



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MÉXICO



FACULTAD DE QUIMICA

**EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE FRESA  
DESHIDRATADA Y LIOFILIZADA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERO QUÍMICO

PRESENTA

JESSICA GUTIÉRREZ ROMERO

ASESOR ACADÉMICO

DR. EN C. JULIÁN CRUZ OLIVARES

TOLUCA, MEXICO

OCTUBRE 2019

## AGRADECIMIENTOS

## CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	11
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	12
2.3 HIPÓTESIS.....	12
CAPITULO III. MARCO TEÓRICO.....	13
3.1 FRESA (Fragaria).....	14
3.1.1 Botánica.....	14
3.1.2 Producción.....	15
3.1.3 Propiedades.....	15
3.1.4 QUÍMICA DE LA FRESA.....	16
3.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	17
3.2 PIGMENTOS.....	18
3.3 FLAVONOIDES.....	19
3.4 ANTOCIANINAS.....	20
3.4.1 Estabilidad de las antocianinas.....	22
3.4.2 Influencia del pH.....	22
3.4.3 Influencia de la temperatura.....	24
3.4.4 Influencia del oxígeno.....	24
3.4.5 Copigmentación.....	24
3.5 SECADO DE LA MATERIA PRIMA.....	25
3.5.1 SECADO AL HORNO.....	25
3.5.2 LIOFILIZACIÓN.....	25
3.6 PROCESO DE SEPARACIÓN.....	28
3.6.1 EXTRACCIÓN SOXHLET.....	28

3.7 CARACTERIZACIÓN .....	30
3.7.1 COLORIMETRÍA .....	30
3.7.2 ESPECTROFOTOMETRÍA UV .....	31
3.7.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC).....	32
3.7.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO .....	34
CAPITULO IV. METODOLOGÍA.....	36
4.1 SECADO DE LA FRESA.....	36
4.1.1 SECADO AL HORNO.....	36
4.1.2 LIOFILIZACIÓN .....	36
4.2 EXTRACCIÓN SOXHLET .....	37
4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS.....	38
4.3.1 COLORIMETRÍA .....	38
4.3.2 TITULACIÓN .....	38
4.3.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC).....	39
4.3.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV .....	39
4.3.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO .....	40
CAPITULO V. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	41
5.1 EXTRACCIÓN SOXHLET .....	42
5.2 CARACTERIZACIÓN .....	42
5.2.1 COLORIMETRÍA .....	42
5.2.2 TITULACIÓN .....	43
5.2.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC).....	44
5.2.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV .....	46
5.2.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO .....	47
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS .....	53
ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la fresa. (Koetcha & Madhavi, 1995) .....	16
Tabla 2. Diferencias entre el Secado Convencional y la Liofilización (Ramírez-Navas, 2007) .....	27
Tabla 3 Reveladores para Cromatografía en capa fina.....	32
Tabla 4 Mezclas de solventes para la extracción soxhlet.....	37
Tabla 5. Tiempos de obtención de los extractos de fresa. ....	42
Tabla 6. Coordenadas CIELAB de los extractos de fresa liofilizada. ....	43
Tabla 7Coordenadas CIELAB de los extractos de fresa secada al horno. ....	43
Tabla 8. Resultados de Ensayo Shinoda en los extractos de fresa. ....	43
Tabla 9. Resultados de la prueba con pH alcalino de los extractos de fresa. ....	44
Tabla 10. Resultados de la prueba con pH ácido de los extractos de fresa. ....	44
Tabla 11. Rf obtenidos de la fresa secada al horno .....	45
Tabla 12. Rf obtenidos de la fresa liofilizada.....	45
Tabla 13 Absorbancias obtenidas de los extractos de fresa diluidos. ....	46
Tabla 14 Contenido de antocianinas totales en los extractos de fresa. ....	47

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de la fresa. (SAGARPA, 2017) .....	14
Figura 2. Estructura de la Pelargonidina-3-glucósido. ....	17
Figura 3. Clasificación de flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002) .....	20
Figura 4 Antocianinas más comunes en la naturaleza. (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015) .....	21
Figura 5. Influencia del pH en la estructura química de las antocianinas y su reacción de degradación. R1 = H o sacárido, R2 y R3 = H o metilo. (Castañeda-Ovando et al., 2009) .....	23
Figura 6. Extractor Soxhlet.....	29
Figura 7. Diagrama representativo CIELAB.....	30
Figura 8. Características espectrales de antocianinas purificadas en buffer de pH 1.0 y pH 4.5 .....	31
Figura 9.Espectro IR obtenido de los extractos de pelargonidina-3-glúcosido.....	48
Figura 10. Horno Hamilton Beach para llevar a cabo la deshidratación de la fresa. 61	
Figura 11. Liofilizador LABCONCO para.....	61
Figura 12. Montaje del equipo Soxhlet para la extracción de las antocianinas. ....	62
Figura 13. Extracto de fresa obtenido después extracción Soxhlet. ....	63
Figura 14. Rotavapor .....	64
Figura 15. Ensayos de Titulación realizados en los extractos de fresa. ....	64
Figura 16. Espectros de Cromatografía de Capa Delgada (TLC) UV VIS. ....	65

## RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de determinar y comparar el contenido de antocianinas totales en el extracto de la fresa liofilizada contra la fresa secada al horno, obteniendo los extractos mediante el método de extracción soxhlet, con etanol, metanol y mezclas metanol-agua (50/50, 60/40, 75/25, 40/60 y 25/75) y etanol-agua (50/50, 60/40, 75/25, 40/60 y 25/75) como solventes utilizados en la extracción de las antocianinas. Se realizaron pruebas de colorimetría e identificación de antocianinas, en las cuales efectivamente se observó la presencia de antocianinas, llegando a la conclusión de que la fresa **liofilizada** tiene mayor rendimiento contra la fresa secada al horno y el mejor solvente a utilizar en las extracciones es el **metanol**, ya que se observó una mayor extracción del colorante y mejor estabilidad, pero se optó por usar alcohol etílico por la toxicidad que presenta el metanol.

Palabras clave: Colorante natural, fresa, liofilización, extracción soxhlet.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN



## 1. INTRODUCCIÓN

El uso de colorantes en la industria alimenticia para la mejora en la apariencia de los alimentos ha sido un tema importante desde hace ya varias décadas. La demanda de pigmentos naturales por la industria alimentaria es cada vez más alta. Los productores de alimentos están optando por colorantes naturales, debido a que algunos colorantes sintéticos han ocasionado problemas de salud al consumidor. Esta demanda puede ser satisfecha por medio de la investigación para ofrecer una forma más natural y saludable de brindar color a los alimentos y al mismo tiempo no afectar la salud del consumidor.

Las antocianinas son pigmentos naturales que se encuentran ampliamente en las plantas como las frutas y flores, poseen un gran potencial para reemplazar a los colorantes sintéticos. En este contexto, la extracción de antocianinas ha demostrado ser una excelente alternativa como pigmento natural en la industria alimenticia, así mismo ha creado interés debido a sus características como antioxidante que brindan mejoras a la salud, lo que las hace una excelente opción para aprovechar como alternativa en la industria alimenticia como pigmentos con un valor agregado.

El carácter polar de la molécula de antocianina permite su solubilidad en muchos disolventes diferentes, como alcoholes, acetona, dimetilsulfóxido y agua. La elección del método de extracción debe maximizar la recuperación del pigmento con una cantidad mínima de subproductos y una mínima degradación o alteración del estado natural. El metanol es el solvente más comúnmente utilizado para la extracción de antocianinas porque su bajo punto de ebullición permite una rápida concentración del material extraído. Sin embargo, el extracto resultante contiene contaminantes de baja polaridad y puede ser necesaria una purificación adicional. (Rodríguez-Saona & Wrolstad, 2001).

A pesar de las ventajas que ofrecen las antocianinas como sustitutos potenciales de los colorantes artificiales, factores como su baja estabilidad y la falta de disponibilidad

de material vegetal limitan su aplicación comercial (Garzón, 2008). Su importancia ha hecho interesante la búsqueda de un método de extracción con las condiciones adecuadas para obtener dicho compuesto de la manera más óptima.

La fruta de la planta de fresa representa una fruta atractiva, rica en materia nutricional importante y esencial. La fruta está compuesta por una amplia variedad de sustancias orgánicas y minerales responsables de su alto valor nutricional, medicinal y dietético, son una fuente conocida de vitamina C y antocianinas en particular. (Popovski & Popovska, 2016). Por ello la fresa es considerada como una buena fuente de antocianinas para uso como pigmento natural.

## CAPITULO II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

## 2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar y comparar el contenido de antocianinas totales en el extracto de la fresa liofilizada contra la fresa secada al horno, basado en la colorimetría del extracto.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer las antocianinas que contiene el fruto de la fresa mediante extracción soxhlet.
- Determinar la efectividad del metanol, etanol y mezclas metanol-agua y etanol-agua en diferentes proporciones, para la obtención de antocianinas por medio de la extracción soxhlet.
- Identificar las antocianinas contenidas en la fresa.

## 2.3 HIPÓTESIS

De acuerdo con la colorimetría y absorbancias, se obtiene un contenido de antocianinas totales en el extracto de fresas liofilizadas mayor al de la fresa secada al horno.

## CAPITULO III. MARCO TEÓRICO

### 3.1 FRESA (FRAGARIA)

Es una planta perenne de la familia de las Rosáceas, que brota cada año. La fruta, que comúnmente es conocida como fresa, es una baya roja pequeña, es de color rojo intenso con forma y sabor únicos y madura rápidamente (Sharma, Joshi, & Abrol, 2009); la maduración se produce en 20 a 50 días después de la polinización.



*Figura 1. Fruto de la fresa. (SAGARPA, 2017)*

#### 3.1.1 BOTÁNICA

Tallos florales sin hojas que sostienen flores con cinco pétalos, cinco sépalos y numerosos estambres. Hojas divididas en tres hojuelas ovaladas dentadas, verde brillante arriba; Produce estolones de enraizamiento largo donde pueden crecer nuevas plantas. La fresa es una fruta accesoria, ya que la parte comestible no es de origen ovárico (está en su mayor parte tejido de receptáculo hinchado). Las verdaderas frutas que contienen la semilla de la fresa son los acenos, que son similares a las pequeñas semillas de girasol. Los acenos son las numerosas motitas elipsoidales que cubren la superficie de la fruta (Koetcha & Madhavi, 1995).

