

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS EN PÉTALOS DE *Rosa*
spp. VARIEDAD “FREEDOM”, EN TRES ETAPAS DE FLORACIÓN, UTILIZANDO
DOS SOLVENTES, DOS TIEMPOS Y DOS TEMPERATURAS DE EXTRACCIÓN**

T E S I S

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

SEGUNDO WALTER MONTOYA VIERA

ASESOR:

ING. MG. MAX EDWIN SANGAY TERRONES

CAJAMARCA – PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"
Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Cajamarca, a los tres días del mes de noviembre del año dos mil veintidós, se reunieron en el ambiente 2H - 204 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 024-2022-FCA-UNC, de fecha 15 de febrero del 2022**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la TESIS titulada: **"DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANINAS DE PÉTALOS DE Rosa spp. VARIEDAD FREEDOM, EN TRES ETAPAS DE FLORACIÓN, UTILIZANDO DOS SOLVENTES, DOS TIEMPOS Y DOS TEMPERATURAS DE EXTRACCIÓN"**, realizada por el Bachiller **SEGUNDO WALTER MONTOYA VIERA** para optar el Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**.

A las once horas y once minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciséis (16); por tanto, el Bachiller queda expedito para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**.

A las once horas y cincuenta y cuatro minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.



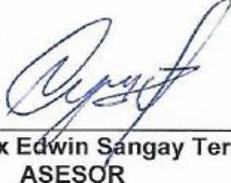
Q. F. Salomón Murrugarra Abanto
PRESIDENTE



Ing. M. Sc. José Gerardo Salhuana Granados
SECRETARIO



Ing. M. Sc. Fanny Lucila Rimarachin Chávez
VOCAL



Ing. Mtr. Max Edwin Sangay Terrones
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios, el principal motivo de mi vida que me dio la fuerza y valentía para seguir luchando ante tanta adversidad, por guiar mis pasos y haber puesto en mi camino a personas muy importantes durante mi periodo de estudio.

A mis padres Yolanda Viera Bustamante y Walter N. Montoya Sangay, por su apoyo incondicional, por su comprensión, sus consejos y por su amor. Ustedes me mantuvieron en el camino correcto para ser un hombre de bien.

A mis hermanas Lucy y Virginia, quienes me alentaron, me motivaron y me brindaron su gran amor y comprensión. Sé que se sentirán muy orgullosas de mí y yo de ellas.

AGRADECIMIENTO

Hago presente mis agradecimientos sinceros:

A Dios por haberme dado la vida hasta este día, por haberme bendecido con lograr terminar mi carrera y convertirme en el profesional que siempre soñé, gracias a Él esta es una meta cumplida,

A mi asesor Ing. Max Edwin Sangay Terrones, quien me asesoró desinteresadamente y me brindó su conocimiento, su valioso tiempo, consejos, materiales y apoyo para realizar el presente trabajo de investigación.

A los docentes de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de Cajamarca por la enseñanza y conocimientos brindados durante la preparación de mi profesión.

¡Muchas gracias!

SCJF Σε μισώ και σου εύχομαι όλα τα άσχημα πράγματα στον κόσμο.

ÍNDICE

| Contenido | Pag. |
|---|------|
| DEDICATORIA | |
| AGRADECIMIENTO | |
| INDICE DE CONTENIDOS | |
| INDICE DE TABLAS | |
| INDICE DE FIGURAS | |
| RESUMEN | |
| ABSTRACT | |
| CAPÍTULO I..... | 15 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| 1.1 Formulación del problema..... | 16 |
| 1.1.1 Problema general..... | 16 |
| 1.2 Objetivos de la investigación | 16 |
| 1.3.1 Objetivo general | 16 |
| 1.3 Hipótesis | 16 |
| CAPÍTULO II | 17 |
| REVISIÓN DE LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 Antecedentes de la investigación..... | 17 |
| 2.2 Bases teóricas | 19 |
| 2.2.1 Rosa (<i>Rosa</i> spp.)..... | 19 |

| | | |
|--------------------------------------|---|-----------|
| a. | Variedades de rosa | 21 |
| b. | Etapas de floración | 22 |
| 2.2.2 | Antocianinas | 23 |
| a. | Estructura y estabilidad de las antocianinas | 24 |
| b. | Método fisicoquímico de extracción de antocianinas | 26 |
| c. | Análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-VIS de antocianinas..... | 27 |
| d. | pH diferencial | 28 |
| CAPITULO III..... | | 30 |
| MARCO METODOLÓGICO | | 30 |
| 3.1 | Localización de la investigación..... | 30 |
| 3.2 | Materiales experimentales | 30 |
| 3.3 | Metodología..... | 32 |
| 3.3.1 | Factores y niveles..... | 32 |
| 3.3.2 | Diseño experimental | 34 |
| 3.3.3 | Croquis del experimento | 35 |
| 3.3.4 | Descripción del proceso de extracción de antocianinas..... | 37 |
| 3.3.5 | Tratamiento y análisis de datos..... | 41 |
| 3.3.6 | Presentación de la información..... | 41 |
| CAPÍTULO IV | | 42 |
| RESULTADOS Y DISCUSIONES..... | | 42 |
| 4.1 | Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas | 42 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4.2 | Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón intermedio con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas | 46 |
| 4.3 | Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón desarrollado con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas | 49 |
| 4.4 | Uso de colorantes naturales de origen vegetal en la industria alimentaria | 51 |
| | Determinación de la mejor combinación entre los factores (solvente, tiempo y temperatura) en estudio en tres etapas de floración | 51 |
| | CAPÍTULO V | 53 |
| | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 53 |
| 5.1 | Conclusiones | 53 |
| 5.2 | Recomendaciones | 54 |
| | CAPÍTULO VI | 55 |
| | LITERATURA CITADA | 55 |
| | CAPÍTULO VII | 60 |
| | ANEXOS | 60 |
| | ANEXO A: FOTOGRAFÍAS DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS PÉTALOS DE ROSAS VARIEDAD “FREEDOM” | 60 |
| | ANEXO B: GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS | 66 |
| | ANEXO C: CONTENIDO DE ANTOCIANINAS | 67 |
| | ANEXO D: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN | 68 |

| | |
|---|-----------|
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Solvente | 68 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura | 69 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Tiempo | 70 |
| ANEXO D: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN INTERMEDIO | 71 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Solvente | 71 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura | 72 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Tiempo | 73 |
| ANEXO E: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN DESARROLLADO | 74 |
| ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura | 74 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Antocianinas en pétalos de cultivares japoneses | 22 |
| Tabla 2. <i>Antocianidinas comunes</i> | 24 |
| Tabla 3. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón..... | 33 |
| Tabla 4. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón Intermedio | 33 |
| Tabla 5. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón Desarrollado | 34 |
| Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón | 43 |
| Tabla 7. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” | 44 |
| Tabla 8. Prueba Tukey para el factor temperatura en el contenido de antocianinas en pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” | 45 |
| Tabla 9. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón intermedio | 46 |
| Tabla 10. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” | 47 |
| Tabla 11. Prueba Tukey para el factor temperatura en el contenido de antocianinas en pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” | 48 |
| Tabla 12. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón desarrollado | 50 |
| Tabla 13. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” | 51 |

| | |
|---|----|
| Tabla 14. Resumen del análisis comparativo Tukey al 95% de confianza de los factores con significación estadística y mejores tratamientos..... | 52 |
| Tabla 15. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón..... | 67 |
| Tabla 16. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón intermedio | 67 |
| Tabla 17. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón desarrollado..... | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Rosa variedad “Freedom” | 21 |
| Figura 2. Estructura antocianina | 23 |
| Figura 3. Estructura de antocianidinas | 25 |
| Figura 4. Croquis de la investigación para determinar el contenido de antocianinas de los pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” en tres etapas de floración con dos solventes, en dos tiempos y dos temperaturas de extracción | 35 |
| Figura 5. Diagrama de flujo de la extracción de antocianinas de los pétalos de <i>Rosa</i> spp. variedad “Freedom” adaptado de (Vásquez 2011)..... | 36 |
| Figura 6. Rosa en etapa de floración botón 1 | 61 |
| Figura 7. Rosa en etapa de floración botón 2 | 60 |
| Figura 8. Rosa en etapa de floración interm. 1 | 60 |
| Figura 9. Rosa en etapa de floración interm. 2..... | 60 |
| Figura 10. Rosa en etapa de floración desarroll. 1..... | 60 |
| Figura 11. Rosa en etapa de floración desarroll. 2..... | 60 |
| Figura 12. Pétalos de rosas | 60 |
| Figura 13. Peso de pétalos de rosas | 61 |
| Figura 14. Calibración pH-metro..... | 63 |
| Figura 15. Medición de pH de las sustancias buffer..... | 61 |
| Figura 16. Preparación de solv. etanol al 40 % | 63 |
| Figura 17. Preparación de solv. agua destilada | 61 |
| Figura 18. Pétalos de rosas trituradas | 63 |
| Figura 19. Verter solvente para extracción | 62 |
| Figura 20. Molienda 1 | 64 |
| Figura 21. Molienda 2 | 62 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. Verter contenido a m. kitazato | 64 |
| Figura 23. Extracción de antocianinas | 62 |
| Figura 24. Papel Watman N° 45 en embudo buschner | 64 |
| Figura 25. Filtración de extracto | 63 |
| Figura 26. Filtración culminada..... | 65 |
| Figura 27. Papel filtro mas muestra | 63 |
| Figura 28. Rotulado de tubos de ensayo | 65 |
| Figura 29. Extractos de antocianina | 63 |
| Figura 30. Medición de sustancias buffer | 65 |
| Figura 31. Sustancias buffer | 64 |
| Figura 32. Extractos acidificados 1..... | 66 |
| Figura 33. Extractos acidificados 2..... | 64 |
| Figura 34. 0.5mL extrac. en sustancia buffer | 66 |
| Figura 35. Vertido de extrac. en sustancia buffer | 64 |
| Figura 36. Reposo de muestras por 20 min | 66 |
| Figura 37. Muestras listas para lectura en espectrofotómetro | 65 |
| Figura 38. Agua destilada para calibración blanco | 67 |
| Figura 39. Muestra en cubeta | 65 |
| Figura 40. Muestras en espectrofotómetro | 67 |
| Figura 41. Lecturas de absorbancia a diferentes L. O..... | 65 |

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la mejor combinación entre dos solventes (etanol al 40 % acidificado y agua destilada acidificado), dos temperaturas (70 °C y 50 °C) y dos tiempos (30 y 15 minutos) en la extracción de antocianinas presentes en los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en tres etapas de floración (botón, botón intermedio y botón desarrollado). Se empleó el diseño completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 2x2x2. Los tratamientos fueron ocho: T1 (etanol 40% + 70 °C + 30 min.); T2 (etanol 40% + 70 °C + 15 min.); T3 (etanol 40% + 50 °C + 30 min.); T4 (etanol 40% + 50 °C + 15 min.); T5 (agua destilada + 70 °C + 30 min.); T6 (agua destilada + 70 °C + 15 min.); T7 (agua destilada + 50 °C + 30 min.); y T8 (agua destilada + 50 °C + 15 min.). Se utilizó el método de pH diferencial y los resultados de contenido de antocianina por cada etapa de floración fueron evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y se realizó la prueba de comparaciones múltiples de medias Tukey, ($p < 0,05$). Los mejores resultados en contenido de antocianina en la etapa de floración botón fue de 488.04 mg/L (T1), 547.12 mg/ L en el botón intermedio (T1) y 599.19 mg/L el botón desarrollado (T5). En las etapas de floración botón y botón intermedio se encontró significancia estadística en los factores solvente, temperatura y tiempo, el mejor tratamiento fue etanol al 40 % a 70 °C por 30 minutos; en la etapa de floración botón desarrollado se encontró significancia estadística en el factor solvente, el mejor tratamiento fue agua destilada a 70 °C por 30 minutos, respecto a la variable contenido de antocianina (mg/L).

