad Antioxidante por DPPH

Se observa en la figura 20, que el contenido de antocianina a pH 2.5 tiene una menor degradación a 4°C a diferencia de 20°C en un período de 3 semanas de almacenamiento.

La determinación de la actividad antioxidantes se basa en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. (Coba, Mayacu, & Vidari, 2010).

Las antocianinas pueden oxidarse por reacción directa con oxígeno, o bien a través de una oxidación indirecta en la que éstas reaccionan con compuestos que han sido previamente oxidados, dando lugar a la formación de productos de color marrón o incoloro. También, pueden reaccionar con radicales de oxígeno actuando como antioxidantes. Estos mecanismos de oxidación se ven favorecidos cuando se eleva la temperatura (Rein, 2005; Baulis, Spomer, & Berber, 1994).



**Figura 20.** Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre capacidad antioxidante

## V. CONCLUSIONES

Se obtuvo mejores resultados de extracción con el tratamiento 9 cuyas variables son: 10 minutos de homogenización, 50% de etanol, 1:15 (Materia prima: Solvente), 90 segundos de irradiación y 700 watts de potencia de irradiación. Se obtuvo un contenido de  $270.27 \pm 0.00$  mg/100ml de antocianinas,  $101.16 \pm 0.00$  mg/100ml de compuestos fenólicos y  $50 \mu\text{mol}/100\text{ml}$  de rendimiento.

Taguchi propone que las condiciones óptimas por extracción de antocianinas por microondas asistida son: 10 minutos de homogenización, 50% de etanol, 1:15 (Materia prima: Solvente), 30 segundos de irradiación y 400 watts de potencia de irradiación. El extracto a dichas condiciones contiene  $273.93 \pm 0.20$  mg/100ml de antocianinas,  $102.69 \pm 0.13$  mg/100ml de compuestos fenólicos y  $55.43 \pm 0.01$   $\mu\text{mol}/100\text{ml}$  de rendimiento.

Para la extracción del extracto acuoso de antocianina se empleó los factores óptimos que se generó en el gráfico de señal de ruido de taguchi de ahí se aplicó el diseño factorial completo  $4 \times 2 \times 4$ , para evaluar la estabilidad del extracto acuoso de antocianina los factores estudiados fueron Tiempo (Día 0, 7, 14 y 21), Temperatura (4 y  $20^\circ\text{C}$ ) y pH(2.5;3.5;4.5;5.5), de lo cual se obtuvo que la mejor estabilidad del extracto acuoso de antocianina durante los periodos de tiempo de almacenamiento, se mostró que el contenido de antocianina, compuesto fenólicos y capacidad antioxidantes fueron más estables a temperatura  $4^\circ\text{C}$  con un pH 2.5, mientras que a temperaturas de  $20^\circ\text{C}$  y pH 2.5 se observó una disminución mayor en el contenido de antocianina, compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes durante el almacenamiento.

## **RECOMENDACIONES**

Utilizar el método ultrasonido para la extracción del extracto antocianico.

Analizar la capacidad antioxidante aplicando los métodos de FRAP, ABTS Y ORAC aparte del método DPPH.

Utilizar Metanol como solvente para la extracción de antocianinas por el método de extracción asistida por microondas.

Aplicar otro diseño para optimizar aparte de taguchi ortogonal  $L_{18}(2 \times 3^{5-7})$ .

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abril, N., Bárcena, J. A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., & Peinado, J. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*, 1-8.
- Alzate, F., Idárraga, A., Díaz, O., & Rodríguez, A. (2013). *Flora de los bosques montanos de Medellín. Programa Expedición Antioquia 2013, Biodiversidad y Recursos Naturales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Andersen, M. & Markham K. (2006). *The Anthocyanins in Flavonoids*. London, New York: Taylor & Francis Group.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis 16th. *Método gravimétrico (930.15)*.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis 16th. *Determinación de proteína por el método Kjeldhal (960.10)*.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis 16th. *Método Soxhlet (920.85)*.
- AOAC. (1997). Official Methods of Analysis.16th. *Determinación de ceniza (923.3)*.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismo de protección. *Atenea*, 1-12.
- Ayala, K., & Beltrán, M. (2007). Determinación e identificación parcial del contenido de pigmentos betalaínas en la pulpa de cuatro variedades de pitaya *Stenocereus griseus* H. *IX Congreso de Ciencia de los Alimentos y V Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1-8.