### 3.1.2 PRODUCCIÓN

La fresa es considerada un producto con éxito en el comercio internacional, se exporta el 52.21% de la producción nacional de la fresa. México con un valor de 14.83% de las exportaciones mundiales de fresa ocupa el tercer lugar como proveedor de fresa al mercado internacional y en Estados Unidos representa el 87.79% de sus importaciones (SAGARPA, 2017).

Las importaciones mundiales han aumentado en un 35.55% en los últimos 10 años, lo que ha incrementado las exportaciones mexicanas. Actualmente se satisface por completo los requerimientos nacionales con la producción interna (SAGARPA, 2017).

### 3.1.3 PROPIEDADES

El fruto de la fresa posee la actividad hidratante que la hace distintiva, esta propiedad se debe a su contenido de hidratos de carbono y  $\alpha$ -hidroxiácidos (AHA). (Yu & Van Scott, 2002)

Los hidratos de carbono son capaces de absorber agua y mantener el nivel de humedad de la capa córnea, formando enlaces de hidrogeno y evitando la deshidratación por la pérdida de agua; mientras que los  $\alpha$ -hidroxiácidos (AHA) actúan adelgazando el estrato córneo y mejoran la flexibilidad de la piel (Yu & Van Scott, 2002). El extracto de fresa es recomendable para formular productos con acción hidratante.

La fresa posee actividad antioxidante proveniente de la vitamina C y compuestos fenólicos que la hacen ser un fruto recomendable para formular productos para proteger la piel y el cabello contra procesos oxidativos.

La fresa contiene a las llamadas antocianinas, un tipo de flavonoides que tienen acción vitamínica P, disminuyen la fragilidad capilar y aumentan su resistencia (López-Luengo, 2002).

### 3.1.4 QUÍMICA DE LA FRESA

Tabla 1. *Composición química de la fresa. (Koetcha & Madhavi, 1995)*

Sólido Soluble Total (%)	10.2
Azúcares totales (%)	5.0
Acidez (%)	0,52-2,26
Ácido ascórbico (mg / 100 g)	89
Caroteno (mg / 100 g)	0.15
Tiamina (mg / 100 g)	0.03
Riboflavina (mg / 100 g)	0.027
Ácido nicotínico (mg / 100 g)	0.6
Minerales (%)	0.5
Fósforo (mg / 100 g)	23
Potasio (mg / 100 g)	161
Sodio (mg / 100 g)	1.5
Calcio (mg / 100 g)	22
Magnesio (mg / 100 g)	11.7

#### Carbohidratos

Los azúcares constituyen uno de los principales componentes solubles de la fresa. (Koetcha & Madhavi, 1995)

#### Ácido orgánico

El ácido orgánico más abundante en la fresa es el ácido cítrico y contiene en menor proporción los ácidos málico, quínico y succínico. (Berlitz & Grosh, 1997)

#### Vitaminas

La vitamina C es la más importante de la fresa, también es fuente de tiamina, riboflavina y ácido nicotínico. (Koetcha & Madhavi, 1995)



## Compuestos de fenol

La antocianina principal en las frutas de la fresa es pelargonidina 3-glucósido (Pg 3-glucósido), como se identificó por primera vez por Robinson (1931). También es encontrada en proporciones más pequeñas la cianidina 3-glucósido (Cy 3-glucósido) (da Silva, Escribano-Bailón, Pérez, Rivas-Gonzalo, & Santos-Buelga, 2007).

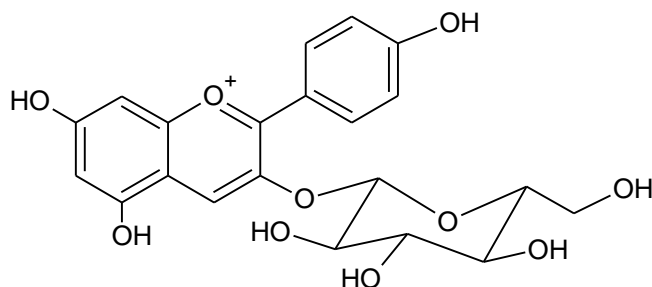


Figura 2. Estructura de la Pelargonidina-3-glucósido.

### 3.1.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Las fresas poseen muchos nutrientes como vitaminas y minerales, pero también contienen ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas; las antocianinas, son los polifenoles más importantes que contiene la fresa y a los que, junto con la vitamina C, se les atribuye su alta actividad antioxidante ( H. Wang, Cao, & Prior, 1996; Heinonen, Meyer, & Frankel, 1998; Wang & Jiao, 2000)).

- Vitamina C

La vitamina C es un antioxidante que sirve para el tratamiento del fotoenvejecimiento, tiene la capacidad de neutralizar los radicales libres generados por la radiación UVB (Chiu & Kimball, 2003).

- Compuestos de fenol.

Los compuestos de fenol inhiben enzimas implicadas en procesos oxidativos y estimulan otras enzimas con propiedades antioxidantes, por medio de estos

mecanismos, los compuestos fenólicos deterioran las reacciones de propagación de los radicales libres y detienen su formación (Trueba, 2003).

La capacidad antioxidante que contiene la fresa hace posible reducir a los radicales libres que inducen el envejecimiento y quelar metales (hierro), impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres (López-Luengo, 2002).

### 3.2 PIGMENTOS

Los pigmentos son compuestos químicos que absorben luz en la longitud de onda de la región visible. La producción de color depende de la estructura molecular, a través de la cual se captura energía y se produce excitación electrónica, esta energía es reflejada y se captura por el ojo humano, produciendo impulsos neuronales que se interpretan como color (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000).

Los pigmentos por su origen se clasifican como naturales o sintéticos. Los pigmentos naturales se producen por organismos vivos como las plantas, animales, hongos y microorganismos; mientras que los pigmentos sintéticos se obtienen por síntesis química en laboratorio (Delgado-Vargas et al., 2000).

Los colorantes naturales se agrupan en diferentes clases debido a las diferencias en su estructura, las tres más importantes son los tetrapirroles, tetraterpenoides y flavonoides (Aberoumand, 2011).

Los tetrapirroles presentan un amplio intervalo de colores en tonalidades verdosas (Cañizares, Leal, Ramírez, Noyola, & Márquez, 1998). El miembro más importante de los tetrapirroles es la clorofila.

Los tetraterpenoides son el segundo grupo de pigmentos más abundantes. Incluyen los carotenoides, se encuentran presentes en vegetales, bacterias e insectos, con

tonalidades que van del amarillo al rojo y pueden ser reactivos por la presencia de dobles enlaces conjugados (Aberoumand, 2011).

Los flavonoides son el tercer grupo de pigmentos, entre los cuales se encuentran las antocianinas (Cañizares, Leal, Ramírez, Noyola y Márquez, 1998). Las antocianinas son un grupo de flavonoides que proporcionan el tono rojo-púrpura de muchas frutas, en particular bayas, por ejemplo, fresas, bayas de saúco y grosellas negras.

Otras clases de colorantes son las antraquinonas (carmín, lac, kermes y madder) y las betalainas (betabel) (Aberoumand, 2011).

### 3.3 FLAVONOIDES

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en alimentos, etc. (Martínez-Flórez, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2002).

Los flavonoides tienen capacidad antioxidante debido a que contienen en su estructura química grupos hidroxilo fenólicos y propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los flavonoides poseen un esqueleto básico de quince átomos de carbono, que en su nivel más simple consta de dos anillos fenilo (anillos A y B) ligados por un puente tricarbonado, que en la mayoría de clases se encuentra formando un tercer anillo heterocíclico (anillo C) (Iwashina, 2000).

En función a sus características estructurales se pueden clasificar en flavanos, flavonoles, flavonas y antocianidinas.

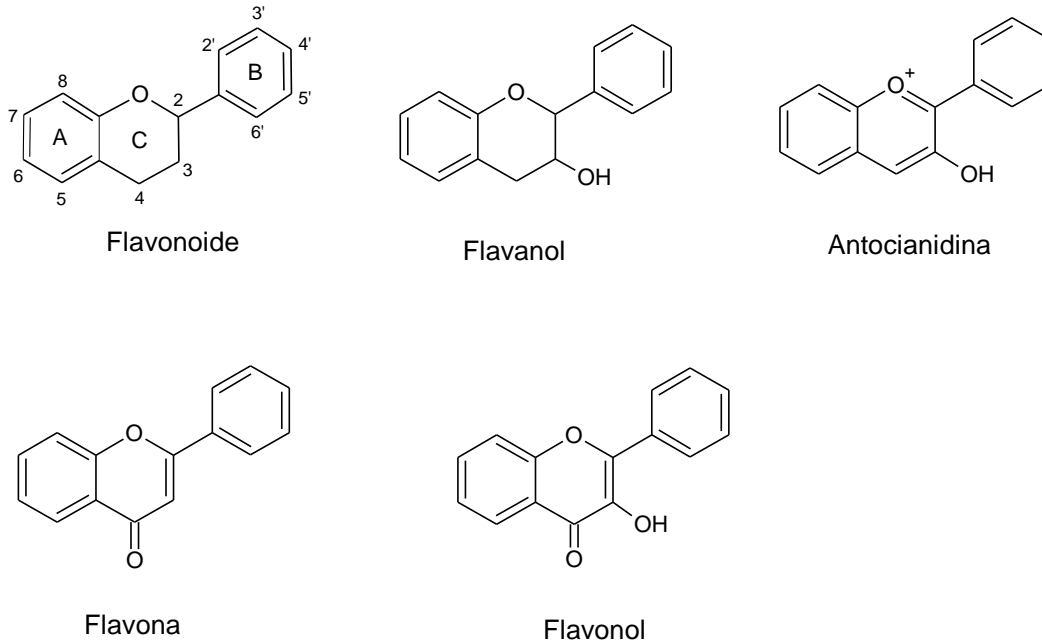


Figura 3. Clasificación de flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002)

Los flavonoides poseen propiedades que mejoran la salud, son estudiados principalmente por sus efectos antioxidantes.