Palabras clave: Antocianinas, rosa, “Freedom”, espectrofotometría.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the best combination between two solvents (40% acidified ethanol and acidified distilled water), two temperatures (70 °C and 50 °C) and two times (30 and 15 minutes) in the extraction of anthocyanins present in the petals of *Rose* spp. "Freedom" variety in three stages of flowering (button, intermediate button and developed button). A completely randomized design (DCA) with a 2x2x2 factorial arrangement was used. The treatments were eight: T1 (ethanol 40% + 70 °C + 30 min.); T2 (ethanol 40% + 70 °C + 15 min.); T3 (ethanol 40% + 50 °C + 30 min.); T4 (ethanol 40% + 50 °C + 15 min.); T5 (distilled water + 70 °C + 30 min.); T6 (distilled water + 70 °C + 15 min.); T7 (distilled water + 50 °C + 30 min.); and T8 (distilled water + 50 °C + 15 min.). The differential pH method was obtained and the results of anthocyanin content for each flowering stage were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and the Tukey multiple comparisons test was performed ($p < 0.05$). The best results in anthocyanin content in the flowering stage were 488.04 mg/L (T1), 547.12 mg/L in the intermediate button (T1) and 599.19 mg/L in the developed button (T5). . In the button and intermediate button flowering stages, statistical significance was found in the solvent, temperature and time factors, the best treatment was 40 % ethanol at 70 °C for 30 minutes; In the flowering stage, statistical significance was found in the solvent factor, the best treatment was distilled water at 70 °C for 30 minutes, with respect to the anthocyanin content variable (mg/L).

Keywords: Anthocyanins, rose, "Freedom", spectrophotometry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son compuestos fenólicos que se pueden presentar en pétalos de rosas, numerosas plantas, frutos y hojas, la particularidad de estos compuestos es que se pueden utilizar como colorantes naturales porque no son tóxicos, pueden utilizarse en productos alimenticios y son aptos para el consumo de seres humanos, y es que hay una creciente demanda social que desea evitar el consumo de pigmentos artificiales que no representan seguridad y los cuales perjudican la salud, además, se ha estudiado la importancia y acción de las antocianinas dentro de la medicina en la reducción de enfermedades coronarias, resfriados, infecciones y alergias debido a su efecto antioxidante potente (Dermatol 2013), y dentro de la industria alimentaria para devolver o intensificar el color de los productos con la gama de colores que va desde el rojo hasta el azul (Heredia 1998).

Hay diferentes procedimientos para la extracción de antocianinas, comúnmente realizada por una maceración de un soluto empleando soluciones solventes como el metanol, acetona, etanol o mezclas, y se controlan factores externos como la temperatura, tiempo, pH y luz que pudiesen alterar su estabilidad y que influyen en dicho proceso (Vankar *et al.* 2010).

En la región Cajamarca no existen investigaciones relacionados al estudio del contenido de antocianinas en pétalos de rosas, desperdiciando una alternativa de aprovechamiento de colorantes naturales y su posibilidad de incorporarla como ingrediente en productos alimentarios y bebidas, pese a que Cajamarca cuenta con más de 50 hectáreas dedicadas al cultivo de rosas y pretenden competir con otras regiones del Perú para convertirse en los mayores productores de rosas en variedad y calidad, las variedades más producidas y solicitadas son la variedad “Freedom”, “Rosado Bebé”, “Blush” y la “Topaz” (Mondragón 2017).

Por estas consideraciones, el propósito de la investigación utilizo el método experimental para establecer la mejor combinación entre dos solventes (etanol al 40 % y agua destilada), dos temperaturas (70 °C y 50 °C) y dos tiempos (30 y 15 minutos), para determinar el efecto en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en tres etapas de floración (botón, botón intermedio, botón desarrollado).

1.1 Formulación del problema

1.1.1 Problema general

¿Cuál es la mejor combinación entre dos solventes, dos temperaturas y dos tiempos para la extracción de antocianinas de pétalos de *Rosa* spp. variedad Freedom en tres etapas de floración?

1.2 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar cuál es la mejor combinación entre dos solventes (etanol al 40 % ac. y agua destilada ac.), dos temperaturas (70 °C y 50 °C) y dos tiempos (30 y 15 minutos) para la extracción de antocianinas de pétalos de *Rosa* spp. variedad Freedom en tres etapas de floración (botón, botón intermedio y botón desarrollado).

1.3 Hipótesis

– Hipótesis general

La mejor combinación de factores es a temperatura de 70 °C, tiempo de 30 minutos y con solvente etanol al 40% presentando una mayor extracción del contenido de antocianinas en las tres etapas de floración botón, botón intermedio y botón desarrollado, en comparación al solvente agua destilada en las mismas condiciones.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de la investigación

Vankar *et al.* (2010) identificaron y extrajeron antocianinas presentes en rosas, para ello utilizaron tres métodos de extracción donde se diferenciaban por el tipo de solvente, ácido clorhídrico, ácido tartátrico y ácido cítrico, para el primero se usó ácido clorhídrico al 0.1 % (v / v) en metanol a temperatura ambiente, por 2-3 horas, en oscuridad y los sólidos restantes se lavaron con el mismo solvente hasta llegar a una solución clara, luego se secaron en un evaporador rotatorio a 30 °C y procedieron a la identificación de las antocianinas a través de espectrofotometría y como resultado obtuvieron las longitudes de onda máximo en rosas de tonos oscuros como el rojo y azul a 517nm y 592nm en rosas de color verde, valores comprendidos entre un pH de 2 y 9 y resistentes a temperaturas no superiores a 90 °C.

Vanini *et al.* (2009) estudiaron los procesos de extracción de las antocianinas, el pigmento fue extraído utilizando metanol y etanol a 60, 70 y 80 % en agua acidificada con ácido clorhídrico al 0,1% a 30 °C; como resultados después de la extracción de antocianinas totales de la cáscara de uva determinaron el contenido total de antocianinas con 106.9 mg/100g de muestra con el uso de etanol como solvente y de 27.5 mg/100 g de muestra utilizando metanol.

Acosta *et al.* (2014) realizaron experimentos de extracción de diferentes pigmentos vegetales, tales como: clorofilas a y b, xantofilas, carotenoides y pigmentos antociánicos e identificaron con el uso de un cromatograma. Para la determinación de antocianinas se usó la siguiente metodología, colocaron flores en una capsula petri con ácido clorhídrico concentrado y como resultado obtuvieron la identificación de delphinidina y peonidina empleando NH₃OH al 25%; con ácido clorhídrico concentrado se identificó la antocianina y su efecto betacrómico que consiste en que al cambiar la acidez, es decir el pH, se pasa del rojo-anaranjado en condiciones

ácidas (pelargonidina), al rojo intenso-violeta en condiciones neutras (cianidina), y al rojo púrpura-azul en condiciones alcalinas (delfinidina).

Dyankova *et al.* (2016) utilizaron el método de pH diferencial con 8 materiales vegetales, el análisis cromatográfico de los extractos mostró rayas intensivas de rosa, rojo y violeta correspondientes al contenido de antocianina, el análisis de los datos experimentales mostró que el rendimiento de las sustancias pigmentarias depende de algunos factores: el tipo de planta, el tratamiento preliminar de la planta y el solvente que se utiliza. Para el análisis cualitativo e identificación de antocianinas utilizaron el método de Kruger *et al.* (2013) donde a la muestra de 1 ml de cada extracto se agregaron 9 ml de ácido clorhídrico al 0,5% en etanol al 96%, luego se agitó por 5 minutos y centrifugó al mismo tiempo a 3000 rpm y se almacenó en oscuridad. Los volúmenes de muestra oscilaron entre 40 y 60 μ l; como resultado obtuvieron que el chokeberry incluía un gran número de antocianinas y la combinación de estos componentes fueron la razón del color rojo oscuro / violeta del extracto con (2 195.9 cyd eq mg / l), seguido de mora (1 466.2 cyd eq mg / l) y una variedad de las uvas (1 199.3 cyd eq mg / l) y concluyeron que los materiales frescos o congelados y en la pulpa son los más adecuados para la extracción de pigmentos de antocianina.

Sánchez (2019) investigó el contenido de antocianinas en las flores de jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L.), determinó la concentración de antocianinas en sus flores, utilizando la metodología básica, de corte transversal y experimental, colocó 30gr de las flores de jamaica a secar al sol durante una semana por 30 minutos a una temperatura de 75 °C y se los combinó con 200ml de solvente etanol al 30 % y se los reservó en envases color ámbar para evitar su deterioro, lo filtró y empleó el procedimiento del pH diferencial para determinar su contenido con cloruro de potasio 0.025 M y Acetato de sodio 0.4 M (Buffers) y tuvo como resultados 348.2 +- 96.7 mg de antocianinas por cada 100gr de flores de jamaica y concluyó que tiene un alto contenido de antocianinas y por ende, un alto poder antioxidante.

Camavilca (2015) Identificó antocianinas y carotenoides provenientes de flores de mastuerzo (*Lepidium Sativum*), para ello, utilizó el método experimental que constaba de trocear las flores y secarlos a 10° C durante 5 días, luego lo pulverizó y procedió a macerarlo con 20mL de solvente compuesto de metanol, ácido acético y agua en un volumen de 45:15:25, otro con metanol y ácido acético (70:30), metanol y ácido acético (50:50) y metanol en agua, en envases de color ámbar por 24 horas, finalmente lo filtró, concentró e hizo la cuantificación por espectrofotometría con soluciones tampones, como resultado obtuvo 442,21 ug de pelargonidina 3 O-glucósido por 100 gramos de materia seca, entonces concluyó que hay mejores resultados utilizando metanol al 70% y agua al 30% en flores rojas.

Castañeda (2018) investigó el contenido de antocianinas en camote, utilizó para ello la metodología experimental-aplicada de tipo descriptivo, pesó 500 gr de cada muestra y se le añadió un solvente (etanol, ácido acético y agua desionizada) con un volumen 10:1.9, con un tiempo de extracción de 1 hora a temperatura ambiente, luego lo filtró y aplicando el método de pH diferencial con sustancias buffer, obtuvo como resultado que el promedio mayor fue para el camote proveniente de Virú con 19.485 mg/L de antocianina superior al de que provenía de Chiclayo, con 18.918 mg/L.