- Ballard, S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., & O'Keefe, S. (2010). Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology. *Journal of agricultural and Food chemistry*, 3064–3072.
- Barea, M. (2015). Caracterización, Capacidad Antioxidante y Perfil Fenólico de Frutas Subtropicales Producidas y Comercializadas en la Costa de Granada-Málaga. En *Departamento de nutrición y bromatología* (págs. 1-305). Granada: Universidad de Granada.
- Baudi, S. (2006). Química de Alimentos. Naucalpan de Juárez, Mexico: Pearson Educación de México S.A.
- Baulis, A., Spomer, A., & Berber, M. (1994). Anthocyanin pigments: comparison of extract stability. *Journal of food science*. *Journal of food science*, 1219-1221.
- Bell, D., & Gochenaur, K. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J Appl Physiol*. *Journal Apply Physiology*, 1164-1170.
- Beltran, M. (2010). *Evaluación de la actividad antioxidante en tres estadios de madurez del sauco (sambucus peruviana l.) De nor yauyos-lima*. Huancayo, Perú: Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Blanco, C., & Sierra, M. (2005). Caracterización Bromatológica y Evaluación de Diferentes Niveles de Inclusión de Morera (*Morus alba* L.) y sauco (*Sambucus nigra* L.) en la alimentación en conejos en cebada. *Trabajo de Grado presentado para optar el título de zooctenistas*. Bogota, Colombia.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67-87.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology*, 25-30.
- Bratu, M., Doroftei, E., Negreanu, T., & Porta, S. (2012). Determination of Antioxidant Activity and Toxicity of Sauco (*Sambucus nigra*) Fruit Extract Using Alternative Methods. *Food Technology*, 177–182.

- Caballero, C., & Soria, D. (2017). *Elaboración de licor de sauco (Sambucus Nigra L.) En barricas de madera de castaño en el laboratorio de agroindustrias UTEA – abancay*. Abancay: Apurimac, Perú: Universidad Tecnológica de los Andes.
- Cabrita, L., Fossen, T., & Andersen, M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 101-107.
- Cacace, J., & Mazza, G. (2003). Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. . *Journal of food Science*, 240-248.
- Cahuana, C. (1991). Elaboración de una bebida alcohólica a partir de sauco (Sambucus). En *Facultad de Industrias Alimentarias*. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Carrillo, M. (2013). Vida útil de los alimentos. *Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias*, 1-25.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M., Rodríguez, J., & Galán-Vidal, C. (2009). Chemical studies of anthocyanins. *Food Chemistry*, 859–871.
- Cevallos-Casals, B., & Cisneros-Zevallos, L. (2004). Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Journal Science and technology*, 69-77.
- Chandra, A., Rana, J., & Li, Y. (2001). Separation, identification, quantification, and method validation of anthocyanins in botanical supplement raw materials by HPLC and HPLC-MS. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 49: 3515-3521.
- Coba, P., Mayacu, L., & Vidari, G. (2010). Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *Ciencia de la vida.*, 1-10.
- Comisión Nacional Contra la Biopiratería. (2017). *Boletín informativo del Sauco*. Lima, Perú: Indecopi.
- Coulter, T. (1984). *Food The chemistry of its components* (fourth ed.). London, New York: The Royal Society of Chemistry.
- De Callier, A. (1981). *Asi nos curamos en el Canipaco. Medicina tradicional del valle de canipaco*. Huancayo, Perú.

- De Rosso, V., & Mercadante, Z. (2007). Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system. *Innovate Food Science and emerging Technologies*, 347-352.
- Duan, W., Jin, S., Zhao, G., & Sun, P. (2015). Microwave-assisted extraction of anthocyanin from chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability. *Food Science*, 524 - 530.
- Durst, R., & Wrolstad, R. (2001). Separación y caracterización de antocianinas por HPLC. *Manual de Química Analítica de Alimentos.*, 1-13.
- Eiro, M., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7461-7466.
- Evaluación & Gestión Ambiental. (2014). Sexto informe nacional de residuos sólidos de la gestión del ámbito municipal y no municipal 2013. *Anuario de Gestión Ambiental*.
- Evans, L. (2004). UV-VIS Spectrophotometry: A Brief Background to Spectrophotometry. *Biochrom Ltd a division of harvard bioscience, Inc*, 1-15.
- Fenema, O. (2000). *Química de los Alimentos. 2ed.* España: Zaragoza SA.
- Fleschhut, J., Kratzer, F., & Rechkemmer, G. &. (2006). Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *European Journal of Nutrition*, 7-18.
- Flores, E. (2017). Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. *peruviana*) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la Obtención de Zumos Funcionales. 121-132.
- Fuentes, W. (2005). Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos de *Prunus capulicav.* (cereza), *rubusurticaefoliuspoir* (mora) y *sambucus canadensis* l. (sauco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *OFFARM*, 80- 84.