### 3.4 ANTOCIANINAS

Las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas, entre sus propiedades principales se encuentra su actividad antioxidante que previene enfermedades neuronales y cardiovasculares (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). Su actividad antioxidante proviene de su estructura química, como sus grupos fenilo, la disponibilidad de grupos donadores de electrones y de extracción de electrones en la estructura del anillo, el grado de conjugación estructural y la carga positiva de las antocianinas

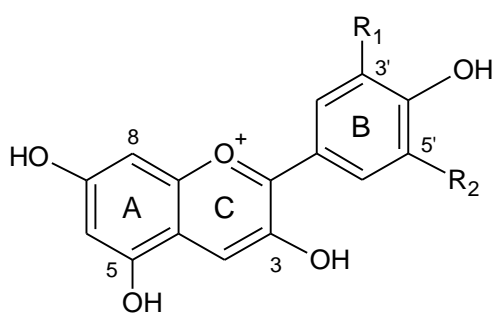
Las antocianinas son consideradas el grupo de pigmentos más grande encontrados en el reino vegetal, son estudiadas como colorantes naturales para la industria

alimenticia, comprenden los tonos desde el rojo hasta el azul (Jefferson-Lopes, Fonseca-Xavier, Novy-Quadri, & Bastos-Quadri, 2007).

Las antocianinas son capaces de donar protones a radicales libres altamente reactivos. En las plantas, las antocianinas evitan la formación de los radicales libres que se forman durante la fotosíntesis (Sui, Zhang, Jiang, & Zhou, 2018).

Las antocianidinas son las estructuras básicas de las antocianinas. Las antocianidinas (o agliconas) consisten en un anillo aromático unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno, que también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático. Cuando las antocianidinas se encuentran en su forma de glucósido (unidas a un resto de azúcar) se las conoce como antocianinas (Castañeda-Ovando et al., 2009).

En la actualidad, se han descrito las estructuras completas de más de 700 antocianinas presentes en fuentes naturales y se han identificado provisionalmente más de 200 (Santos-Buelga & González-Paramás, 2018), de las cuales solo seis son las más comunes, la pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina. (Clifford, 2000).



<b>Antocianinas</b>	$R_1$	$R_2$
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Pelargonidina	H	H
Petunidina	OMe	OH
Peonidina	OMe	H

Figura 4 Antocianinas más comunes en la naturaleza. (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015)

La cianidina tiene un sustituyente hidroxilo y un hidrógeno, es la más común y es responsable del color magenta. La delfinidina tiene dos sustituyentes hidroxilo y es responsable del color azul. La pelargonidina tiene dos sustituyentes hidrógeno y es

responsable del color rojo. La peonidina es derivada de la cianidina y la petunidina basada en la delfinidina (Castañeda-Sánchez & Guerrero-Beltrán, 2015).

### 3.4.1 ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS

La principal desventaja de las antocianinas frente a los colorantes sintéticos se debe a la estabilidad en la obtención y manipulación de estas, pues se degradan fácilmente. Las antocianinas poseen grupos cromóforos que son bastante sensibles a los cambios de pH, temperatura, entre otros (Jefferson-Lopes et al., 2007 & Rein, 2005).

### 3.4.2 INFLUENCIA DEL PH

Las antocianinas se pueden encontrar en diferentes formas químicas dependiendo del pH de la solución.

- A pH 1, el catión flavilio (color rojo) es la especie predominante y contribuye a los colores púrpura y rojo (Fig. A).
- A valores de pH entre 2 y 4, predominan las especies de azul quinoidal (Fig. B–D).
- A valores de pH entre 5 y 6 solo se pueden observar dos especies incoloras, que son una pseudo-base carbinol (Fig. E) y una chalcona (Fig. F), respectivamente.
- A valores de pH superiores a 7, las antocianinas se degradan dependiendo de sus grupos sustituyentes (reacción de degradación).
- A valores de pH entre 4 y 6, coexisten cuatro formas estructurales de las antocianinas: el catión flavilio, la base quinoidal anhidra, la base de carbinol incolora y la chalcona de color amarillo pálido.

- El equilibrio entre las bases quinoides y el carbinol se produce a través del catión de flavilio (estructuras D, A y E).
- Cuando aumenta el pH, aumenta la cantidad de bases anhidras y en condiciones más ácidas, la especie predominante es el ion rojo flavilio.

(Castañeda-Ovando et al., 2009)

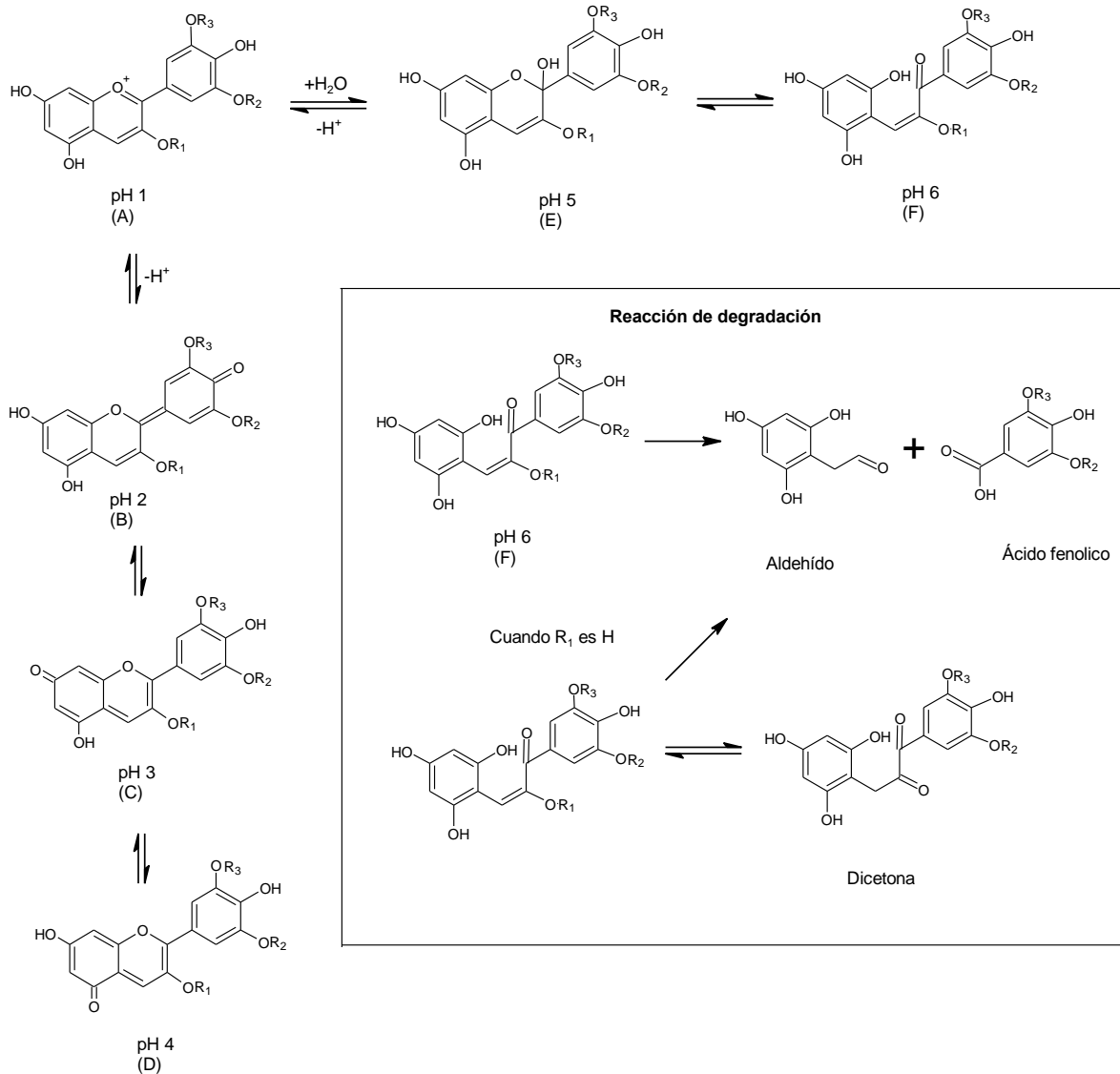


Figura 5. Influencia del pH en la estructura química de las antocianinas y su reacción de degradación.  $R_1 = H$  o sacárido,  $R_2$  y  $R_3 = H$  o metilo. (Castañeda-Ovando et al., 2009)

### 3.4.3 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

Uno de los principales factores que determinan la estabilidad de las antocianinas es la temperatura, su estabilidad se ve afectada a medida que la temperatura incrementa (Sui et al., 2018).

Cuando hay un incremento de temperatura se produce la pérdida del azúcar glicosilante en la molécula y apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas incoloras (Garzón, 2008).

### 3.4.4 INFLUENCIA DEL OXÍGENO

El oxígeno acelera la degradación de antocianinas por medio de un mecanismo oxidativo directo o mediante la acción de enzimas oxidantes, como la polifenol oxidasa (PPO) (Sui et al., 2018).

### 3.4.5 COPIGMENTACIÓN

La copigmentación se refiere a la formación de asociaciones moleculares o complejas de pigmentos, es una herramienta que permite la estabilización de antocianinas y mejora del color de los productos alimenticios (Rein, 2005).

La copigmentación es el mecanismo principal para la estabilización de antocianinas y su color en plantas.



## 3.5 SECADO DE LA MATERIA PRIMA

El secado es un método que permite la extracción total del agua contenida en un fruto, el agua siempre es eliminada en forma de vapor con aire e involucra la sustracción de cantidades de agua pequeñas en comparación con la evaporación que involucra cantidades de agua considerablemente más grandes (Geankoplis, 1998).

Existen dos tipos de deshidratación, la natural y la artificial. La deshidratación natural consiste en colocar los alimentos en recipientes amplios donde la superficie produce un rápido secado de la humedad en el alimento. Esta técnica requiere condiciones climatológicas óptimas, es decir un gran espacio al aire libre y control en elementos como el polvo, la lluvia y plagas. Mientras que la deshidratación artificial consiste en colocar los alimentos en secadores mecánicos a base de aire caliente o secadores térmicos, como lo pueden ser los hornos de gas, de microondas y liofilización que controlan las condiciones climáticas y sanitarias, por lo que se obtienen productos de buena calidad, higiénicos y libres de sustancias tóxicas (Amores Vizúete, 2011).

### 3.5.1 SECADO AL HORNO

El secado en el horno es un método rápido y sencillo, consiste en colocar la materia prima en una cámara donde se controla el flujo de aire, temperatura y humedad (Herrera & Rodríguez, 2016).