A nivel local no se ha encontrado trabajos relacionados con la extracción de antocianinas en rosas o en alguna flor de tonalidad roja.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Rosa (*Rosa spp.*)

La palabra rosa proviene del latín “Rodjá” que significa flor del rosal, son un tipo de arbusto que crecen con diferentes colores desde las más conocidas de tonalidades rojas y amarillas como rosadas y violetas, la familia de estas plantas son Rosaceae, provienen de diferentes partes

del mundo y hasta el día de hoy se conocen aproximadamente 70 rosas silvestres y más de 200 variedades en cada continente que son domesticadas, cruzadas y mejoradas; es el cultivo más importante del sector ornamental y producto principal del mercado de la floricultura (Arzate 2014).

Tienen tallos ramosos, con espinas, hojas de diferentes formas con números impares de foliolos elípticos. Las flores son terminares, individuales o en racimo, con cáliz redondo. Los botones o corolas están compuestas por varios pétalos redondos o acorazonados, con estambres y pistilos. Los frutos que poseen se llaman escaramujos, es carnosa y contiene semillas elipsoidales y vellosas (Vera 2015).

Es un arbusto espinoso de origen en el hemisferio norte, perteneciente a la familia de las rosáceas que proviene del latín ‘rosa’ que significa la flor del rosal, además, del antiguo griego proviene la acepción de ‘rhódon’ o efluvio oloroso, de largo periodo de floración, resistencia a plagas y cultivado por sus variedades de color, flores dulces, perfumadas, apariencia bella y delicada; hay más de 100 especies y hectáreas de cultivo alrededor del mundo hoy en día. Hay clasificaciones de rosas respecto a su variedad, la más conocida es la que se divide en híbridos, floribundas, trepadoras, rosas en miniatura y rosas de especies. Los híbridos de té, son el tipo de rosas más populares actualmente, con grandes y olorosas flores y en su mayoría destinadas al corte con tallos largos y fuertes (Avdić 2016).

Valero (2018) clasificó a las rosas en tres grandes grupos y a su vez está compuesta por diferentes variedades:

- Rosas antiguas: Proviene de países específicos, datan del año 1867 y que hasta ahora no han sufrido ninguna modificación; resisten climas muy agresivos y no requiere mucha podación.

- Rosas silvestres: Conocidas como salvajes, son aquellas que donde los humanos no han intervenido en su crecimiento y desarrollo.
- Rosas modernas: Son conocidas por que son la nueva generación de rosales como resultado de la selección de partes de rosas antiguas:

Rosa grandiflora: Son un tipo de rosas que florecen de forma abundante.

Rosa floribunda: Su floración se da en forma de racimos, tienen flores más pequeñas, pero son más brillantes y florecen muchas veces durante una temporada.

Rosa híbrida de té: Son las más conocidas, son grandes y bellas y se encuentran en muchas tonalidades de colores.

a. Variedades de rosa

Características botánicas de la variedad de rosa (Figura 1) usada en este proyecto de investigación:

- FREEDOM

TAN97544 ®

Color: Rojo brillante

Largo de Tallos (cm): 50 – 100

Productividad (tallos/m²/año): 110

Vida Florero (días): 14 – 16

Tamaño de botón (cm): 5 – 7

Fuente: Rosen Tantau (2008).



Figura 1. Rosa variedad “Freedom”

b. Etapas de floración

La *Rosa* spp. de la familia de híbridos de té florecen generalmente dos veces al año, son sensibles al frío y requieren un cuidado especial para el invierno; Atani *et al.* (2013) caracterizaron a los ciclos de formación del botón de las rosas, el primer ciclo es el apogeo del botón abonado orgánicamente, la segunda etapa puede medir alrededor de 5 cm de largo utilizando abono con alto contenido de nitrógeno y otro con 10-10-10 de nitrógeno, fósforo y potasio, respectivamente, en el tercer ciclo aparecen los capullos, el abono con más fósforo que nitrógeno, en la cuarta etapa explotan las flores, se potencia con abono de fósforo y un suplemento de quelato de hierro y finalmente, la floración como tal.

En la Tabla 1 se muestra los principales cultivos de rosas de Asia, en el cual hay valores de pigmentos como la pelargonidina, cianidina y perlagonidina expresados en porcentaje y datos del su contenido en mg /100 mg obtenidos de pétalos secos, además de la escala de color Cielab.

Tabla 1. Antocianinas en pétalos de cultivares japoneses

| Cvs | Source ^a | RHSCC ^b | CIELAB coordinates ^c | | | | I ^d | Pn ^e | | Cy ^e | | Pg ^e | | aglycone ^e | | | glycoside ^e | | TA ^f | CI ^g |
|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------------------|------|-------|------|----------------|-----------------|----|-----------------|----|-----------------|----|-----------------------|----|----|------------------------|----|-----------------|-----------------|
| | | | L* | a* | b* | C* | | 3G5G | 3G | 3G5G | 3G | 3G5G | 3G | Pn | Cy | Pg | 3G5G | 3G | | |
| Pn, Cy (20 cvs) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Red flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Dong Fang Jin | H | 64A | 54.3 | 42.0 | -8.7 | 42.9 | -11.7 | 89 | + | 11 | + | - | - | 89 | 11 | - | 100 | + | 1.51 | 11.6 |
| Hong Xing | H | 70A | 49.0 | 46.2 | -18.9 | 49.9 | -22.2 | 95 | + | 5 | + | - | - | 95 | 5 | - | 100 | + | 2.32 | 6.02 |
| Luo Yang Hong | L | 72B | 35.6 | 61.0 | -7.8 | 61.5 | -7.3 | 66 | 6 | 26 | 2 | - | - | 72 | 26 | - | 92 | 6 | 3.46 | 1.12 |
| Pink flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cui Mu | H | 64B | 36.9 | 58.4 | -10.1 | 59.3 | -9.8 | 54 | 6 | 32 | 8 | - | - | 60 | 40 | - | 86 | 14 | 19.4 | 0.12 |
| Zi Lan Kui | H | 68A | 63.9 | 29.2 | -13.9 | 32.3 | -25.5 | 87 | 4 | 6 | 3 | - | - | 91 | 9 | - | 93 | 7 | 7.12 | 1.32 |
| Ying Hua Fen (deep) | H | 73C | 62.7 | 35.4 | -14.0 | 38.1 | -21.6 | 91 | - | 9 | - | - | - | 91 | 9 | - | 100 | - | 0.61 | 24.3 |
| Fen Mian Tao Hua | L | 84B | 51.8 | 57.7 | -17.5 | 60.3 | -16.9 | 84 | - | 16 | - | - | - | 84 | 16 | - | 100 | - | 0.98 | 7.22 |
| Purple flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Hong Xia Ying Ri | H | 61A | 40.3 | 52.6 | -12.8 | 54.1 | -13.7 | 57 | 6 | 26 | 11 | - | - | 63 | 37 | - | 83 | 17 | 19.9 | 0.32 |
| Chong Lou Dian Cui | H | 63B | 63.7 | 36.2 | -8.7 | 37.2 | -13.5 | 90 | 1 | 9 | + | - | - | 91 | 9 | - | 99 | 1 | 1.31 | 14.4 |
| Hua Hu Die | L | 68D | 58.9 | 45.4 | -8.1 | 48.1 | -10.1 | 84 | - | 16 | - | - | - | 84 | 16 | - | 100 | - | 0.52 | 19.8 |
| Ceng Lin Jin Ran | H | 70A | 43.8 | 46.2 | -10.8 | 47.4 | -13.2 | 65 | 2 | 32 | 1 | - | - | 67 | 33 | - | 97 | 3 | 4.51 | 2.96 |
| Wu Zhou Hong | H | 70B | 48.0 | 46.6 | -16.1 | 49.3 | -19.1 | 70 | 3 | 26 | 1 | - | - | 73 | 27 | - | 96 | 4 | 2.88 | 5.72 |
| Hong Hui | H | 70C | 57.0 | 41.4 | -10.7 | 42.8 | -14.5 | 89 | - | 11 | - | - | - | 89 | 11 | - | 100 | - | 0.78 | 18.3 |
| Zi Feng Chao Yang | H | 71B | 40.4 | 47.2 | -9.8 | 48.2 | -11.7 | 55 | 5 | 37 | 3 | - | - | 60 | 40 | - | 92 | 8 | 3.01 | 4.36 |
| Zi Luo Shi Guan | L | 71B | 34.8 | 61.2 | -3.2 | 61.3 | -3.0 | 56 | 9 | 25 | 10 | - | - | 65 | 35 | - | 81 | 19 | 4.30 | 1.38 |
| Jia Ge Jin Zi | H | 72B | 59.8 | 27.1 | -19.5 | 33.4 | -35.7 | 92 | + | 8 | - | - | - | 92 | 8 | - | 100 | + | 1.30 | 11.3 |
| Xie Yuan Hong | L | 72B | 46.0 | 48.4 | -12.4 | 50.0 | -14.4 | 62 | 1 | 37 | + | - | - | 63 | 37 | - | 99 | 1 | 2.96 | 3.88 |
| Zi Yan Fei Shuang | H | 78C | 63.7 | 27.0 | -13.9 | 30.4 | -27.2 | 93 | + | 7 | - | - | - | 93 | 7 | - | 100 | + | 0.93 | 16.4 |
| White flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Bai Yu | H | Wt | 90.7 | -6.6 | 8.3 | 10.7 | 129.3 | 92 | - | 8 | - | - | - | 92 | 8 | - | 100 | - | 0.19 | 92.0 |
| Yao Huang | H | Ly | 89.9 | -5.5 | 9.4 | 10.9 | 120.3 | 87 | - | 13 | - | - | - | 87 | 13 | - | 100 | - | 0.30 | 80.7 |

| Pn, Cy>Pg (29 cvs) | | Group C (3G≤5%, 14 cvs) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|---|-------------------------|------|------|-------|------|-------|----|---|----|---|---|---|----|----|---|-----|---|------|------|--|
| Red flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Zi Er Qiao(purple-red) | H | 64A | 39.2 | 53.3 | 22.0 | 57.7 | 22.4 | 86 | 3 | 10 | 1 | + | - | 89 | 11 | + | 96 | 4 | 3.72 | 5.00 | |
| Jin Pao Hong | H | 70B | 39.1 | 51.9 | -13.7 | 53.7 | -14.8 | 87 | 4 | 9 | + | + | - | 91 | 9 | + | 96 | 4 | 3.71 | 3.58 | |
| Hong Yan | H | 78A | 51.1 | 47.1 | -16.5 | 49.9 | -19.3 | 91 | + | 7 | + | 2 | - | 91 | 7 | 2 | 100 | + | 11.8 | 0.33 | |
| Pink flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Chui Tou Lan | H | 75B | 79.2 | 13.2 | -5.6 | 14.3 | -23.0 | 95 | + | 3 | - | 2 | - | 95 | 3 | 2 | 100 | + | 2.53 | 4.21 | |
| Purple flowered | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Shou An Hong | H | 61A | 34.1 | 47.5 | -14.8 | 49.8 | -17.3 | 85 | 4 | 10 | 1 | + | - | 89 | 11 | + | 95 | 5 | 6.59 | 2.24 | |
| Yao Chi Chun | L | 65C | 73.4 | 23.2 | -11.2 | 25.8 | -25.8 | 93 | - | 5 | - | - | - | 93 | 5 | 2 | 100 | - | 0.34 | 10.0 | |

- Cultivos de B, Beijing; H, Heze and L, Luoyang.
- Ly. Luz amarilla; Gn. verde and Wt. color blanco; Royal Horticultural Society Colour Chart.
- L*. lightness; a* and b*. chromatic components and C*. chromas (brightness)
- h. hue angle (*, degree)
- Pn. Peonodina; Cy. Cianidina; Pg. Pelargonidin; 3G5G, 3, 5-di-O-glucosido and 3G, 3-O-glucosido. Datos expresos en porcentaje (%).
- Total de antocianinas (mg/100 mg of dry petal [mg % dry petal]).
- Copigmentacion index = total flavones y flavonoides (mg %)/TA (mg %).