- González, A., & Guerrero, J. (2008). Betalaínas: importancia, presencia en vegetales y sus aplicaciones en la industria alimentaria. *Departamento de Ingeniería Química y Alimentos*, 1-9.
- Gonzalez, K. (2013). *Antocianinas en Maiz Azul, Evaluacion del Efecto de la Adicion de Cal y Calor a una Antocianina, La Pelargonidina*. Mexico: UNAM.
- Grajales, B., Botero, M., & Ramírez, J. (2015). Características, manejo, usos y beneficios del saúco (*Sambucus nigra* L.) con énfasis en su implementación en sistemas silvopastoriles del Trópico Alto. 1-14.
- Gutierrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.). Distrito Federal, Mexico: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A de C.V.
- Häkkinen, S. H., Kärenlampi, S. O., Heinonen, I. M., Mykkänen, H. M., & Törrönen, A. R. (1999). Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 47: 2274-2279.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in favonoid research since 1992. *Phytochesmistry*, 481-504.
- Hendry, G. (1996). *Natural Food Colorants* (Second ed.). blackie academic & professional.
- Hernandez, p., Pabón, L., & Rodriguez, M. (2015). Propiedades químicas y biológicas de Arbus unedo: una planta con potencial medicinal. 144 - 155.
- Hernandez-Herrero, J., & Frutos, M. (2014). Colour and antioxidant capacity stability in grape, strawberry and plum peel model juices at different pHs and temperature. *Food Chemistry*, 199-204.
- Honda, R. (1986). *Investigación de antocianinas en el sauco*. Callao: Universidad Nacional del Callao.
- Hou, Z., Qin, P., Zhang, Y., Cui, S., & Ren, G. (2013). Identification of anthocyanins isolated from black rice (*Oryza. Sativa* L.) and their degraation kinetics. *Food Research International*, 691-697.
- Hutchings, J. (1999). *Food color and appearance gaitthersburg, md.: aspen publishers, inc. 1999.* (Segunda ed.). Aspen publishers,Inc.

- INEI. (2014). Residuos Sólidos. Anuario Estadística Ambiental. Lima, Perú.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2018). *Perú: indicadores de Gestión Municipal 2018*. Lima.
- Jackman, L & Smith, L. (1996). Anthocyanins and betalains in Natural Food Colorants.
- Justo, D. (2017). Efecto del deshidratado osmótico en la estabilidad de antocianinas del saúco (*Sambucus peruviana* HBK) a diferentes temperaturas y concentraciones de jarabe de sacarosa. *Tesis para optar el título profesional de ingeniero en industrias alimentaria. Universidad Nacional del Centro del Perú*. Huancayo, Perú.
- Kähkönen, M., Hopia, A., & Aleinonen, M. (2001). Berry fenolies and their antioxidant activity. *Journal of Agriculture and food chemistry*, 4076-4082.
- Kaimainen, M. (2014). Stability of Natural Colorants of Plant Origin. Turku: Finland. *Food Chemistry and Food Development Department of Biochemistry*.
- Kallio, H., Pangborn, R., & Jennings, W. (1986). Effect of heating on the headspace volatiles of finnish birch syrup university of california, davis, california 95616, usa. *Department of food science & technology*.
- Kalt, K., Lawy, C., Ryan, D., McDonald, J., Donner, H., & Forney, F. (2003). Oxygen radical absorbing capacity, anthocyanin y phenolic content of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L) during ripening and storage. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 917-923.
- Kilham, C. (2000). Health Benefits Boost Elderberry. *Herbal Gram*, 50: 55-57.
- Kirca , A., & Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry.*, 583–587.
- Konczak, I., & Zhang, W. (2004). Anthocyanins—More Than Nature's Colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Krishnaiah, K., & Shahabudeen, P. (2012). *Applied design of experiments and taguchi methods*. New delhi, India: PHI Learning Private Limited.
- Kumar, V., & Gill, K. (2018). *Basic Concepts in Clinical Biochemistry: A Practical Guide*. Singapore : Springer Nature .