### 3.5.2 LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un proceso de deshidratación a baja presión, o alto vacío y moderada temperatura debido a que la presión de vapor del hielo es bastante pequeña. Es un método muy utilizado en muestras termosensibles, emplea temperaturas bajas

que reducen las reacciones de degradación que pueden ocurrir en el proceso de secado (Geankoplis, 1998).

La diferencia de este método de secado respecto a las otras técnicas de deshidratación radica en que en la liofilización se da la sublimación del hielo, no la evaporación del agua (Ramírez-Navas, 2007).

La liofilización, es un método de secado térmico en donde la muestra es congelada exponiéndola al aire frío y posteriormente el agua es eliminada como vapor por sublimación del hielo y se extrae en una cámara al vacío. Los alimentos, necesariamente se deben encontrar congelados durante el secado.

Como producto se obtiene un alimento seco, con la ventaja de que conserva las características del alimento original, color, aroma, sabor y textura (Terroni, 1997).

La liofilización involucra las siguientes etapas (Alzate Orrego, 2003):

- Congelación.
- Sublimación

El congelamiento es una etapa primordial para llevar a cabo un secado efectivo, se recomienda dejar congelando toda la noche la muestra a liofilizar (Terroni, 1997).

La sublimación es la etapa en la cual una sustancia pasa directamente del estado sólido al vapor, en este caso el agua contenida en la muestra se congela formándose el hielo y se elimina como vapor.

En la liofilización, lo subdividimos en dos partes principales:

- Secado primario: el hielo es sublimado.
- Secado secundario: la humedad residual se retira.

Conforme se va llevando a cabo la sublimación del hielo, el plano de sublimación va alcanzando el interior de la fruta dejando a su paso el material seco y poroso. La transferencia de masa y calor se llevan a cabo de forma simultánea al transferirse el

vapor de agua a través de la capa de muestra ya seca. El calor latente de sublimación del hielo se da por conducción a través de la corteza de material seco y es de 2838 kJ/kg (Geankoplis, 1998).

Se debe emplear el tiempo suficiente para que se lleve a cabo el secado cuidando que el producto final no se degrade y tener un contenido de humedad inferior al 5% en peso (Ramírez-Navas, 2007).

La sublimación es más eficiente a presiones bajas, el agua se extrae por un impulso originado por el gradiente de presión total (Ramírez-Navas, 2007).

Cuando se da una lenta velocidad de congelación se produce una rápida velocidad de secado, debido a que se forman cristales voluminosos y cuando se sublima el hielo quedan poros, así la difusión del vapor aumenta con la porosidad, por tanto, se da un secado más rápido.

La velocidad de secado va disminuyendo a medida que incrementa la cantidad de extracto seco, debido a que los cristales que se forman durante la congelación son más pequeños en cuanto va avanzando el secado del producto (Ramírez-Navas, 2007).

En el secado secundario, la humedad residual es absorbida por el material o adsorbida por la superficie de este (Ramírez-Navas, 2007).

Los productos liofilizados debidamente empacados, se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo ya que conservan las propiedades físicas, químicas, biológicas y organolépticas de sus estados frescos (Alzate Orrego, 2003).

*Tabla 2. Diferencias entre el Secado Convencional y la Liofilización (Ramírez-Navas, 2007)*

SECADO CONVENCIONAL	LIOFILIZACIÓN
Recomendado para obtener alimentos secos (verduras y granos)	Recomendado para la mayoría de los alimentos pero se ha limitado a aquéllos que son difícil de secar a través de otros métodos

Rango de Temperatura 37 – 93°C	Temperaturas debajo del punto congelación
Presiones atmosféricas	Presiones reducidas (27–133 Pa)
Se evapora el agua de la superficie del alimento	Se sublima el agua del frente de congelación
Las tensiones en alimentos sólidas causan daño estructural y encogimiento	Cambios estructurales o encogimiento mínimos
Rehidratación incompleta o retardada	Rehidratación completo o rápido
Partículas porosas secas tienen a menudo una densidad más alta que el alimento original	Partículas porosas secas tienen una densidad más baja que el alimento original
Olor y sabor frecuentemente anormal	Olor y sabor normalmente intensificado
Color frecuentemente más oscuro	Color normal
Valor nutritivo reducido	Nutrientes retenidos en gran porcentaje
Costos generalmente bajos	Costos generalmente altos, aproximadamente cuatro veces más que el secado convencional debido a la velocidad de secado lenta y a la utilización de vacío.

### 3.6 PROCESO DE SEPARACIÓN

La extracción es una técnica de separación de productos orgánicos, separa un componente de una mezcla por medio de un disolvente (Caldas, 2012). Los métodos de extracción pueden ser de 2 tipos:

- Extracción líquido-líquido.
- Extracción sólido-líquido.

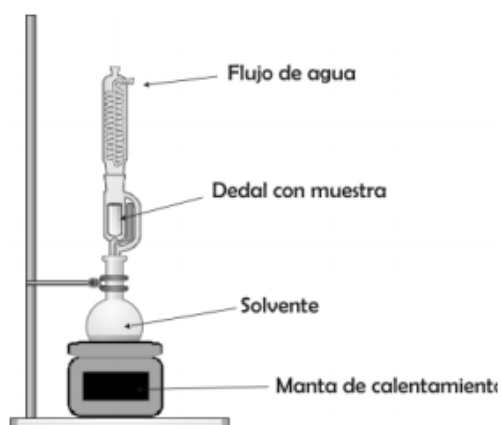
#### 3.6.1 EXTRACCIÓN SOXHLET

Los procesos de extracción que usan solventes son poco eficientes debido a la saturación del solvente al contacto con la muestra, lo que provoca usar solvente nuevo, implicando gran cantidad de solvente y tener que evaporarlo de la muestra para

recuperarlo y poder reutilizarlo. Lo que hace la extracción soxhlet es realizar un irrepitible número de extracciones con el mismo solvente sin que se sature, debido a que el solvente se evapora y condensa llegando puro al material a extraer (Núñez, 2011).

La extracción Soxhlet se lleva a cabo de acuerdo a los siguientes pasos:

- Se adiciona el solvente en un matraz de bola.
- Se pone a ebullición el solvente y se evapora hasta un condensador a reflujo.
- El condensado cae sobre el recipiente que contiene el cartucho poroso con la muestra en su interior.
- Cuando el solvente asciende lo suficiente y cubre el cartucho se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón, llamado sifoneo.
- Este último paso es repetido un sin número de veces hasta que la muestra quede agotada. El extracto se va concentrando en el matraz de bola.



*Figura 6. Extractor Soxhlet*

## 3.7 CARACTERIZACIÓN

### 3.7.1 COLORIMETRÍA

El análisis de color es muy utilizado con el fin de determinar la eficacia de algún tratamiento y se puede llevar a cabo por medio de colorímetros y medidores de croma que generan un conjunto de coordenadas que señalan el color medido en un espacio de color tridimensional (McGuire, 1992).

Estas coordenadas pueden ser interpretadas por la notación de Munsell, la cual se basa en la carta de colores, percibiendo como  $L^*$ , coeficiente de luminosidad que va del negro=0 al blanco=100, y las coordenadas  $(a^*, b^*)$  que son coordenadas que reflejan indirectamente el matiz y el croma, en el eje horizontal se encuentra  $(a^*, -a^*)$ , indicando el tono rojo-purpura para  $a^*$  y verde azulado para  $a^*$  negativo, y en el eje horizontal esta  $(b^*, -b^*)$  que va desde amarillo para  $b^*$  y azul para  $b^*$  negativa (McGuire, 1992).

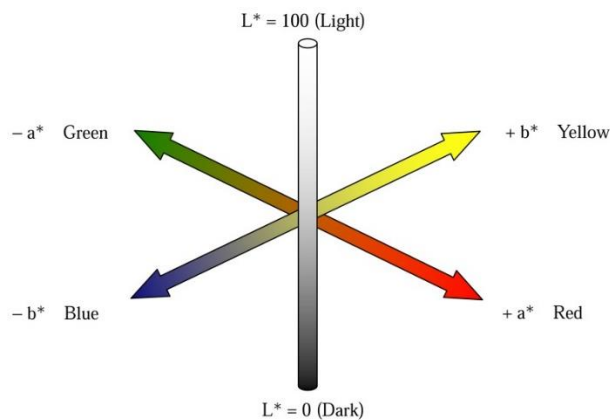


Figura 7. Diagrama representativo CIELAB.

### 3.7.2 ESPECTROFOTOMETRÍA UV

La espectrofotometría UV arroja información cuantitativa y cualitativa de las antocianinas a partir de sus características espectrales.

El método diferencial es una técnica rápida y fácil que sirve para la cuantificación de antocianinas monoméricas, mide la absorbancia en la muestra a dos valores de pH diferentes y se fundamenta en las transformaciones estructurales del cromóforo antocianina en función del pH (Giusti & Wrolstad, 2001).

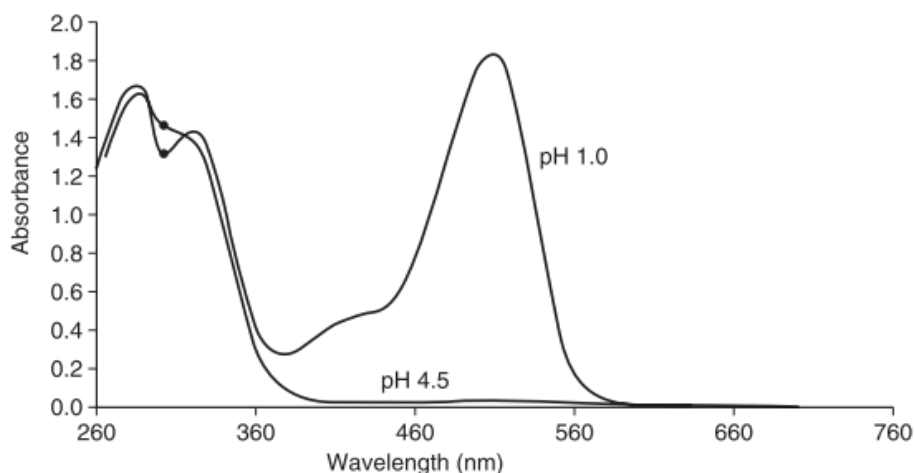


Figura 8. Características espectrales de antocianinas purificadas en buffer de pH 1.0 y pH 4.5

Este método fue usado primero por Sondheimer y Kertesz en 1948, quienes utilizaron valores de pH de 2.0 y 3.4 para los análisis de mermeladas de fresa. Posteriormente Fuleki y Francis (1968) utilizaron buffer de pH 1.0 y 4.5 para medir el contenido de antocianinas en arándanos (Giusti & Wrolstad, 2001).