Fuente: Wang (2001).

2.2.2 Antocianinas

La antocianina proviene del griego anthos (flor) y kyanos (azul oscuro). Estos pigmentos son responsables de una gama de colores que va desde el rojo, azul, violeta, y se encuentra en numerosas frutas y flores y vegetales, después de la clorofila, es un pigmento de gran importancia visible al ojo humano (Martínez 2015).

Las antocianinas son pigmentos que están dentro de los compuestos denominados flavonoides, estos se encuentran en mayor cantidad en frutas más que en hortalizas y verduras, además, son solubles en agua. La estructura de las antocianinas se compone de dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 C (Garzón 2008), como se aprecia en la Figura 2.

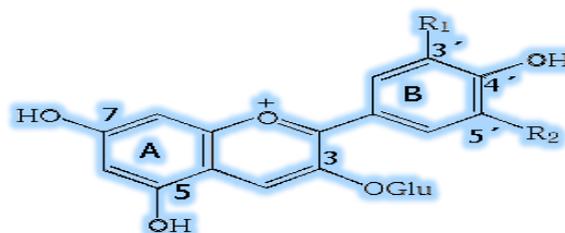


Figura 2. Estructura de la antocianina

Se pueden presentar en numerosas plantas, frutas, frutos y hojas, su contenido varía de acuerdo a su fisiología, condiciones físicos-químicas, variedad, estado vegetativo, etc., cuyo color varía desde el rosado, rojo, y en otros casos se presentan tonalidad azul o violeta (Aranceta 2006), tienen efecto antioxidante, son inodoras, sin sabor e influyen en parte en el sabor (He 2010).

Las antocianinas tienden a afectarse cuando factores intervienen en su estructura por ser estas muy reactivas y sensibles a la degradación, entre ellas está la temperatura, oxígeno, pH y enzimas dentro de los más importantes que de no ser controlados oportunamente, intervienen en el color y su estabilidad (Prior 2006).

a. Estructura y estabilidad de las antocianinas

Zhao *et al.* (2017) mencionan que las antocianinas químicamente son derivados glicosilados polihidroxilados o polimetálicos de 2-fenilbenzopirilio. Generalmente tienen pesos moleculares entre 400 a 1200 de tamaño mediano, sumados a esto dos anillos de bencilo (A y B).

Las antocianinas presentan un esqueleto -C6 -C3 -C6 y tienen gran potencial de absorción en la región visible del espectro; hay seis antocianidinas comunes, la más probable de ver es la cianidina que le confiere el color magenta, también se encuentra la pelargonidina que tiene una tonalidad rojiza-anaranjada y finalmente la delphinidina que varía entre el violeta y el azul, además si hay más grupos hidroxilo entonces, el color va a ser más azulada, mientras que el enrojecimiento se incrementa si hay existen más grupos metoxilo presentes (Heredia 1998).

Tabla 2. Antocianidinas comunes

| Antocianidinas (Aglicona) | Antocianinas | Sustitución | | Color observado en el espectro visible λ_{max} |
|------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|--|
| | | R ₁ | R ₂ | |
| Pelargonidina | Pelargonidina-3-O-glucósido | H | H | Naranja (494 nm) |
| Cianidina | Cianidina-3-O-glucósido | OH | H | Naranja-Rojo (504 nm) |
| Delfinidina | Delfinidina-3-O-glucósido | OH | OH | Azul-Rojo (508 nm) |
| Peonidina | Peonidina-3-O-glucósido | OCH ₃ | H | Naranja-Rojo (506 nm) |
| Petunidina | Petunidina-3-O-glucósido | OCH ₃ | OH | Azul-Rojo (508 nm) |
| Malvidina | Malvidina-3-O-glucósido | OCH ₃ | OCH ₃ | Azul Rojo (510 nm) |

Fuente: Heredia (1998).

Según Pereira (2009) el número de estructuras sigue en aumento ya que provienen de alrededor de 30 diferentes antocianidinas, la mayoría está basada en en cianidina (31 %), delphinidina (22 %) o pelargonidina (18 %), como el 3 metil-éteres: peonidina, proveniente de estas, las otras antocianidinas comunes son la peonidina, malvidina y petunidin, que en su estructura tienen grupos metoxi, en su anillo B y representa el 21 % de antocianinas aisladas. Una nueva antocianidina metilada, 7-O-metilcianidina, cinco nuevas desoxantocianidinas y un nuevo tipo de antocianidina llamada piroantocianidina también se han informado. Todas estas se diferencian por el número de unidades y posición de los azúcares enlazados ocurriendo así cadenas laterales de oligosacáridos, como se aprecia en la Figura 3 (Pella 2004).

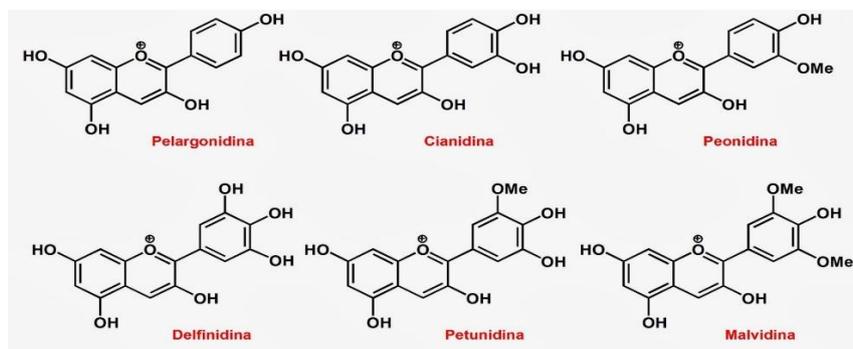


Figura 3. Estructura de antocianidinas

Respecto a la estabilidad que presentan las antocianinas está sujeta a factores que se introducen como los mecanismos de degradación que origina una extracción, purificación y uso eficaz como colorante en la industria alimentaria. Los factores que intervienen en la estabilidad de las antocianinas son el pH, temperatura, oxígeno y las interrelaciones de los compuestos de los alimentos como el ácido ascórbico, iones metálicos, azúcares y copigmentos (Lock 1997).

Lock (1997) señala que las antocianidinas son menos estables que las antocianinas, y menos solubles en agua; a mayor grado de hidroxilación decrece generalmente la estabilidad de la antocianina, mientras que un incremento en el grado de metoxilación o del grado de glicosilación, tiene el efecto opuesto; la naturaleza del azúcar (galactosa) influye en la

estabilidad; la presencia de por lo menos dos grupos de acilo estabiliza a la antocianina probablemente por la presencia de sistema aromático en el grupo acilo; en presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina-3-glicosidadas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para las antocianidina-3.5-diglicosidadas lo es a pH 4,0-5,0; por ello, para retener el color es preferible que el oxígeno sea removido del pigmento a través de calentamiento con mecanismo de vacío; las antocianinas son generalmente inestables cuando se exponen a la luz UV o a luz visible, siendo algunas más afectadas que otras; las antocianinas son más estables en medio ácido que en básicos o neutros ya que el ión flavilio se forma y da la coloración rojiza, este compuesto en pH básicos o neutros puede ser susceptible a ataques nucleofílicos por el agua dando lugar a una pseudobase carbinol seguido de una chalcona, normalmente a pH 4.5.

b. Método fisicoquímico de extracción de antocianinas

Las antocianinas son compuestos polares usualmente extraídas por maceración con soluciones acuosas de metanol, etanol o acetona acidificada débilmente, conteniendo una pequeña parte de ácido (15 %, HCL 1M) para que se pueda hacer el proceso satisfactoriamente y tenga el catión flavilio la estabilidad requerido aunque el ácido puede causar hidrólisis parcial de las fracciones acil en antocianinas aciladas; el metanol es el solvente más eficaz porque no forma mezclas azeotrópicas con agua y tiene bajo punto de ebullición pero en el caso de alimentos y ensayos clínicos se emplea el etanol puesto que su toxicidad es menor (Vázquez 2014).

Lixiviación

Es una operación de transferencia de masa que se basa en la extracción solido-líquido de pigmentos, donde se separan las sustancias que son solubles de las insolubles con la ayuda de agua o solventes para separar la mezcla o disolución, usualmente se aplica triturando materiales vegetales para facilitar la separación del pigmento y las partículas por densidad (Marín *et al.* 2012).

Según Herrera (2017) se plantea factores y condiciones para el método de extracción:

- Solvente: La solución de etanol con ácido clorhídrico al ser un solvente de polaridades indistintas causan cambios en las bandas de absorción, en el cual la cianidina tiene más rango de absorción en 520nm.
- Temperatura: Este factor es importante puesto que se ven mejores resultados cuando se extraen a temperaturas alrededor de los 25 °C y no mayor de 70 °C ya que presentaría una degradación del pigmento.
- Concentración de antocianinas: El extracto puro se concentra por evaporación del solvente a una temperatura baja, alrededor de 35 °C y en condiciones de vacío.

c. Análisis cuantitativo por espectrofotometría UV-VIS de antocianinas

– Espectrofotometría

Método de análisis empleado para determinar la absorción de luz de una sustancia e identificar la concentración. Se pasa a través de una sustancia una luz monocromática, con una determinada longitud de onda, sobre un medio homogéneo, sin residuos, una parte de esa luz es absorbida por la sustancia mientras que el resto es transmitida. La intensidad del rayo de luz es atenuada desde P_0 a P , siendo P_0 la intensidad de la luz incidente y P la intensidad del rayo de luz transmitido (Martínez 2015).