- Kurmar, S. (2006). *Organic Chemistry: Spectroscopy of Organic Compounds. Department of Chemistry.*
- Li, H; Deng, Z; Wu, T; Liu, R; Loewen, S & Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities. *Food Chemistry*, 928–936.
- Liazid, A., Guerrero, R., Cantos, E., Palma, M., & Barroso, C. (2011). *Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins.* Spain: Food Chemistry.
- Linares, N. (2013). *Planta Medicinales. La farmacia de la naturaleza.*
- López, J. (2003). Las plantas y sus pigmentos. *Universo Botánico*, 1-6.
- Lourdes, B., García, L., Rojo, D., & Sanchez, E. (2002). Plantas con propiedades antioxidantes. *Cubana Investigación Biomédica*, 214-216.
- Lovera, J. (2007). *Análisis comparativo de las propiedades físicas y químicas del fruto de sauco (Sambucus peruviana H.B.K.) evaluadas en dos rangos altitudinales en la parte alta de la cuenca del río Llaucano Cajamarca - Perú.* Lima, Perú: Universidad Agraria La Molina. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/507>
- Markham, R; Gould, S; Winefield, S; Mitchell, A; Bloor, J; Boase, R. (2000). Anthocyanic vacuolar inclusions - their nature y significance in flower coloration. *Phytochemistry*, 327-336.
- Márquez, C., Otero, C., & Osorio, J. (2004). Actividad antioxidante y concentración de compuestos fenólicos del tomate de árbol (*Cyphomandra betacea* S.) en poscosecha. *Temas Agrarios*, 173-184.
- Medrano, L. (1992). Subproductos agrícolas y su utilización en el sistema integrado de producción. *Curso alternativas no tradicionales para alimentación de rumiantes.*
- Mendes, M., Carvalho, A., Magalhaes, J., Moreira, M., Guido, L., Gomes, A., & Delerue-Matos, C. (2016). Response surface evaluation of microwave-assisted extraction conditions for *Lycium barbarum* bioactive compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 319-326.

- Meza, J. (2011). *Evaluación de la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles totales en el fruto de sauco (sambucus peruviana HBK) provenientes de la provincia de Tarma y Huancayo*. Huancayo, Perú: Universidad Nacional del Centro del Perú. Obtenido de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/1949>
- Mills, J. (1997). Artemis elderberry: from field to food. *Proceedings of the Natural Colors and Flavors Meeting*, 1-10.
- Mojica, L.; Berhow, M & Gonzalez, E. (2017). Black bean anthocyanin-rich extracts as food colorants: Physicochemical stability and antidiabetes potential. *Food Chemistry*, 628–639.
- Mónica, G., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*.
- Montgomery, D. (1997). *Design and analysis of experiments* (Cuarta ed.). John Wiley and Sons.
- Moyer, R., Hummer, K., Finn, C., Frei, B., & Wrolstad, R. (2002). Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 19-25.
- Muñiz, D., Martínez, J., Won, J., & Belmares, R. (2013). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Laurus nobilis* L. and their antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1149- 1154.
- Mustafa Özgen, J., Scheerens, N. R., & Raymond, M. (2010). Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacognosy Magazine*, 198-203.
- Nimeroff, I. (1968). *Colorimetry*. Washington D.C., The United State: Institute for Basic Standards.
- Olaya, C; Castaño, M & Garzón, G. (2009). Stability of anthocyanins from *rubus glaucus* and *solanum betaceum* cav. dark-red strain as affected by temperature, storage and water activity.
- Paladino, S. (2008). Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (*Vitis vinífera* L). *Universidad Nacional de Cuyo*.