Las antocianinas muestran dos bandas distintivas de absorción, en la región UV (260 a 280 nm) y la segunda en la región visible (490 a 550 nm) (Fig. 6), estos valores varían debido a las diferentes agliconas, con valores de 520 nm para la pelargonidina hasta 546 nm para la delfinidina. El espectro arroja información sobre el número y posición de sustituciones glicosídicas (Giusti & Wrolstad, 2001).

### 3.7.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC)

La cromatografía es una técnica fisicoquímica utilizada para separar dos o más compuestos de una mezcla por distribución de una fase móvil y una fase estacionaria (Neira, 2009).

La fase móvil es la que se encarga de transportar las sustancias que se van a separar de la mezcla de sustancias en nuestra muestra, la fase móvil progresa en relación con la fase estacionaria (Rivera Chávez, 2011).

La cromatografía es una técnica analítica que se emplea para separar mezclas de productos naturales (Castillo & Ramirez, 2006).

En la cromatografía se da la adsorción de la muestra aplicada en la capa en la superficie del material por medio de fuerzas electrostáticas, cuando la capa se somete a la fase móvil, por capilaridad se da una competencia de enlaces entre los sitios activos del adsorbente y la muestra con la fase móvil (Neira, 2009). La fase móvil que asciende por acción capilar en la fase estacionaria arrastra los compuestos y los separa, dejando a su paso las bandas donde se encuentran algunos compuestos (Rivera Chávez, 2011).

Los compuestos concentrados en las bandas que va dejando a su paso la fase móvil se detectan por medio de la luz UV, la cual permite detectar las sustancias que absorben la longitud de onda larga (365nm) y la de onda corta (254nm). También es recomendable rociar la placa con diferentes reactivos químicos que sirven como reveladores en presencia de algunos compuestos (Castillo & Ramirez, 2006).

*Tabla 3 Reveladores para Cromatografía en capa fina*

Metabolito secundario	Revelador	Tratamiento	Manchas características
-----------------------	-----------	-------------	-------------------------



Flavonoides	AlCl <sub>3</sub>	Irradiar con luz UV-vis a 366nm	Fluorescencia amarilla y azules a la luz UV a 366nm
	Reactivo citrobórico	Asperjar la placa, calentar a 100°C por 5min e irradiar con luz UV-vis a 366nm	Fluorescencia amarilla y azules a la luz UV a 366nm
Saponinas, terpenoides e isoprenoides	Vainillina/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Primero asperjar la cromatoplaca con solución A y después con solución B y calentar a 100°C.	Coloración azul o azul violeta, algunas pueden dar coloración amarilla.
	Liebermann-Burchard	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C.	Manchas azul-verdosas se trata de saponinas esteroídicas, si presenta manchas rosadas-purpura se trata de saponinas triterpénicas.
	p-anisaldehido/ H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Asperjar la cromatoplaca y calentar a 100°C.	
Alcaloides	Dragendorff	Asperjar la cromatoplaca y observar inmediatamente el resultado	Manchas de color marrón o anaranjado intenso.
Fenoles/ taninos	Cloruro férrico al 1% etanol.	Generalmente no requiere calor, o calentar suavemente.	Color azul negruzco para taninos pirogalotaninos o verde para taninos condensados.
Cumarinas y antroquinonas	Reactivo de Borntrager	Calentar suavemente hasta que el color aparezca.	Rojo en el visible para antroquinonas.
Glucósidos cardiotónicos	Kedde	Calentar si es necesario e inmediatamente observar al UV-366nm	Coloración rosa o azul violeta al visible.

### 3.7.4 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica que permite conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de un compuesto.

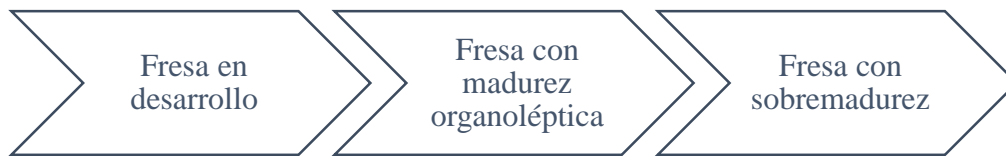
Las transiciones entre los niveles de vibración del estado fundamental de una molécula son resultado de la absorción de la luz con longitudes de onda en la zona infrarroja del espectro. Estos niveles de vibración y los espectros IR son generados por los movimientos característicos de los grupos funcionales (tensiones y deformaciones en los enlaces) (Freifelder, 1981)



## CAPITULO IV. METODOLOGÍA

Materia prima: Se adquirió la fresa fresca del municipio de Villa Guerrero, uno de los principales productores de fresa en el Estado de México.

La fresa fue selectivamente seleccionada sin picaduras, golpes o algún daño visible y con un índice de madurez de acuerdo a 3 estándares.



Las fresas utilizadas fueron las que ya habían terminado con su proceso de crecimiento, se encontraban en la madurez organoléptica y aún no empezaban con la etapa de sobremadurez.

### 4.1 SECADO DE LA FRESA

#### 4.1.1 SECADO AL HORNO

Se colocó la fresa fresca en una bandeja en un horno Hamilton Beach a 60°C durante 8 horas.

#### 4.1.2 LIOFILIZACIÓN

Se tomó la fresa fresca y previamente se congeló en un ultracongelador durante 24 horas a -60°C, asegurando la congelación completa de la materia prima.

Posteriormente se llevó a un liofilizador Labconco con una temperatura constante de -60°C durante 24 horas a una presión de vacío de 0.02 mbar.

Cada muestra destinada para las dos extracciones, se trituroó en un molino y se almaceno en recipientes herméticos para evitar su oxidación.

## 4.2 EXTRACCIÓN SOXHLET

El cartucho fue hecho con papel filtro Whatman N° 1, en donde se pesaron 10g de muestra de fresa deshidratada previamente.

Para la extracción de las antocianinas en la fresa se empleó un volumen total de 60ml de disolvente, de acuerdo a la tabla 4.

*Tabla 4 Mezclas de solventes para la extracción soxhlet*

Fresa secada al horno	Metanol puro	Metanol- Agua (50/50)	Metanol- Agua (60/40)	Metanol- Agua (40/60)	Metanol- Agua (75/25)	Metanol- Agua (25/75)
	Etanol puro	Etanol- Agua (50/50)	Etanol- Agua (60/40)	Etanol- Agua (40/60)	Etanol- Agua (75/25)	Etanol- Agua (25/75)
Fresa liofilizada	Metanol puro	Metanol- Agua (50/50)	Metanol- Agua (60/40)	Metanol- Agua (40/60)	Metanol- Agua (75/25)	Metanol- Agua (25/75)
	Etanol puro	Etanol- Agua (50/50)	Etanol- Agua (60/40)	Etanol- Agua (40/60)	Etanol- Agua (75/25)	Etanol- Agua (25/75)

Se empezó a calentar graduando la cantidad de calor para cada disolvente o mezcla de acuerdo a su punto de ebullición.

La extracción soxhlet se manejó con un total de 5 sifoneos para cada muestra, tomando en cuenta la coloración del extracto más solvente se valoró el número de sifoneos en el cual se podía obtener el máximo de antocianinas totales en el compuesto y no se encontraron diferencias significativas con un número mayor de sifoneos.

Envasado: luego de obtener cada uno de los extractos se colocaron en frascos ámbar con el fin de proteger las antocianinas.

Posteriormente se concentraron en un rotavapor Buchi R-215 a 60°C a fin de eliminar casi en su totalidad el disolvente.

## 4.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS

### 4.3.1 COLORIMETRÍA

La medición de la colorimetría se llevó a cabo con un Colorímetro que consiste en un cabezal que utiliza iluminación difusa, con geometría de observación con ángulo de 0° y con iluminante D65. Los valores generados en el equipo son las coordenadas cromáticas L\*, a\*, b\* del espacio de color CIELAB.

### 4.3.2 TITULACIÓN

Las pruebas de titulación se llevaron de acuerdo con lo reportado en la literatura (Domínguez, 1973) y (Lock Sing de Ugaz, 1997)

#### **Ensayo Shinoda**

En un tubo de ensayo se tomó aproximadamente 0.1g de muestra de extracto de fresa y se le agrego 0.1g de zinc en polvo y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado 1M.

## **Ensayo ácido-base**

### **Identificación para antocianinas con pH ácido:**

En un tubo de ensayo se tomó aproximadamente 0.1 g de muestra de extracto de fresa y se le agregaron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado 1M.

### **Identificación para antocianinas con pH alcalino:**

En un tubo de ensayo se tomó aproximadamente 0.1 g de muestra de extracto de fresa y se le agregaron 3 gotas de hidróxido de sodio 1M.

### 4.3.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC)

La cromatografía en capa delgada se llevó a cabo utilizando como fase estacionaria las placas de sílice de 7x6cm y como fase móvil una mezcla de Acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, metiletilcetona y agua (60:12:3:30:6).

La fase móvil fue agregado a una cámara cromatografía, con un reposo de 30 min para su saturación, una vez corridas se dejaron secar y se procedió a realizar el revelado utilizando una lámpara con luz ultravioleta (254 nm-366 nm), para poder visualizar las manchas sobre las placas, se revelaron con cloruro de aluminio.

El cloruro de aluminio se preparó disolviendo 2.5g de  $AlCl_3$  en 10ml de etanol y posteriormente se aforó a 25ml.

### 4.3.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV

Para la cuantificación de antocianinas, se prepararon las soluciones buffer de acuerdo a la metodología descrita por Giusti & Wrolstad, 2001

### **Preparación de la solución buffer de cloruro de potasio, 0.025M, pH=1.**

Se mezcló 1,86 g de KCl y 980 ml de agua destilada en un vaso de precipitado. Se midió el pH y ajustó a 1,0 con HCl concentrado. Se transfirió a un matraz volumétrico de 1 litro y se llenó a 1 litro con agua destilada.