– Absorbancia

La absorbancia tiene función lineal de la concentración y tiene la capacidad de absorber la radiación y se utiliza para hacer mediciones cuantitativas. La longitud de absorción y la fuerza de absorbancia dependen del ambiente molecular en donde esté el cromóforo. Se expresa matemáticamente con el logaritmo negativo de la transmitancia (Arenas *et al.* 2004).

d. pH diferencial

Es un método que se basa en la reacción del oxonio coloreada a pH 1.0 y la forma hemiacetal incolora a pH 4.5, esta transformación estructural reversible permite de manera segura y rápida, medir el total de antocianinas monoméricas (Martínez 2015).

La cuantificación de las antocianinas se puede realizar con este tipo de métodos, según Martínez (2011) es un método espectrofotométrico que se basa en el cambio estructural del pigmento por el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Las diluciones se realizan con extracto metanólico con solución buffer pH 4.5 de acetato de sodio, 0.4 M y solución buffer pH 1.0 de cloruro de potasio, 0.025 M y se procede a leer la absorbancia de cada muestra a la longitud de onda máxima absorbancia ($\lambda_{\max}=515$ nm) y a 700 nm, después de aproximadamente 40 minutos de reacción (Puertas 2013).

– pH

Respecto al pH, en la revisión bibliográfica de Lock *et al.* (1997) mencionaron que la estabilidad de la antocianina es influenciada por la acidez y en presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina-3-glicosidadas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para las antocianidina-3.5-diglicosidadas lo es a pH 4,0-5,0. Esto ocurre ya que la acidez cumple la función protectora, en pH inferiores a 2 el pigmento se encuentra más estable o de ion oxonio o catión flavilio de color rojo intenso y cuando se varía a un valor más alto, se pierde protones y adición de agua en la posición 2 dando lugar a sustancias hemiacetal y chalconas, bastante inestables e incoloras, por otra parte Jenshi *et al.* (2011) en concordancia con lo antes mencionado, expresaron que las sales de flavilio son estables en condiciones muy ácidas, éstas pierden los protones a pH altos y se convierten en bases quinoidales que son inestables, uniéndose al agua y forman compuestos incoloros llamados cromenol.

En la extracción del pigmento, el $\text{pH} < 3$ aumenta la actividad antioxidante porque interviene en los enlaces glucosídicos positivamente. Los cambios fisiológicos de las rosas y otras formas vegetativas llevan consigo variaciones en el pH , por lo tanto, cambios en el color de su tejido vegetal, incluyen la formación de la sal de flavilio, la de la base anhidra y la base del carbinol, entre un pH de 2 a 4, la principal vía de degradación térmica es la hidrólisis de la molécula de azúcar (García *et al.* 2004).

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Localización de la investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Control de Calidad de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias (2H – 207) de la Universidad Nacional de Cajamarca en la ciudad, provincia y distrito de Cajamarca, cuyas características geográficas son: altitud de 2700 msnm, latitud de 7° 10' 5" y longitud de 78° 30' W, con temperatura media anual de 13.14 °C, humedad relativa de 73 % y precipitación promedio anual de 628 mm/año.

3.2 Materiales experimentales

a. Material biológico

Las rosas variedad “Freedom” representan la población, materia prima proveniente del centro poblado de Huambocancha alta del departamento de Cajamarca, tomando 5 rosas en las mejores condiciones visuales tanto en el color, tamaño, forma y madurez, en la segunda (apertura inicial), cuarta (etapa de media apertura) y quinta etapa de floración (etapa de apertura completa), denominadas para esta tesis como botón, botón intermedio y botón desarrollado como se puede observar en el anexo A.

b. Equipos e instrumentos

- Balanza analítica
- Potenciómetro
- Bomba de vacío
- Cocina eléctrica
- Espectrofotómetro

- Laptop

c. Reactivos

- HCL concentrado
- KCl 0.025M
- CH₃-COONa 0.4M
- Alcohol absoluto anhidro
- Agua destilada

d. Otros materiales experimentales

- Matraz
- Vaso precipitado
- Matraz kitazato
- Tubo plástico
- Tampón de jebe
- Soporte universal
- Embudo buschner
- Papel Whatman n° 45
- Tubos de ensayo
- Rejilla para tubos de ensayo
- Plumón
- Cinta masquin
- Bomba pipeteadora
- Termómetro digital
- Papel aluminio
- Mortero
- Beaker

3.3 Metodología

La presente investigación se realizó entre los meses de enero y marzo de 2022, para ello se utilizó pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” del centro poblado Huambocancha Alta del departamento de Cajamarca, en tres etapas de floración (botón, botón intermedio y botón desarrollado) clasificadas por Atani (2013).

3.3.1 Factores y niveles

La investigación tiene variables independientes (factores con sus respectivos niveles) que implica que no variarán o no se ven afectadas durante la experimentación puesto que ya están definidas previas a la extracción de las antocianinas y la variable independiente (respuesta) es el resultado de la acción de los factores para la determinación de antocianinas.

Variables de estudio

– **Independientes:**

- Solvente
- Temperatura
- Tiempo

– **Dependiente:**

- Contenido de antocianina (mg/L).

Factores y niveles: Los tratamientos con sus respectivos factores y niveles se detallan en la en la Tabla 3, 4 y 5.

A. Tipo de Solvente: Etanol al 40 % y agua destilada

B. Temperatura: 70 y 50 °C.

C. Tiempo: 30 y 15 minutos.

Tabla 3. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón

| Factor | Nivel | Tratamiento | Descripción | Código |
|----------------|--------------------|-------------|--|--------|
| A: Solvente | a1: Etanol al 40 % | a1b1c1 | Botón; etanol al 40 %; 70 °C; 30 minutos | T1 |
| | a2: Agua destilada | a1b1c2 | Botón; etanol al 40 %; 70 °C; 15 minutos | T2 |
| B: Temperatura | b1: 70 °C | a1b2c1 | Botón; etanol al 40 %; 50 °C; 30 minutos | T3 |
| | b2: 50 °C | a1b2c2 | Botón; etanol al 40 %; 50 °C; 15 minutos | T4 |
| C: Tiempo | c1: 30 minutos | a2b1c1 | Botón; agua destilada; 70 °C; 30 minutos | T5 |
| | | a2b1c2 | Botón; agua destilada; 70 °C; 15 minutos | T6 |
| | c2: 15 minutos | a2b2c1 | Botón; agua destilada; 50 °C; 30 minutos | T7 |
| | | a2b2c2 | Botón; agua destilada; 50 °C; 15 minutos | T8 |

Tabla 4. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón Intermedio

| Factor | Nivel | Tratamiento | Descripción | Código |
|----------------|--------------------|-------------|---|--------|
| A: Solvente | a1: Etanol al 40 % | a1b1c1 | Botón I.; etanol al 40 %; 70 °C; 30 minutos | T1 |
| | a2: Agua destilada | a1b1c2 | Botón I.; etanol al 40 %; 70 °C; 15 minutos | T2 |
| B: Temperatura | b1: 70 °C | a1b2c1 | Botón I.; etanol al 40 %; 50 °C; 30 minutos | T3 |
| | b2: 50 °C | a1b2c2 | Botón I.; etanol al 40 %; 50 °C; 15 minutos | T4 |
| C: Tiempo | c1: 30 minutos | a2b1c1 | Botón I.; agua destilada; 70 °C; 30 minutos | T5 |
| | | a2b1c2 | Botón I.; agua destilada; 70 °C; 15 minutos | T6 |
| | c2: 15 minutos | a2b2c1 | Botón I.; agua destilada; 50 °C; 30 minutos | T7 |
| | | a2b2c2 | Botón I.; agua destilada; 50 °C; 15 minutos | T8 |

Tabla 5. Factores, niveles y tratamientos para la extracción de antocianinas de pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración Botón Desarrollado

| Factor | Nivel | Tratamiento | Descripción | Código |
|----------------|--------------------|-------------|---|--------|
| A: Solvente | a1: Etanol al 40 % | a1b1c1 | Botón D.; etanol al 40 %; 70 °C; 30 minutos | T1 |
| | a2: Agua destilada | a1b1c2 | Botón D.; etanol al 40 %; 70 °C; 15 minutos | T2 |
| B: Temperatura | b1: 70 °C | a1b2c1 | Botón D.; etanol al 40 %; 50 °C; 30 minutos | T3 |
| | b2: 50 °C | a1b2c2 | Botón D.; etanol al 40 %; 50 °C; 15 minutos | T4 |
| C: Tiempo | c1: 30 minutos | a2b1c1 | Botón D.; agua destilada; 70 °C; 30 minutos | T5 |
| | | a2b1c2 | Botón D.; agua destilada; 70 °C; 15 minutos | T6 |
| | c2: 15 minutos | a2b2c1 | Botón D.; agua destilada; 50 °C; 30 minutos | T7 |
| | | a2b2c2 | Botón D.; agua destilada; 50 °C; 15 minutos | T8 |

3.3.2 Diseño experimental

La investigación fue conducida bajo el Diseño Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial de 2x2x2, correspondiente a la combinación de factores de solvente (etanol 40 % ac. y agua destilada ac.), temperatura (70 °C y 50 °C) y tiempo de extracción (30 y 15 minutos), dando como resultado un total de 8 unidades experimentales por cada etapa de floración (botón, botón intermedio y botón desarrollado).

3.3.3 Croquis del experimento

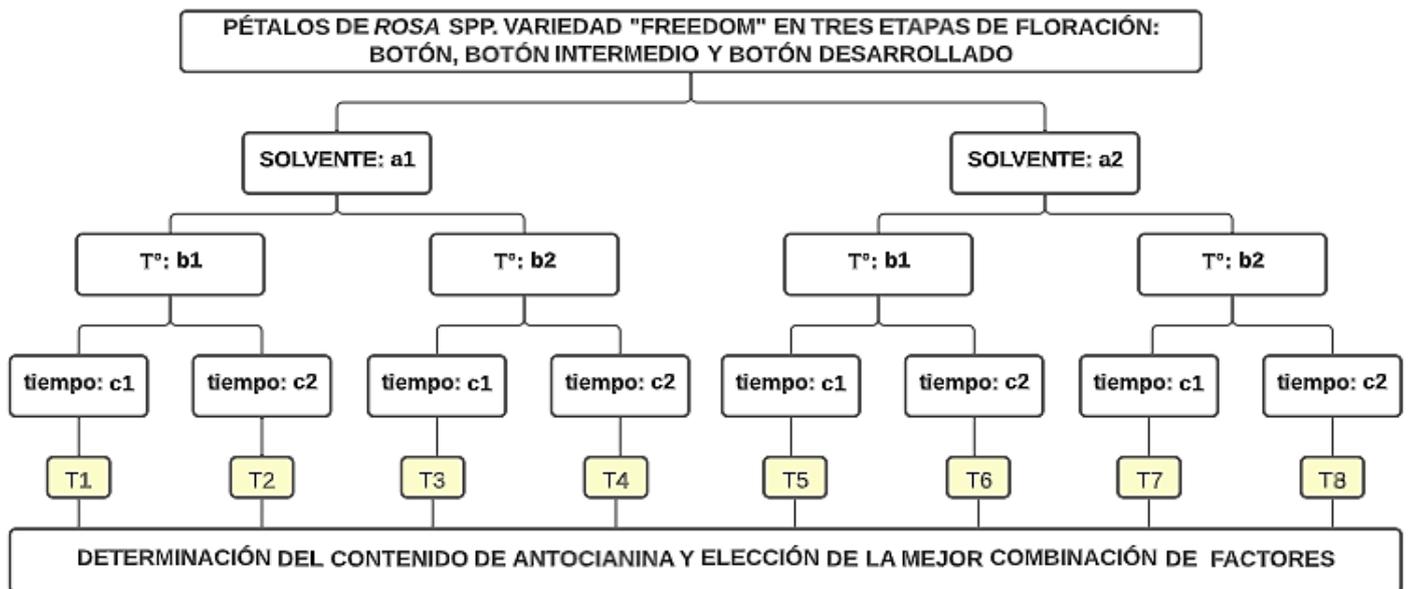


Figura 4. Croquis de la investigación para determinar el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en tres etapas de floración con dos solventes, en dos tiempos y dos temperaturas de extracción