- Pascual, S., & Sanchez, M. (2007). Antocianinas: de la planta a la salud. *Fitoquímica*.
- Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., & Nitithamyong, A. &. (2008). Changes of antioxidant activity y total phenolic compounds during storage of selected fruits. *Journal Food Composition Analysis*, 241–248.
- Peréz, J. (2014). Evaluación de los Parámetros Óptimos, para la Aceptabilidad del Néctar mix de Sauco (*Sambucus peruviana* L) ~Membrillo (*Cydonia oblonga* L). *Ciencia y Tecnología de los productos agroindustriales*, 1-75.
- Pérez-Serradilla, A., & Luque de Castro, D. (2011). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food chemistry*, 1652–1659.
- Philpott, M., Gould, K., Lim, C., & Ferguson, L. (2004). In situ y in vitro antioxidant activity of sweet potato anthocyanins. *Journal of agricultural and Food chemistry*., 1511-1513.
- Pretell, C., Ocaaea, V., John, J., & Barahona, C. (1985). *Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana*. Lima.
- Prior, R., Cao, G., Martin, A., Sofic, C., Ewen J, O. C., Lischner, N., . . . Mailly, C. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic y anthocyanin content, maturity, y variety of vaccinium species.
- Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. (F. C. Division, Ed.) *Department of Applied Chemistry and Microbiology* .
- Revilla, E., Ryan, J., & Ortega, M. (1998). Revilla, E.; Ryan, J. & Ortega, M.G. (1998) “Comparison of several procedures used for the Extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal Agriculture.Food Chemistry*, 4592 – 4597.
- Reyes, B. (2007). Investigación sobre la basura. 1-30.
- Roberto, I., Mussatto, S., & Rodríguez, R. (2003). Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products*, 171-176.
- Rodrigo, j., Alvarez, E., De la rosa, L., Mercado, G., & Herrera, B. (2006). Valoración de la capacidad antioxidante y actividad polifenol oxidasa en duraznos a diferentes

- áreas de producción. *I Simposio Iberoamericano de Vegetales Frescos Cortados: Aseguramiento de la calidad microbiológica*, 111-116.
- Rodríguez-Saona, L., Giusti, M., & Wrolstad, R. (1998). Anthocyanin pigment composition of red-fleshed potatoes. *Journal Food Science*, 458-465.
- Romero, I. (2008). *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino papel de los enzimas de maceración*. Murcia, España: Universidad de Murcia. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10803/11064>
- Rosales, J. (2015). *Influencia de la temperatura y velocidad de aire en la cinética de degradación de las antocianinas del Sauco (Sambucus Peruviana H.B.K.) durante el secado por convección*. Huancayo, Perú: Universidad Nacional del Centro del Perú. Obtenido de <http://repositorio.uncp.edu.pe/handle/UNCP/1590>
- Sánchez, S., & Paniagua, L. (2008). *Biosensores amperométricos de tirosinasa para la determinación de compuestos fenólicos en medios acuosos y no acuosos*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/8131/1/T30542.pdf>
- Schellenberg, G., & Wilhelm, B. (1914). *Neueste und wichtigste Medizinal Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erklärendem Texte. (Ergänzungsband II zu den Köhler'schen Medizinal- Pflanzen)* (Vol. III). New York, The United States of America.
- Schwartz, S., Von-Elbe, H., & Giusti, M. (2008). *Colorants in Fennema's Food Chemistry* (Fourth ed.). New York, United States: Taylor & Francis Group.
- Silva, M., Rogez, H., & Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 381-387.
- Sinha, K., Das Saha, P., & Datta, S. (2012). Response surface optimization and artificial neural network modeling of microwave assisted natural dye extraction from pomegranate rind. *Industrial Crops and Products*, 408-414.
- Sousa, S. (2016). Purification of polyphenols from green tea leaves by ultrasound assisted ultrafiltration process. 188-198.

- Stintzing, C., Stintzing, R., Carle, R., & Frei, B. &. (2002). Color y propiedades antioxidantes de pigmentos de antocianinas basados en cianidina. *Diario de la química agrícola y alimentaria*, 6172-6181.
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 247-269.
- Su, M., & Chien, P. (2007). Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, 182-187.
- Taguchi, G., & Rajesh, J. (2002). *The Mahalanobis-Taguchi Strategy: A Pattern Technology System*. Canada: John Wiley & Sons.
- Talavéra, S., Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Mazur, A., Lamaison, J., & Rémésy, C. (2006). Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract y its impact on plasma antioxidant capacity in rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90-97.
- Tapia, E., & Fries, A. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Lima, Perú: FAO & ANPE.
- Tejero, J. (2012). *Caracterización químico-física y toxicológica de las lectinas antinutricionales ebulina f y SELfd de frutos de Sambucus ebulus L*. España: Universidad de Valladolid.Facultad de Medicina. Obtenido de <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/2769>
- Thole, Kraft, Sueiro, Kang, Gills & Cuendet. (2006). A comparative evaluation of the anticancer properties of European and American elderberry fruits. *Journal Medicinal Foods*, 498-504.
- Timberlake, C. (1980). Anthocyanins-occurrence, extraction and chemistry . *Food Chemistry* , 69-80.
- Tonon, R., Brabet, C., & Hubinger, M. (2010). Anthocyanin stability and antioxidant activity of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart.) juice produced with different carrier agents. . *Food Research International*.

- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 4113-4117.
- Wang, H., Race, E., & Shrikhye, A. (2003). Characterization of anthocyanins in grape juice by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1839–1844.
- Wang, S., & Xu, S. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 271-275.
- Xiani, S., Solène, B., & Weibiao, Z. (2016). Changes in the color, chemical stability and Antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. *Food Chemistry*, 516-524.
- Youdim, K., Martin, A., & Joseph, J. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biology Medical*, 51-60.
- Zoric, Z., Dragovic-Uzelac, V., Pedisic, S., Kurtanjek, Z., & Garofuli, I. (2014). Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry marasca paste. *Food Technology and Biotechnology*, 101-108.



## ANEXOS

### ANEXO 1. Extracción de antocianinas por EAM



**Figura 21.** Recepción de materia prima



**Figura 22.** Acondicionamiento de la cáscara



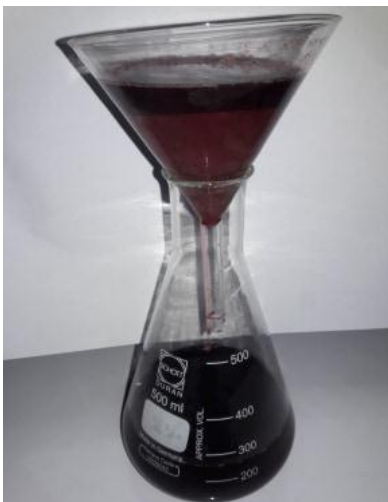
**Figura 23. Cáscara de sauco molido**



**Figura 24. Harina de cáscara de sauco**



**Figura 25. Extracción del extracto**



oz

**Figura 26.** Filtración del extracto

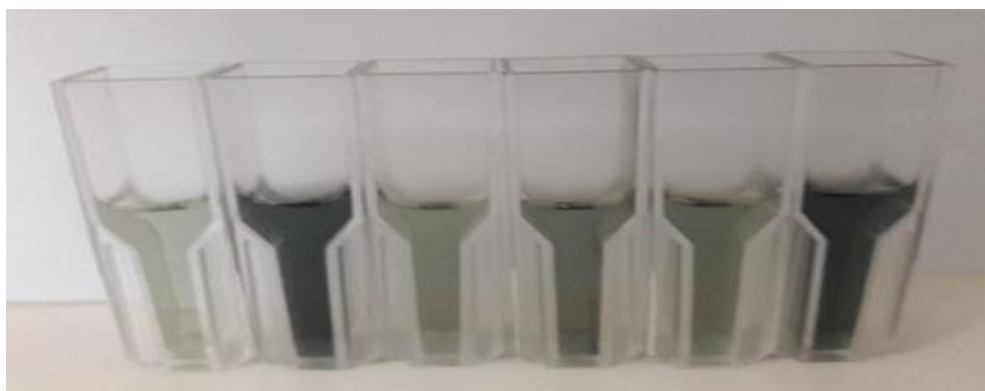
**Figura 27.** Extracto envasado

**ANEXO 2.** Análisis de concentración de antocianinas



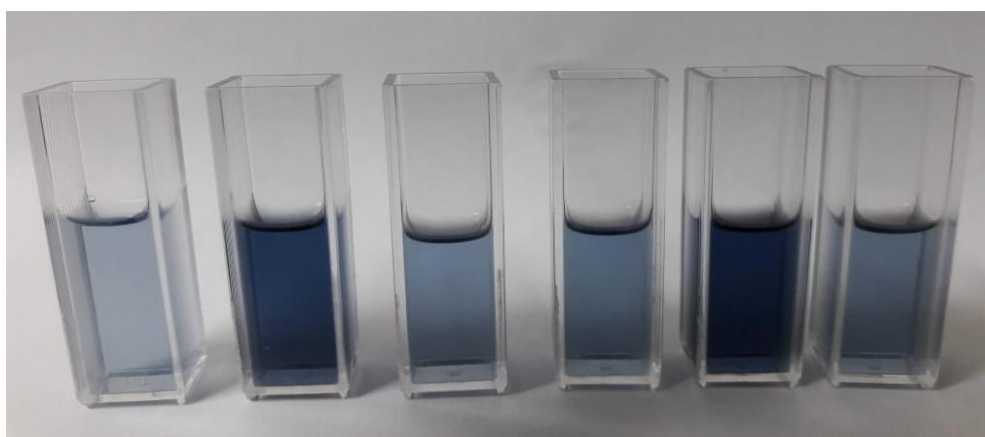
**Figura 28.** Extracto diluido para la lectura de absorbancia