### **Preparación de la solución buffer de acetato de sodio, 0.4M, pH=4.5.**

Se mezcló 54.43 g de  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y ~960 ml de agua destilada en un vaso de precipitado. Se midió el pH y ajustó a 4.5 con HCl concentrado. Se transfirió a un matraz volumétrico de 1 litro y llenó a 1 litro con agua destilada.

Las lecturas de las absorbancias se realizaron en un equipo XXXX, haciendo un barrido de la muestra, para obtener la curva característica de la pelargonidina-3-glucósido, utilizando como blanco agua destilada.

#### 4.3.5 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Se llevó acabo el análisis de los extractos de fresa por espectroscopia de infrarrojo, colocando una gota de muestra en un equipo XXXX para correr el análisis y obtener el espectro característico.



## CAPITULO V. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

## 5.1 EXTRACCIÓN SOXHLET

Para la extracción soxhlet se dejó la fresa hasta un total de 5 sifoneos para cada muestra, se tomaron los tiempos promedio para cada sifoneo y se obtuvieron los siguientes datos.

*Tabla 5. Tiempos de obtención de los extractos de fresa.*

Fresa	Metanol (min)	Etanol (min)
Disolvente puro	4	6
Mezcla Disolvente-H <sub>2</sub> O (50:50)	8	10
Mezcla Disolvente-H <sub>2</sub> O (60:40)	7	9
Mezcla Disolvente-H <sub>2</sub> O (40:60)	12	15
Mezcla Disolvente-H <sub>2</sub> O (75:25)	6	7
Mezcla Disolvente-H <sub>2</sub> O (25:75)	18	21

## 5.2 CARACTERIZACIÓN

### 5.2.1 COLORIMETRÍA

El contenido de antocianinas totales es acorde al color obtenido del extracto, se confirmó mediante una prueba de colorimetría, con las coordenadas CieLab\* (L\*a\*b\*), los resultados se muestran para la fresa liofilizada y la fresa secada al horno en la tabla 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6. Coordenadas CIELAB de los extractos de fresa liofilizada.

Fresa liofilizada								
	Metanol				Etanol			
	L	A	b	Color	L	a	b	Color
Solvente puro	63.5	28	17.6		64.3	26.8	17.6	
(75/25).	64.1	27.7	17.6		64.5	26.1	17.7	
(60/40).	64.7	25.6	17.8		65.1	22.2	17.9	
(50/50).	65.8	23.2	18.3		65.9	22.8	18.4	
(40/60).	66.4	22.0	18.7		67.2	20.3	19.0	
(25/75).	66.9	20.3	18.9		67.8	19.8	19.2	

Tabla 7 Coordenadas CIELAB de los extractos de fresa secada al horno.

Fresa Secada al Horno								
	Metanol				Etanol			
	L	a	b		L	a	b	Color
Solvente puro	64.2	27.1	17.6		64.9	25	17.9	
(75/25).	64.5	26.2	17.7		65.3	24.3	18	
(60/40).	65.1	24.7	17.9		65.6	23.4	18.2	
(50/50).	65.8	22.9	18.4		66.2	22.1	18.6	
(40/60).	66.7	20.6	18.9		67.4	20.2	19.2	
(25/75).	67.8	20	19.2		68.5	19.4	19.2	

## 5.2.2 TITULACIÓN

Aplicando los ensayos Shinoda y Ácido-base a los extractos obtenidos mediante extracción soxhlet de fresa secada en el horno y liofilizada, de acuerdo a lo reportado por (Domínguez, 1973) y (Lock Sing de Ugaz, 1997) dieron positivas en la presencia de antocianinas.

Tabla 8. Resultados de Ensayo Shinoda en los extractos de fresa.

Muestra	Método de secado	Solvente	Coloración obtenida
3	Horno	Metanol	Rojo
7	Liofilización	Metanol	Rojo

13	Horno	Etanol	Rojo
20	Liofilización	Etanol	Rojo

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de flavonoides.

*Tabla 9. Resultados de la prueba con pH alcalino de los extractos de fresa.*

Muestra	Método de secado	Solvente	Coloración obtenida
3	Horno	Metanol	Verde
7	Liofilización	Metanol	Verde
13	Horno	Etanol	Verde
20	Liofilización	Etanol	Verde

En esta prueba se obtuvieron coloraciones amarillas verdosas que de acuerdo con (Domínguez, 1973) indican la presencia de antocianinas

*Tabla 10. Resultados de la prueba con pH ácido de los extractos de fresa.*

Muestra	Método de secado	Solvente	Coloración obtenida
3	Horno	Metanol	Rojo
7	Liofilización	Metanol	Rojo
13	Horno	Etanol	Rojo
20	Liofilización	Etanol	Rojo

En esta prueba se obtuvieron coloraciones rojas que indican la presencia de antocianinas.

### 5.2.3 CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (TLC)

Los resultados de la corrida de las placas de sílice, se muestra a continuación, en donde se puede observar la presencia de flavonoides de acuerdo a los valores reportados por (Lock Sing de Ugaz, 1997).

Se determinó el Rf mediante

$$R_f = \frac{D_m}{D_f}$$

Con un valor de Df=5

Tabla 11. Rf obtenidos de la fresa secada al horno

Muestra	Dm	Rf
Metanol puro	2.7	0.54
Metanol-Agua (50/50)	2.6	0.52
Metanol-Agua (60/40)	2.6	0.52
Metanol-Agua (40/60)	2.6	0.52
Metanol-Agua (75/25)	2.6	0.52
Metanol-Agua (25/75)	2.6	0.52
Etanol puro	2.8	0.56
Etanol-Agua (50/50)	2.6	0.52
Etanol-Agua (60/40)	2.6	0.52
Etanol-Agua (40/60)	2.6	0.52
Etanol-Agua (75/25)	2.6	0.52
Etanol-Agua (25/75)	2.6	0.52

Tabla 12. Rf obtenidos de la fresa liofilizada.

Muestra	Dm	Rf
Metanol puro	2.7	0.54
Metanol-Agua (50/50)	2.6	0.52
Metanol-Agua (60/40)	2.6	0.52
Metanol-Agua (40/60)	2.6	0.52
Metanol-Agua (75/25)	2.6	0.52
Metanol-Agua (25/75)	2.6	0.52
Etanol puro	2.7	0.54
Etanol-Agua (50/50)	2.6	0.52
Etanol-Agua (60/40)	2.6	0.52
Etanol-Agua (40/60)	2.6	0.52
Etanol-Agua (75/25)	2.6	0.52
Etanol-Agua (25/75)	2.6	0.52

Debido a que no se tiene un patrón de pelargonidina, el Rf obtenido se relaciona con el reportado por (Lock Sing de Ugaz, 1997) que corresponde a las antocianinas.

Es importante mencionar que el valor del Rf varía debido a que la fase móvil cambia, para una fase móvil BAW el valor reportado de Rf es 0.44 (Lock Sing de Ugaz, 1997).

#### 5.2.4 ESPECTROFOTOMETRÍA UV

La cuantificación de antocianinas se expresa en mg de antocianina por litro, obtenidas de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{Antocianinas totales} = \frac{A * PM * FD * 100}{\epsilon * 1} [=] \frac{mg}{L}$$

En donde:

A= Absorbancia de la muestra diluida

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{pH 1.0} - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})_{pH 4.5}$$

PM= Peso molecular de la sustancia de referencia

FD= Factor de dilución

ε= Absortividad molar obtenida por Giusti & Wrolstad, 2001.

Los resultados de las absorbancias obtenidas y el contenido de antocianinas totales, de acuerdo a las diferentes concentraciones, solventes y secado de fresa, se muestran en la tabla 11 y 12, respectivamente.

Tabla 13 Absorbancias obtenidas de los extractos de fresa diluidos.

Absorbancia de los extractos de fresa secada al horno	Metanol puro	Metanol-Agua (50/50)	Metanol-Agua (60/40)	Metanol-Agua (40/60)	Metanol-Agua (75/25)	Metanol-Agua (25/75)
	0.289	0.19	0.232	0.173	0.263	0.155
	Etanol puro	Etanol-Agua (50/50)	Etanol-Agua (60/40)	Etanol-Agua (40/60)	Etanol-Agua (75/25)	Etanol-Agua (25/75)
	0.242	0.181	0.203	0.162	0.223	0.125
	Metanol puro	Metanol-Agua (50/50)	Metanol-Agua (60/40)	Metanol-Agua (40/60)	Metanol-Agua (75/25)	Metanol-Agua (25/75)
	0.302	0.201	0.253	0.179	0.291	0.172

Absorbancia de los extractos de fresa liofilizada	Etanol puro	Etanol-Agua (50/50)	Etanol-Agua (60/40)	Etanol-Agua (40/60)	Etanol-Agua (75/25)	Etanol-Agua (25/75)
	0.285	0.188	0.233	0.168	0.26	0.153

Tabla 14 Contenido de antocianinas totales en los extractos de fresa.

Antocianinas fresa secada al horno	Metanol puro	Metanol-Agua (50/50)	Metanol-Agua (60/40)	Metanol-Agua (40/60)	Metanol-Agua (75/25)	Metanol-Agua (25/75)
	120.32	79.11	96.59	72.03	109.50	64.53
	Etanol puro	Etanol-Agua (50/50)	Etanol-Agua (60/40)	Etanol-Agua (40/60)	Etanol-Agua (75/25)	Etanol-Agua (25/75)
	100.76	75.36	84.52	67.45	92.85	52.04
Antocianinas fresa liofilizada	Metanol puro	Metanol-Agua (50/50)	Metanol-Agua (60/40)	Metanol-Agua (40/60)	Metanol-Agua (75/25)	Metanol-Agua (25/75)
	125.74	83.69	105.34	74.53	121.16	71.61
	Etanol puro	Etanol-Agua (50/50)	Etanol-Agua (60/40)	Etanol-Agua (40/60)	Etanol-Agua (75/25)	Etanol-Agua (25/75)
	118.66	78.27	97.01	69.95	108.25	63.70

Se obtuvo un factor de dilución de 15 y se emplearon los valores reportados para peso molecular y absorptividad molar de acuerdo con (Giusti & Wrolstad, 2001).

### 5.2.5 ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJO

En el análisis del espectro IR (fig. 9) se muestra la presencia de antocianinas de la familia de los flavonoides y permite detectar la presencia de azúcar en la estructura al existir bandas correspondientes a grupos alquílicos.