Donde:

- Solvente: etanol al 40% ac. (a1) y agua destilada ac. (a2)
- Temperatura: 70 °C (b1) y 50 °C (b2)
- Tiempo: 30 minutos (c1) y 15 minutos (c2)
- T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 y T8: Tratamientos

Diagrama de flujo para la extracción de antocianinas de pétalos *Rosa* spp. variedad “Freedom”

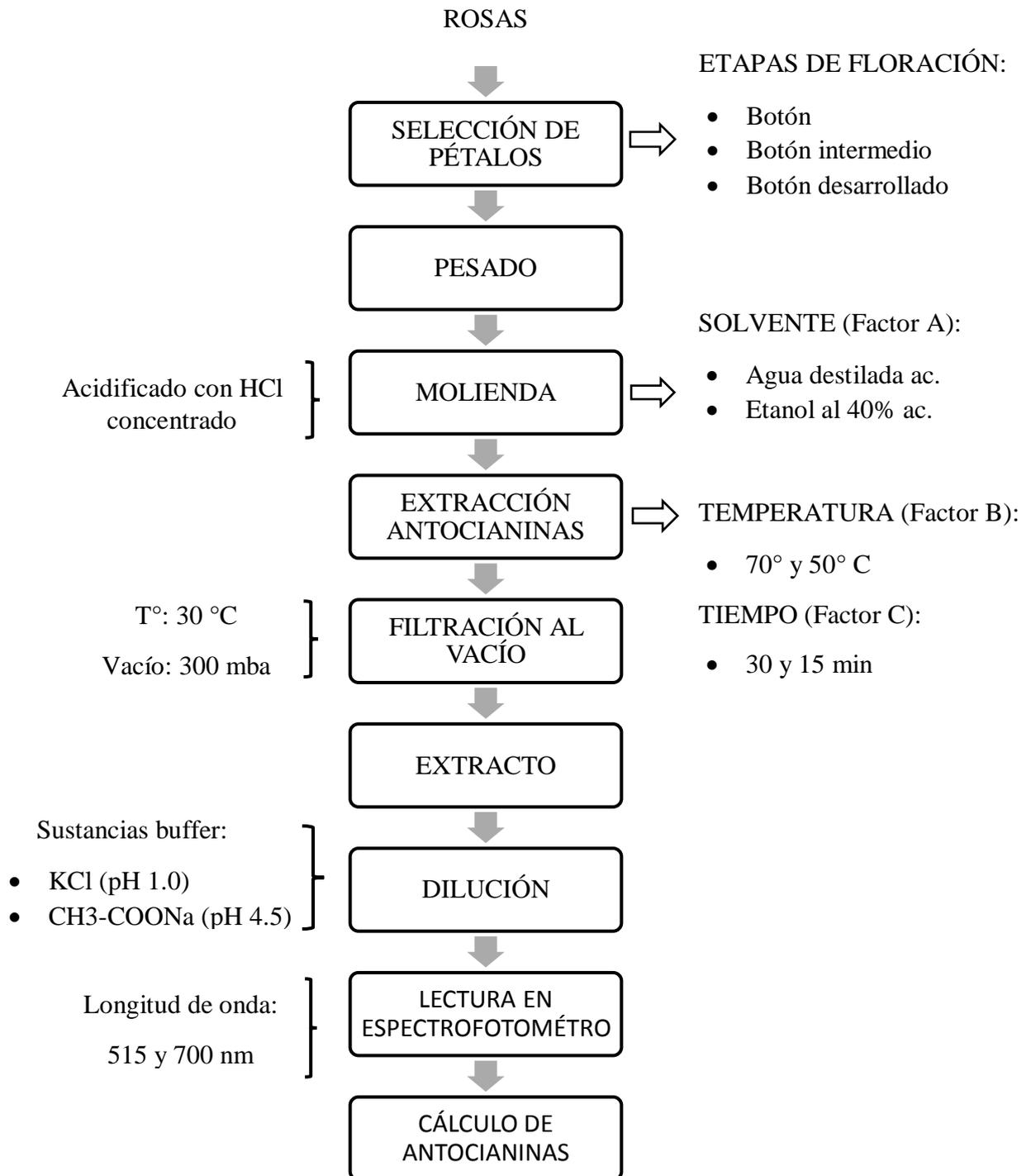


Figura 5. Diagrama de flujo de la extracción de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” adaptado de (Vásquez 2011).

3.3.4 Descripción del proceso de extracción de antocianinas

Se realizaron pasos para la extracción de antocianinas en el laboratorio de control de calidad de la escuela académico profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias que se detallan a continuación:

a. Recepción de rosas

Las rosas variedad “Freedom” se obtuvieron del vivero ubicado en el centro poblado de Huambocancha alta del departamento de Cajamarca, teniendo en cuenta sus características visuales referidas al color de sus pétalos y etapas de floración: botón, botón intermedio y botón desarrollado.

b. Selección

Operación manual con la finalidad de eliminar aquellas rosas que se encuentren con apariencia no adecuada con partes ennegrecidas o poco desarrolladas según su etapa de floración.

c. Pesado

Se calibró la balanza y se pesó 5gr de pétalos de rosas.

d. Molienda

Se molió 5gr de pétalos de rosas con 100mL de cada solvente (Factor A): etanol al 40 % (a1) y agua destilada (a2), ambos acidificados utilizando un mortero.

e. Extracción de antocianinas

El molido obtenido se colocó en un matraz kitazato tapado con un tampón de jebe con un termómetro incrustado, el matraz se conectó a una bomba de vacío provisto de una válvula a 300 mba, se graduó la temperatura de extracción (Factor B): 70 °C (b1) y 50 °C (b2) y se controló el tiempo (Factor C) con un cronómetro: 30 minutos (c1) y 15 minutos (c2) (Vásquez 2014).

f. Filtración al vacío

Se filtró utilizando un matraz kitazato con un corcho de jebe donde se incrustó un embudo buschner, se colocó papel filtro Whatman n° 45 al embudo y se filtró el extracto a una temperatura de 30 °C con el equipo de vacío a 300 mba.

g. Extracto

Se evaluó la cantidad extraída y se colocó en tubos de ensayos rotulados, de acuerdo al tratamiento utilizado.

h. Evaluación de resultados

Se evaluó la coloración que presentó y se hizo una lectura en espectrofotómetro utilizando el método de pH diferencial, a una longitud de onda de 515 y 700 nm.

– Método pH diferencial

El método pH diferencial, es un método ampliamente utilizado por los investigadores en cuanto al contenido de antocianinas monoméricas y determinar su contenido total dentro del rango 20-3000 mg/L, la base de cálculo es la alteración estructural de las antocianinas entre pH 1.0 y 4.5 con dos soluciones tampones (KCl y CH₃-COONa), al someter a estas condiciones sufren una transformación reversible de su estructura química de las antocianinas, de modo que el catión flavilio se forma a pH 1 y su forma incolora hemiacetal a pH 4.5, la coloración máxima se presenta a una longitud de onda de 520 nm y la mínima a 700 nm (Granato 2016).

– Preparación de solución buffer

Buffer acetato de sodio (CH₃-COONa), 0.4 M, pH 4.5

Mezclar 54.43 g CH₃CO₂Na ° 3 H₂O y 960mL de agua destilada en un beaker. Medir el pH y ajustar a 4.5 con HCl concentrado. Transferir a un matraz volumétrico de 1 litro y llenar hasta 1 litro con agua destilada.

Buffer cloruro de potasio (KCl), 0.025 M, pH 1.0

Mezclar 1.86 g KCl y 980 ml de agua destilada en un beaker. Medir el pH y ajustarlo a 1.0 con HCl concentrado. Transferir a un matraz volumétrico y llenar hasta 1 litro con agua destilada (Giusti 2001).

i. Dilución

Son mezclas débiles con su base conjugada en una solución que tiene un pH cercano al pK (fuerza que tienen las moléculas de disociarse) del ácido, las sustancias buffer no son sensibles al pH por lo que no los afecta los agregados ácidos y básicos, actúan de manera más eficiente el límites del pH de pK 1, si no se mantuvieran en ese límite la solución cambiaría con rapidez al añadirle ácidos o bases fuertes (Voet 2006) es por ello que, es importante que las sustancias buffer KCl y CH₃-COONa se mantengan a pH 1 y 4.5 respectivamente para que cumplan con el método de pH diferencial (Giusti 2001).

Se colocó 0.5 mL del extracto con 24.5 mL de sustancias Buffer (KCl y CH₃-COONa) y se dejó actuar por 20 minutos.

j. Lectura de absorbancia

Con el espectrofotómetro Genesys UV-Vis se ajusta el color blanco con agua destilada y se leyó la absorbancia de las soluciones en cubetas de 1 cm de espesor a diferentes longitudes de onda (260, 280, 490, 515, 518, 520, 530, 532, 546, 550 y 700 nm)

Se ajusta el color blanco con agua destilada en el equipo y se leyó la absorbancia en cubetas de 1 cm con el espectrofotómetro Genesys UV-Vis a diferentes longitudes de onda (260, 280, 490, 515, 518, 520, 530, 532, 546, 550 y 700 nm).