**ANEXO 3.** Análisis de compuesto fenólicos



**Figura 29.** Extracto diluido para la lectura de absorbancia de compuestos fenólicos

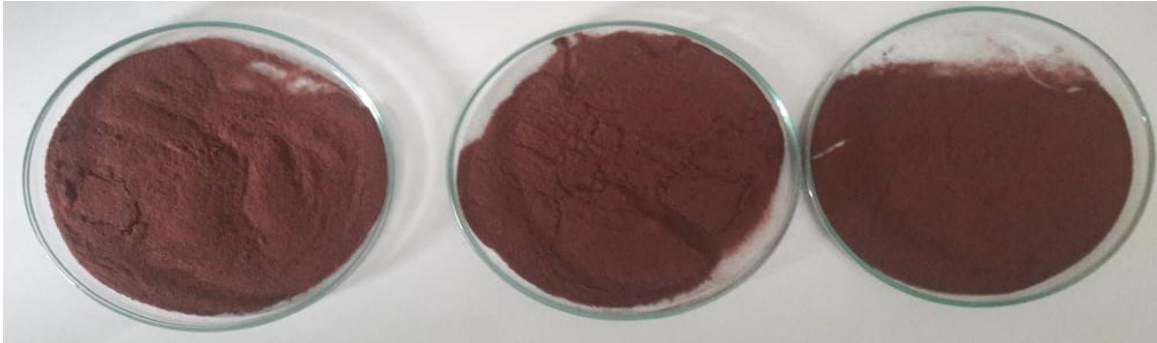
**ANEXO 4.** Análisis de antioxidante por el método DPPH





**Figura 30.** Extracto diluido para la lectura de absorbancia de capacidad antioxidante

**ANEXO 5.** Caracterización de materia prima



**Figura 32.** Determinación de humedad



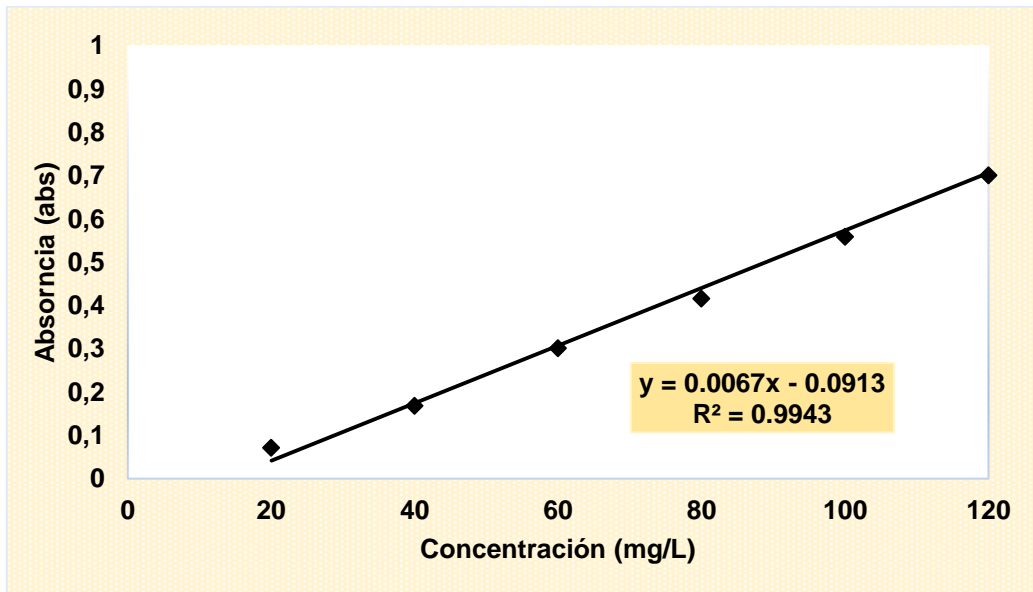
**Figura 31.** Determinación de proteína