Tabla 15 Grupos y bandas encontrados en el espectro IR.

Grupo	Banda
-OH	3600-3200

-C-H	1100
=C-H	3000
-C=H	1650-1450
C-O	>1100
Bandas de combinación	>1660

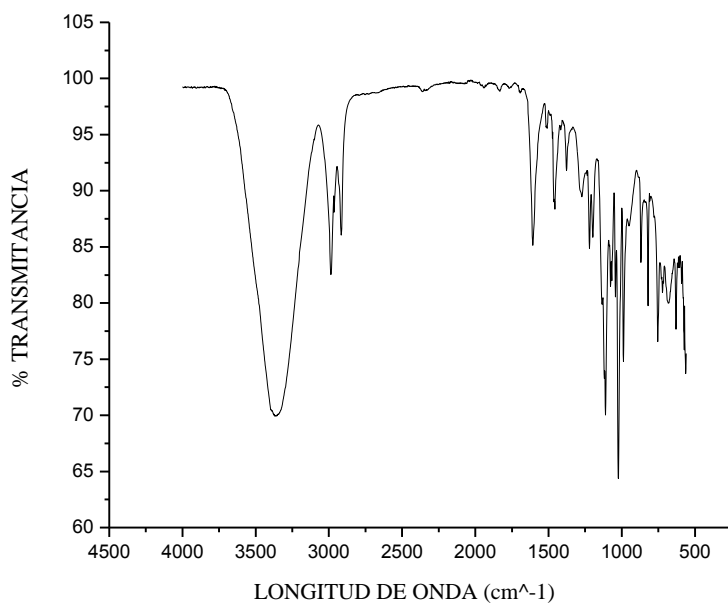


Figura 9. Espectro IR obtenido de los extractos de pelargonidina-3-glucosido.





## CAPITULO VI. CONCLUSIONES

El tipo de secado al que se sometió la fresa, de acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas de colorimetría y espectrofotometría UV-VIS, afecta considerablemente la cantidad de antocianinas totales contenidas en el extracto de fresa, la cantidad obtenida de antocianinas en los extractos de fresa liofilizada es mayor en comparación con los extractos de fresa secada al horno, debido a que en la liofilización no se produce la degradación de antocianinas que conduciría a la afectación de su contenido.

Los pigmentos se obtuvieron por medio del método de extracción soxhlet, debido a que es el más adecuado por ser un proceso rápido, que emplea bajas temperaturas y tiene un mayor contacto de la materia con el solvente, favoreciendo la extracción completa del pigmento.

El mejor solvente para la extracción de las antocianinas es el metanol puro, ya que, el uso de este solvente, en comparación con el etanol, las mezclas metanol-agua y etanol-agua, requiere temperaturas más bajas en el proceso de extracción, produciendo una menor degradación de antocianinas, obteniendo una coloración más intensa, por lo tanto, un mayor contenido de antocianinas totales.

Las pruebas de titulación dieron resultados positivos para la presencia de antocianinas y también mostraron una coloración menos intensa en los extractos de fresa secada al

horno con etanol y metanol, como solventes en el proceso de extracción y para los extractos de fresa liofilizada, con metanol como solvente en la extracción soxhlet, en comparación con los extractos obtenidos con metanol como solvente y con fresa liofilizada.

En la cromatografía de capa delgada se muestra la presencia de las antocianinas en los extractos obtenidos, de acuerdo a los valores obtenidos de Rf y sus coloraciones en presencia de la lámpara UV. En comparación con la bibliografía se obtiene una desviación de 0.08, debido a la fase móvil utilizada.

La interpretación del cromatograma obtenido en la prueba de Espectroscopia de Infrarrojo muestra la presencia de la antocianina característica de la fresa, la pelargonidina-3-glucosido, de acuerdo a las bandas encontradas por los diferentes grupos.



## REFERENCIAS

- Aberoumand, A. (2011). A Review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. *World Journal of Dairy and Food Sciences*, 6(22), 71–78. <https://doi.org/10.1377/hlthaff.23.3.233>
- Alzate Orrego, C. E. (2003). *Procesamiento De Alimentos. Universidad Nacional De Colombia Sede Manizales*.
- Amores Vizuete, D. de los A. (2011). *Evaluación Nutritiva y Nutraceutica de la Mora de Castilla (Rubus glaucus) Deshidratada por el método de Liofilización y comparación con la obtenida por Deshidratación en Microondas y Secador en bandejas. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1468/1/34T00246.pdf>
- Berlitz, H. D., & Grosh, W. (1997). *Book Reviews : Química de los alimentos*. Acirbia. Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA. <https://doi.org/10.1177/108201329800400310>
- Caldas, P. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción solido liquido*. UNIVERSIDAD DE CUENCA. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>
- Cañizares, R., Leal, R., Ramírez, O., Noyola, P., & Márquez, F. (1998). Microbial

- sources of pigments. *Revista Latinoame- Ricana de Microbiología*, , 40, 87–107. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/12387412\\_Microbial\\_sources\\_of\\_pigments](https://www.researchgate.net/publication/12387412_Microbial_sources_of_pigments)
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001>
- Castañeda-Sánchez, A., & Guerrero-Beltrán, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas. *Temas Selectos de Ingenieria de Alimentos*, 9, 25–33. Retrieved from <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf>
- Castillo, S. A., & Ramirez, I. E. (2006). *Ensayo Preliminar Para La Obtención De Colorantes Naturales a Partir De Especies Vegetales Comestibles*. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/4989/1/16100351.pdf>
- Chiu, A., & Kimball, A. B. (2003). Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *British Journal of Dermatology*, 149(4), 681–691. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05540.x>
- Clifford, M. N. (2000). Review Anthocyanins – nature , occurrence and dietary burden, 1072(January), 1063–1072.
- da Silva, F. L., Escribano-Bailón, M. T., Pérez, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. *LWT - Food Science and Technology*, 40, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.09.018>
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments:

- Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(3), 173–289. <https://doi.org/10.1080/10408690091189257>
- Domínguez, X. A. (1973). *Método de investigación fitoquímica*. Limusa. Retrieved from <https://books.google.com.mx/books?id=YwGStgAACAAJ>
- Freifelder, D. (1981). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. Reverté.
- Garzón, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2008.04.023>
- Geankoplis, C. J. (1998). *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias* (3a ed.). CECSA.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. *Handbook of Food Analytical Chemistry*, 2–2, 19–31. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
- Heinonen, I. M., Meyer, A. S., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4107–4112. <https://doi.org/10.1021/jf980181c>
- Herrera, X., & Rodríguez, K. (2016). *Evaluación del extracto de flavonoides y antocianinas contenidos en el agraz (Vaccinium meridionale swartz) obtenidos a nivel laboratorio por medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas*. FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA FACULTAD DE INGENIERÍAS PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA BOGOTÁ. Retrieved from <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/478/1/1013641316-2016-2-IQ.pdf>

- Iwashina, T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287–299. <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
- Jefferson-Lopes, T., Fonseca-Xavier, M., Novy-Quadri, M. G., & Bastos-Quadri, M. (2007). Antocianinas: Uma Breve Revisão Das Características Estruturais E Da Estabilidade. Anthocyanins: a Brief Review of Structural Characteristics and Stability. *Revista Brasileira de Agro Ciências*, 13(3), 291–297.
- Koetcha, P. M., & Madhavi, D. L. (1995). *Handbook of fruit science and technology : production, composition, storage, and processing*. M. Dekker.
- Lock Sing de Ugaz, O. (1997). *Colorantes naturales*. Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo Editorial.
- López-Luengo, M. T. (2002). Flavonoides, 21(4), 14–15.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, 17(6), 271–278.
- McGuire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27(12), 1254–1255. <https://doi.org/10.21273/hortsci.27.12.1254>
- Neira, A. M. (2009).  *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE CLOROFORMO DE LA ORQUÍDEA COMESTIBLE Prothechea michuacana. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E. Instituto Politécnico Nacional.*
- Núñez, C. E. (2011). Extracciones con Soxhlet. Retrieved from <http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>
- Popovski, B., & Popovska, M. (2016). Chemical Content of Fruits of Some



- Perspective Strawberry Varieties Cultivated on Open Field. *Jornal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 69, 1–7.
- Ramírez-Navas, J. (2007). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*, 6(January 2007), 1–39.
- Rein, M. (2005). *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*.
- Rivera Chávez, F. H. (2011). *Propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de fruto de fresa de variedades mexicanas y extranjeras*.
- Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction , Isolation , and Purification of Anthocyanins, 1–11.
- SAGARPA. (2017). *Fresa Mexicana. Planeación Agrícola Nacional (2017-2030)*. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>
- Santos-Buelga, C., & González-Paramás, A. M. (2018). Anthocyanins. *Elsevier Inc.*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814026-0.21609-0>
- Sharma, S., Joshi, V. K., & Abrol, G. (2009). An overview on strawberry [fragaria × ananassa (Weston) duchesne ex rozier] wine production technology, composition, maturation and quality evaluation. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(4), 356–365.
- Sui, X., Zhang, Y., Jiang, L., & Zhou, W. (2018). *Anthocyanins in Food*. Elsevier Inc. Elsevier. <https://doi.org/10.1080/10408397609527207>
- Terroni, E. (1997). Manual Básico de Liofilización. *Editorial Office*, 1–8. Retrieved from [https://www.academia.edu/14806425/TERRONI\\_EQUIPAMENTOS\\_LTDA\\_LIOFILIZADORES\\_TERRONI](https://www.academia.edu/14806425/TERRONI_EQUIPAMENTOS_LTDA_LIOFILIZADORES_TERRONI)
- Trueba, G. P. (2003). Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana*

*de Investigaciones Biomedicas*, 22(1), 48–57.