La absorbancia medida en el espectrofotómetro medida a partir de una dilución apropiada del extracto con la sustancia buffer, debe estar en el rango de 0.2 y 1.4 medidos y a una

longitud de onda de 520nm, para garantizar un buen resultado, y en base a esto, las experiencias de los tratamientos aplicados mostraron similitudes en el rango de absorbancia y la longitud de onda puesto que se obtuvo mejores resultados a 515 nm (Martínez 2015).

k. Cálculo de antocianinas

Según la metodología mencionada por Martínez (2011) el contenido de antocianinas se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales (mg/L)} = (A) (\text{PM}) (\text{FD}) (1000) / \epsilon (1)$$

La absorbancia (A) se calculó de la forma siguiente:

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

De la ecuación Lambert-Beer se obtiene $C=A/\epsilon L$:

- **C** = la concentración molar
- **A** = absorbancia
- **ϵ** = absorbancia molar o coeficiente de extinción molar (constante física para especies moleculares en un solvente a una determinada longitud de onda, se pueden utilizar los valores de absorbancia molar para pigmentos purificados tomados de la literatura) = 26900 L/ (mol*cm)
- **L** = longitud de recorrido en cm (cubeta)

Además:

- **PM** = peso molecular del pigmento = 449,2g/mol. (Schou 1927)
- **FD** = factor de dilución

3.3.5 Tratamiento y análisis de datos

La información recolectada respecto al contenido de antocianinas presentes en los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”, fueron ordenados y reservados en cuadros en una hoja de Excel, luego se organizaron de acuerdo a la etapa de floración botón, botón intermedio y botón, así como la temperatura (70 °C y 50 °C) y tiempo (30 minutos y 15 minutos). Por separado fueron ingresados los datos al programa Statgraphic Centurión XVIII para realizar el análisis de varianza ANOVA y determinar si hay significancia estadística entre los tratamientos (efectos independientes y sus interacciones). En en los casos donde hubo significación estadística se realizó la prueba de comparaciones múltiples de medias Tukey, ($p < 0,05$), con el programa Minitab18, permitiendo conocer la diferencia entre las medias individuales de los factores que provienen del análisis de la varianza y establecer el mejor tratamiento para la extracción del pigmento.

3.3.6 Presentación de la información

Los resultados obtenidos de la extracción de antocianinas y el análisis estadístico se presentan en tablas que responden a un ordenamiento lógico que tienen una representación visual de la totalidad de la información.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas

Se encontró significación estadística en tres factores independientes: solvente, temperatura y tiempo, porque su Valor-P es menor al 0.05 (Tabla 6). Este resultado indica que el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” están afectado significativamente por el solvente, temperatura y tiempo, causando cantidades diferentes del pigmento en función a las condiciones de extracción.

El coeficiente de variación es 3.23%, indica que la variabilidad de los tratamientos experimentales para la variable respuesta (contenido de antocianina) es muy baja y que los resultados son relativamente homogéneos por ser menores al 30% según Martínez (2012), es decir, que se encontraron similares resultados en contenido de antocianinas bajo el efecto de los tratamientos.

En la Tabla 7 muestra la prueba Tukey al 5 % de confianza para el factor solvente, indica que las medias en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” formaron dos grupos (A y B). Esta prueba indica que el mayor contenido de antocianinas es la media que está dentro del grupo A (360.9 mg/L) que corresponde al solvente etanol al 40 % y es estadísticamente superior al contenido de antocianinas extraídos con agua destilada (grupo B) con media de 209.5 mg/L.

Piovesana (2019) reporta que el etanol extrae la mayoría de los compuestos bioactivos presentes en los pétalos de rosas que son moléculas altamente polares, contribuye a aumentar el rendimiento en general y en medio ácido aumenta la extracción de componentes de la matriz y reduce la selectividad del proceso. Según este autor, el etanol tiene mayor efectividad en la

extracción de pigmentos cuando está en medio ácido, por ello se utilizó HCl para generar esta condición y favorecer la estructura del catión flavilio.

El resultado reflejó que el contenido de antocianinas con etanol al 40 % es de 360,9 mg/L, siendo el resultado similar a lo encontrado por Vankar (2010) quien extrajo antocianinas de los pétalos rojos de la flor *Impatiens Balsamina* con mezclas etanólicas (336.56 mg/L). Analizando el resultado, la diferencia radica en el procedimiento del uso del solvente, ya que el pigmento se extrajo con etanol puro que tiene más poder de arrastre del pigmento de los cloroplastos de las hojas pero este puede ser muy agresivo con la estructura de la antocianina, provocando la reducción del contenido, y aunque no hay mucha diferencia en el resultado, se recomienda bajar el volumen de alcohol al etanol.

Tabla 6. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Solvente | 45845.8 | 1 | 45845.8 | 1553.59 | 0.0161 * |
| B:Temperatura | 20247.5 | 1 | 20247.5 | 686.13 | 0.0243 * |
| C:Tiempo | 7010.8 | 1 | 7010.8 | 76.45 | 0.0565 NS |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 3317.19 | 1 | 3317.19 | 112.41 | 0.0599 NS |
| AC | 995.08 | 1 | 995.08 | 33.72 | 0.1086 NS |
| BC | 10.4626 | 1 | 10.4626 | 0.35 | 0.6581 NS |
| ABC | 29.5096 | 1 | 29.5096 | 0.02 | 0.8953 NS |
| ERROR | 3.23459 | 8 | 3.23459 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 77456.3 | 15 | | | |

NS: no significativo; *: significativo

C.V. = 3.23%

Tabla 7. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”

| SOLVENTE | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|--------------|------------|
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 360.9 (mg/L) | A |
| Agua Destilada Ac. | 4 | 209.5 (mg/L) | B |

En la Tabla 8 muestra la prueba Tukey al 5 % de confianza para el factor temperatura, indica que las medias en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” se encuentran dentro de un rango de agrupación A. Esta prueba indica que no hay diferencia significativa entre las medias de contenido de antocianina usando temperatura de 70 °C (335.5 mg/L) y 50 °C (234.9 mg/L). La falta de diferencias significativas entre las dos temperaturas de extracción sugiere que ambos tratamientos son parecidos y hay una diferencia numérica en las medias de contenido de antocianinas obtenidas.

Según herrera (2017) se obtienen mejores resultados cuando la extracción se realiza entre los 25 y 70 ° C, lo que facilitaría el incremento de la solubilidad de las antocianinas y por ende el coeficiente de difusión de los solventes líquidos en la matriz sólida de los pétalos de rosas favorece la cinética de desorción de los compuestos de la matriz. Según este autor, la temperatura juega un rol importante en el proceso de extracción porque ayuda al solvente en la liberación del pigmento con mayor facilidad y en su solubilidad.

Thu *et al.* (2015) mencionan que si los tiempos de extracción son muy prolongados superando la 1.5 horas, las antocianinas pierden su calidad, se oxidan y se reduce el contenido. Según este autor, los tiempos de extracción deben ser controladas para evitar desestabilizar la estructura de las antocianinas y reducir su rendimiento, ya que que la acción sinérgica del tiempo y temperatura es notable en la extracción del pigmento.

De acuerdo al resultado obtenido con el etanol al 40 % (335,5 mg/L), este contenido difiere a lo encontrado por Kumari (2017) quien extrajo antocianinas de variedades de rosas rojas/rosadas donde destaca la variedad Bhim con 246.96 mg/L y Raktima con 210.67 mg/L, extraídas con etanol acidificado al 0.1% con HCl a 80 °C por 20 minutos. Analizando estos resultados, las variedades de rosa de tonalidad roja tienen diferentes contenidos de antocianina y el estudio encontró que la variedad “Freedom” es superior a los resultados de este autor con 335.5 mg/L de antocianinas extraídos con etanol al 40 %, además, la diferencia en el procedimiento del uso de 20 °C más de temperatura pudo haber incidido en la destrucción de compuesto fenólicos, afectando el azúcar glicosilante y apertura del anillo aromático produciendo chalconas incoloras, lo que ocasionó menor contenido (Lock 1997).

Sánchez (2019) extrajo antocianinas en las flores de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) con solvente etanol al 75 % por 30 minutos y reportó 348.2 +- 96.7 mg de antocianinas. Este resultado se aproxima al contenido de antocianina extraído por 30 minutos (360.9 mg/L) indicando que hay un equilibrio entre la fase sólida y líquida, por otro lado, la diferencia radica en el volumen de alcohol utilizado por el autor respecto a esta investigación que varía en 35%, esto indica que mejora mínimamente la extracción cuando existe 75 mL de etanol en 100 mL del solvente.

Tabla 8. Prueba Tukey para el factor temperatura en el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”

| TEMPERATURA | N | Media | Agrupación |
|-------------|---|--------------|------------|
| 70 °C | 4 | 335.5 (mg/L) | A |
| 50 °C | 4 | 234.9 (mg/L) | A |

4.2 Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón intermedio con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas

Se encontró significación en tres factores independientes: solvente, temperatura y tiempo porque su Valor-P es menor al 0.05 (Tabla 9). Este resultado indica que el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” están afectados significativamente por estos factores, causando cantidades diferentes del pigmento en función a las condiciones de extracción.

El coeficiente de variación es 53.55% indica que la variabilidad de los tratamientos experimentales para la variable respuesta (contenido de antocianina) es muy alta y que los resultados son heterogéneos por ser mayores al 30% según Martínez (2012), es decir, que se encontraron diferentes resultados en contenido de antocianinas bajo el efecto de los tratamientos.

En la Tabla 10 muestra la prueba Tukey al 5 % de confianza para el factor solvente, indica que las medias en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” se encuentran dentro de un rango de agrupación A. Esta prueba indica que no hay diferencia significativa entre las medias de contenido de antocianina extraídas con solvente etanol al 40% (334.5 mg/L) y agua destilada (226.6 mg/L). La falta de diferencias significativas entre los dos solventes de extracción sugiere que ambos tratamientos son parecidos y hay una diferencia numérica en las medias de contenido de antocianinas obtenidas.

Piovesana (2019) menciona que la acción del etanol proporciona solvatación debido a la presencia de radical etilo que proporciona protones y disuelve compuestos polares. Según este autor, hay una interacción entre las moléculas del solvente etanol al 40 % con los compuestos polares que imparten el color rojo en los pétalos de rosa, favoreciendo la extracción de componente fenólicos, además, el etanol retarda la acción nucleófila que produce el ataque de moléculas de agua al catión flavilio dando como resultado compuestos incoloros.

Tabla 9. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón intermedio

| <i>Fuente</i> | <i>Suma de Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------------------|--------------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Solvente | 24611.3 | 1 | 24611.3 | 271.24 | 0.0386 * |
| B:Temperatura | 28997.4 | 1 | 28997.4 | 319.58 | 0.0356 * |
| C:Tiempo | 9464.7 | 1 | 9464.7 | 94.52 | 0.0634 NS |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 138.289 | 1 | 138.289 | 1.52 | 0.4334 NS |
| AC | 5239.59 | 1 | 5239.59 | 57.74 | 0.0833 NS |
| BC | 3224.78 | 1 | 3224.78 | 35.54 | 0.1058 NS |
| ABC | 90.7373 | 1 | 90.7373 | 0.03 | 0.8701 NS |
| ERROR | 53.5495 | 8 | 53.5495 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 71766.9 | 15 | | | |

NS: no significativo; *: significativo

C.V. = 53.55%

Tabla 10. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”

| SOLVENTE | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|--------------|------------|
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 334.5 (mg/L) | A |
| Agua Destilada Ac. | 4 | 223.6 (mg/L) | A |

En la Tabla 11 muestra la prueba Tukey al 5 % de confianza para el factor temperatura, indica que las medias en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” se encuentran dentro de un rango de agrupación A. Esta prueba indica que no hay diferencia significativa entre las medias de contenido de antocianina usando temperatura de 70 °C (339.3 mg/L) y 50 °C (218.9 mg/L). La falta de diferencias significativas entre las dos temperaturas de

extracción sugiere que ambos tratamientos son parecidos y hay una diferencia numérica en las medias de contenido de antocianinas obtenidas.