**ANEXO 6.** Extracción de la estabilidad fisicoquímica de antocianina

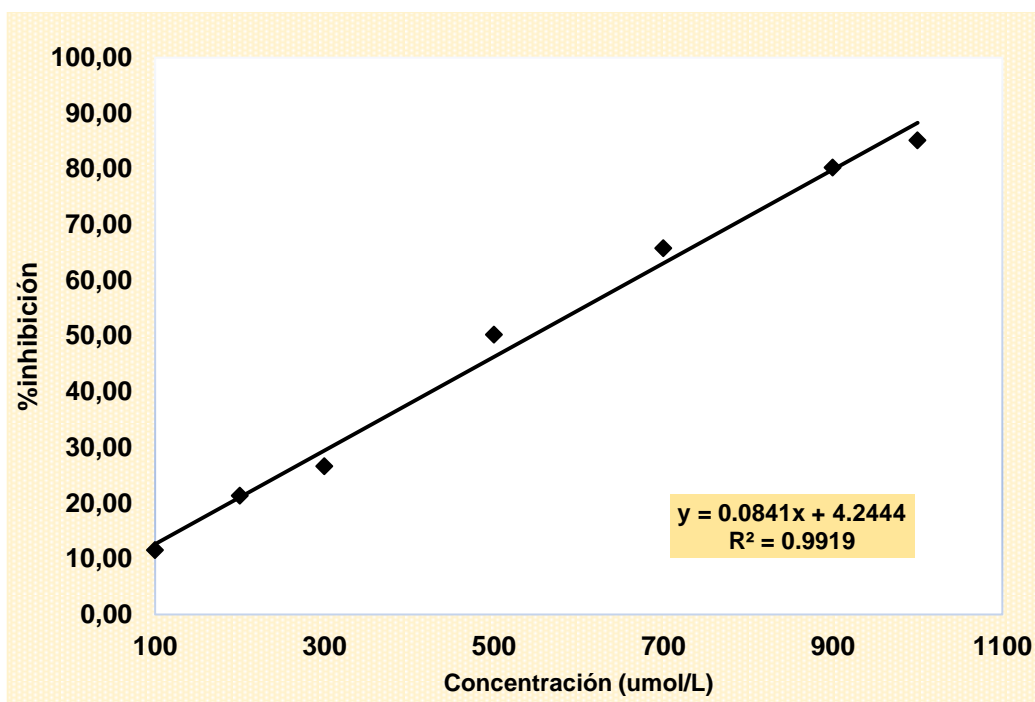


Figura 33. Extractos con diferentes pH

ANEXO 7. Curva estándar para la cuantificación de compuesto fenólico



**ANEXO 8.** Curva estándar de Inhibición para la cuantificación de antioxidante



**ANEXO 9.** ANOVA, de la estabilidad de antocianinas en el almacenamiento

Contenido de Antocianinas					
Variables	GL	SS	MS	Valor F	p-valor
Tiempo	3	22659	7553	402268	0.000
Temperatura (°C)	1	34750	34750	1850759	0.000
pH	3	44621	14874	792154	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)	3	6391	2130	113452	0.000
Tiempo*pH	9	152	17	898	0.000
Temperatura (°C)*pH	3	637	212	11310	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)*pH	9	140	16	827	0.000
Error	64	1	0		
Total	95	109350			
Contenido de Compuestos Fenólicos					
Variables	GL	SS	MS	Valor F	p-valor
Tiempo	3	11034	3678	380002	0.000
Temperatura (°C)	1	14799	14799	1528998	0.000
pH	3	48029	16010	1654047	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)	3	1294	431	44562	0.000
Tiempo*pH	9	163	18	1865	0.000

Temperatura (°C)*pH	3	316	105	10882	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)*pH	9	184	20	2114	0.000
Error	64	1	0		
Total	95	75820			
Capacidad Antioxidante					
	GL	SS	MS	Valor F	p-valor
Tiempo	3	13578.2	4526.1	3116956	0.000
Temperatura (°C)	1	6556.3	6556.3	4515095	0.000
pH	3	7784	2594.7	1786869	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)	3	1466.3	488.8	336588	0.000
Tiempo*pH	9	35.5	3.9	2720	0.000
Temperatura (°C)*pH	3	264	88	60613	0.000
Tiempo*Temperatura (°C)*pH	9	178.2	19.8	13637	0.000
Error	64	0.1	0		
Total	95	29862.7			