Wang, S. Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radical's, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677–5684. <https://doi.org/10.1021/jf000766i>

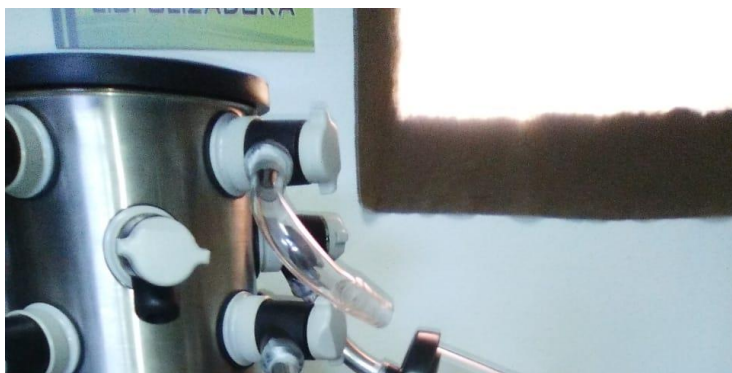
Yu, R. J., & Van Scott, E. J. (2002). Hydroxycarboxylic acids, N-acetylamino sugars, and N-acetylamino acids. *Skinmed*, 1(2), 117–122; quiz 125–126. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673337>

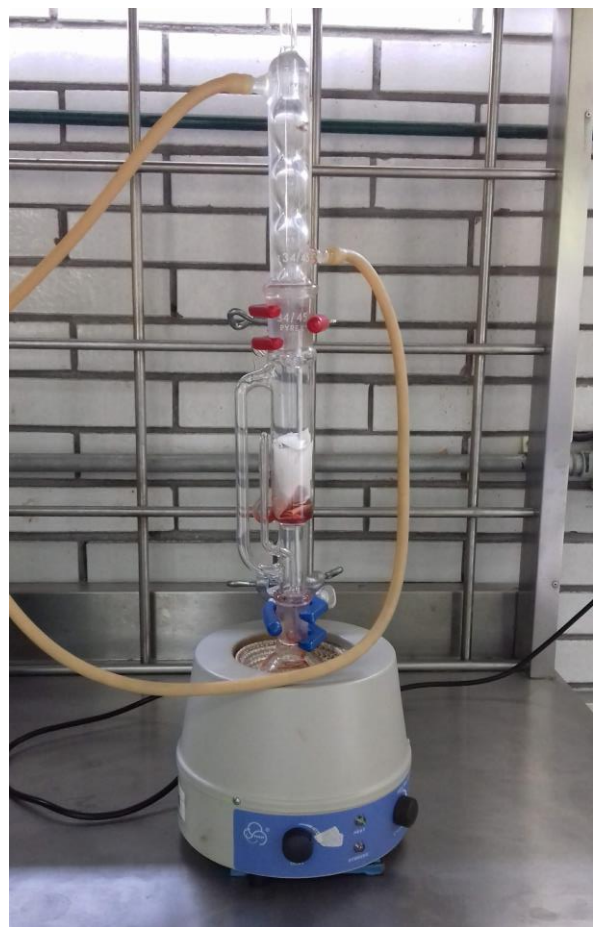


## ANEXOS



*Figura 10. Horno Hamilton Beach para llevar a cabo la deshidratación de la fresa.*





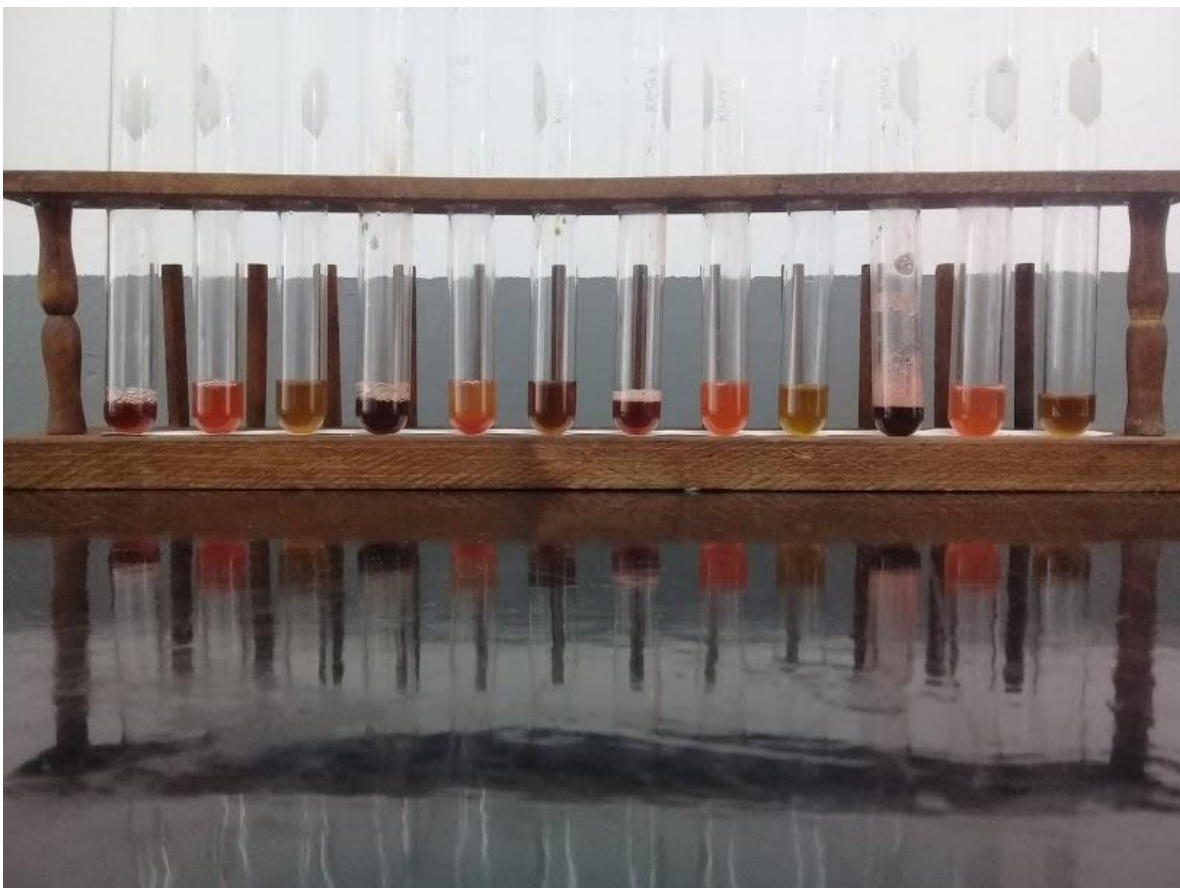
*Figura 12. Montaje del equipo Soxhlet para la extracción de las antocianinas.*



*Figura 13. Extracto de fresa obtenido después extracción Soxhlet.*



*Figura 14. Rotavapor*



*Figura 15. Ensayos de Titulación realizados en los extractos de fresa.*



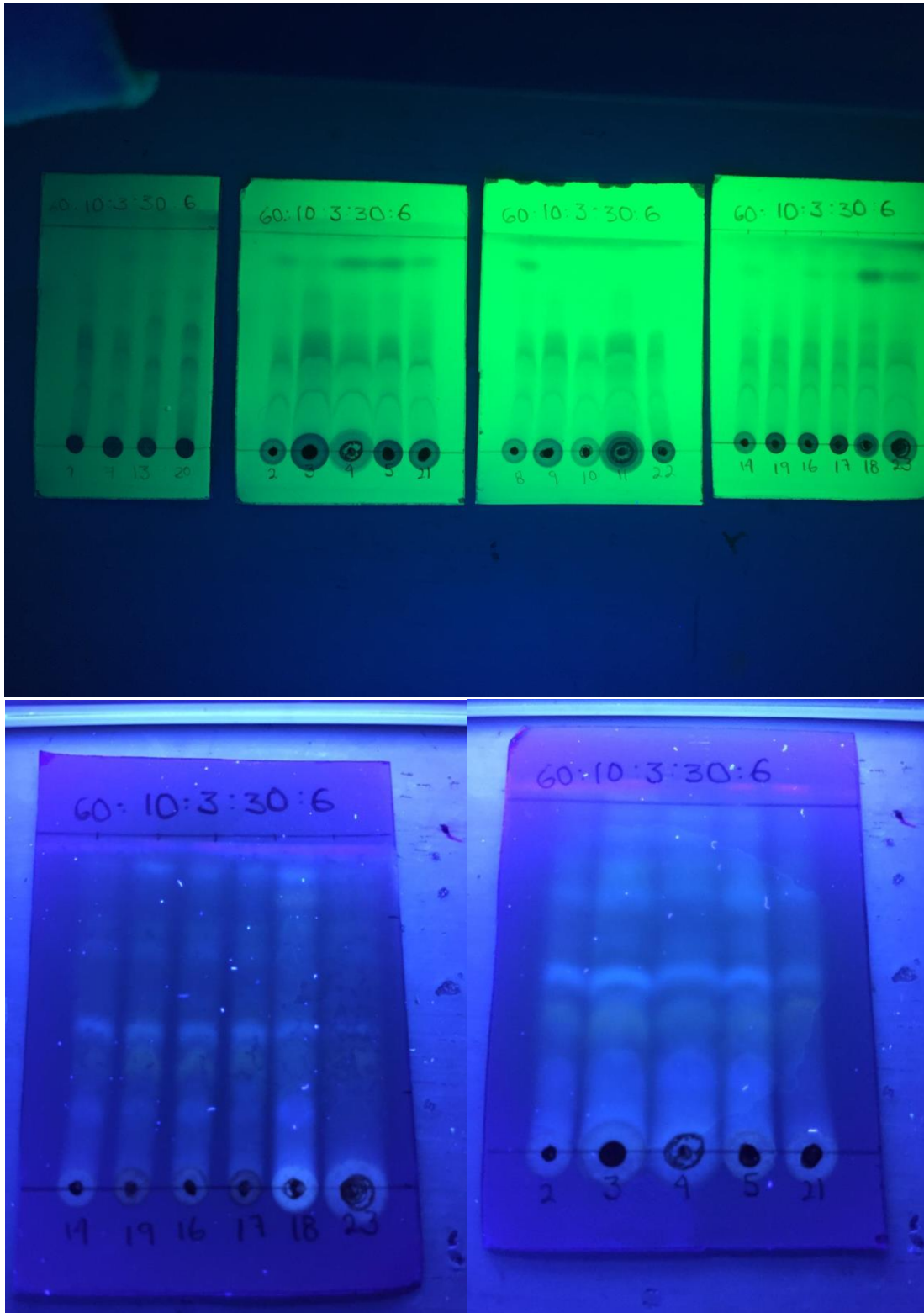


Figura 16. Espectros de Cromatografía de Capa Delgada (TLC) UV VIS.