Químicamente, la estructura molecular se desestabiliza cuando se aumenta la temperatura y hay una mayor destrucción de antocianinas ya que se hidroliza la estructura del 3-glucósido (azúcar glicosilante) que tiene la función de proteger, que es poco estable (Jenshi *et al.* 2011). Las medias resultantes varían en 120.4 mg/L, lo que indica que a 70 °C aún se mantiene la estabilidad de la estructura de la antocianina y es superior en contenido al tratamiento con 50 °C, que probablemente por no estar tan expuesto al calor su contenido es menor, además, Silva *et al.* (2015) mencionan que el hecho de aumentar el tiempo de contacto entre el solvente y la muestra, más completa será la difusión de la partícula sólida al líquido hasta alcanzar el equilibrio.

Vidana (2021) extrajo antocianinas de flores frescas de Conchita ternatea (*Clitoria Ternatea*) de tonalidad roja, obtuvo 4000.0 mg/L de antocianinas, la diferencia es muy amplia respecto al contenido calculado en esta investigación y lo convierte en una buena alternativa de extracción que produce altos contenidos de antocianinas. En relación a los resultados de este autor, su metodología se basó en usar el solvente agua destilada con temperatura de 60 °C por 60 minutos, y se aprecia que al utilizar 10 °C menos de temperatura extendió el tiempo de extracción para generar un equilibrio térmico, sumado a que el agua destilada se encuentra en medio ácido, ayuda a mejorar la extracción además de que es solvente ecológico, no inflamable y económico (Chemat 2019).

Tabla 11. Prueba Tukey para el factor temperatura en el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”

| TEMPERATURA | N | Media | Agrupación |
|-------------|---|--------------|------------|
| 70 °C | 4 | 339.3 (mg/L) | A |
| 50 °C | 4 | 218.9 (mg/L) | A |

4.3 Análisis de la varianza (ANOVA) para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón desarrollado con dos solventes, dos tiempos y dos temperaturas

Se obtuvieron los resultados del análisis ANOVA para el contenido de antocianinas (mg/L) en la etapa de floración botón desarrollado (Tabla 12), se encontró significación estadística para el factor independiente solvente porque su Valor-P es menor al 0.05 (0.0483). Este resultado indica que el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” está afectado significativamente por el solvente, causando cantidades diferentes del pigmento en función a esta condición de extracción.

El coeficiente de variación es 41.50%, indica que la variabilidad de los tratamientos experimentales para la variable respuesta (contenido de antocianina) es alta y que los resultados son relativamente heterogéneas por estar entre el rango de 40 % y 50 % según Martínez (2012), es decir, que se encontraron diferentes resultados en contenido de antocianinas bajo el efecto de los tratamientos.

En la Tabla 13 muestra la prueba Tukey al 5 % de confianza para el factor solvente, indica que las medias en el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” formaron dos grupos (A y B). Esta prueba indica que el mayor contenido de antocianinas es la media que está dentro del grupo A (484.9 mg/L) que corresponde al solvente agua destilada y es estadísticamente superior al contenido de antocianinas extraídos con etanol al 40% (grupo B) con media de 314.6 mg/L.

Noreña *et al.* (2019) mencionan que el agua destilada al añadirse ácido al medio de extracción, la recuperación de antocianinas aumenta debido a su bajo pH en la solución, y cuánto más elevado el pH, aparecen estructuras inestables que se degradan con rapidez. El resultado obtenido en la etapa de floración botón desarrollado muestra que es mejor extraer el pigmento antocianina con el agua destilada, quizás se deba a la polaridad del solvente con los pétalos de rosas como

también la madurez vegetativa en la que se encuentra, esto se puede relacionar a lo que menciona Mingyuan (2019) quien menciona que el contenido de antocianina en rosas de tonalidad roja aumenta con la apertura de las flores pues, a medida que se abren, los pétalos se expanden gradualmente y su área de recepción de luz aumenta y favorece su estabilidad.

Yang *et al.* (2002) extrajeron antocianinas de pétalos de rosas variedad “Mister Lincoln” en su último ciclo de crecimiento, con etanol al 80 % a temperatura ambiente por 90 minutos y reportaron el valor de 502,64 mg/L, este resultado supera el resultado obtenido al usar agua destilada acidificada (489.9 mg/L), viendo su metodología, empleó 300 mL del solvente etanol al 80%, mientras que esta investigación usó 100 mL del solvente etanol al 40% y agua destilada pura, por lo tanto, usar 200 mL más de solvente con 40 % más de volumen de alcohol en el solvente etanol y en el agua destilada, fueron determinantes en el contenido de antocianinas en comparación a este estudio, también, la variedad utilizada por el autor tiene un tono de rojo mucho más intenso que la variedad “Freedom”.

Tabla 12. Análisis de varianza ANOVA para el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en la etapa de floración botón desarrollado

| <i>Fuente</i> | <i>Suma Cuadrados</i> | <i>de Gl</i> | <i>Cuadrado Medio</i> | <i>Razón-F</i> | <i>Valor-P</i> |
|-----------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|----------------|----------------|
| EFFECTOS PRINCIPALES | | | | | |
| A:Solvente | 57984.9 | 1 | 57984.9 | 173.22 | 0.0483 * |
| B:Temperatura | 22459.1 | 1 | 22459.1 | 67.09 | 0.0773 NS |
| C:Tiempo | 14269.3 | 1 | 14269.3 | 42.63 | 0.0968 NS |
| INTERACCIONES | | | | | |
| AB | 4042.95 | 1 | 4042.95 | 12.08 | 0.1784 NS |
| AC | 1097.59 | 1 | 1097.59 | 3.28 | 0.3212 NS |
| BC | 27.9935 | 1 | 27.9935 | 0.08 | 0.8208 NS |
| ABC | 334.751 | 1 | 334.751 | 0.19 | 0.6892 NS |
| ERROR | 41.5072 | 8 | 41.5072 | | |
| TOTAL (CORREGIDO) | 100216. | 15 | | | |

NS: no significativo; *: significativo

C.V. = 41.51%

Tabla 13. Prueba Tukey para el factor solvente en el contenido de antocianinas en pétalos de *Rosa* spp. variedad “Freedom”

| SOLVENTE | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|--------------|------------|
| Agua Destilada Ac. | 4 | 484.9 (mg/L) | A |
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 314.6 (mg/L) | B |

4.4 Uso de colorantes naturales de origen vegetal en la industria alimentaria

Flores *et al.* (2018) utilizaron antocianinas extraídas de las hojas de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) combinados con maíz morado (*Zea mays L.*) para crear una bebida funcional y luego de determinar el contenido de antocianina y su capacidad antioxidante, evaluaron los productos en dos temperaturas de almacenamiento y llegaron a la conclusión de que este tipo de bebidas presentan características organolépticas y sensoriales adecuadas y proponen este tipo de bebidas para la industria alimentaria. Según el autor, las antocianinas aportan color y tienen propiedades funcionales ideales para utilizarse en productos alimenticios, ya que el uso de estos pigmentos es un factor determinante cuando buscamos algún producto alimentario ya que estos producen sensaciones y complementan su estética con la gama de colores que producen las antocianinas, además, hay una alta exigencia de las personas de consumir pigmentos de fuentes naturales que garanticen seguridad y calidad, y sustituir los colorantes sintéticos, por ello la investigación propone las antocianinas extraídas de las rosas porque representan una buena alternativa para la industria alimentaria, ya sea que se usen de forma concentrada o el polvo y utilizarlas para diversos tipos de alimentos como bebidas, jaleas, mermeladas, etc.

Determinación de la mejor combinación entre los factores (solvente, tiempo y temperatura) en estudio en tres etapas de floración

De acuerdo a los resultados obtenidos por el análisis ANOVA y Tukey, la mejor combinación de factores de solvente, temperatura y tiempo para la extracción del contenido de antocianinas de *Rosa* spp. variedad “Freedom” en las tres etapas de floración, se detallan en la Tabla 16:

Tabla 14. Resumen del análisis comparativo Tukey al 95% de confianza de los factores con significación estadística y mejores tratamientos

| ETAPA DE FLORACIÓN | FACTOR | NIVEL | MEJOR TRATAMIENTO |
|---------------------------|---------------|--------------------------------|--|
| Botón | Solvente | Etanol al 40% | Etanol al 40 % Ac. + 70 °C + 30 minutos (T1) |
| | Temperatura | 70 °C – 50 °C | |
| | Tiempo | 30 – 15 min | |
| Botón intermedio | Solvente | Etanol al 40% - Agua destilada | Etanol al 40% Ac. + 70 °C + 30 minutos (T1) |
| | Temperatura | 70 °C – 50 °C | |
| | Tiempo | 30 – 15 min | |
| Botón desarrollado | Solvente | Agua destilada | Agua destilada Ac.+ 70 °C + 30 minutos (T5) |
| | Temperatura | 70 °C – 50 °C | |
| | Tiempo | 30 – 15 min | |

En la Tabla 14 observamos que tanto la etapa de floración botón y botón intermedio arrojan mejores resultados en contenido de antocianina al extraerlos con etanol al 40% acidificado a 70 °C por 30 minutos (T1), porque el solvente extrae homogéneamente el pigmento y al ser selectivo con algunos componentes biológicos de las rosas (por la polaridad del solvente), extrae antocianinas más puras por lo que las lecturas son más exactas, por otro lado, en la etapa de floración botón desarrollado se extrae mejor el contenido de antocianinas con el agua destilada acidificado a 70 °C por 30 minutos (T5), en este caso el solvente no es selectivo porque el agua es neutra (pH 7) y puede que haya extraído otros componentes que hayan influenciado en la lectura y lo haya elevado, otra razón es que el agua destilada en medio ácido produce una recuperación de la estabilidad de la antocianina (Noreña 2019),

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se determinó el contenido de antocianinas de los pétalos de *Rosa* spp, variedad “Freedom” con el método de pH diferencial y el valor más alto para la etapa de floración desarrollado fue 599.19 mg/L con el tratamiento cinco (agua destilada, 70 °C, 30 minutos); para la etapa de floración botón fue de 488.04 mg/L con el tratamiento uno (etanol al 40 %, 70 °C, 30 minutos) y en la etapa de floración botón intermedio fue de 457.12 mg/L con el tratamiento uno (etanol al 40 %, 70 °C, 30 minutos).
- En la etapa de floración botón se encontró significancia estadística para el contenido de antocianinas (mg/L) en los factores solvente (mejor tratamiento con etanol al 40 %, 360.9 mg/L) y temperatura (mejor tratamiento a 70 °C, 335.5 mg/L); en la etapa de floración botón intermedio se encontró significancia estadística para el contenido de antocianinas (mg/L) en los factores solvente (mejor tratamiento con etanol al 40 %, 334.5 mg/L) y temperatura (mejor tratamiento a 70 °C, 339.3 mg/L); y en la etapa de floración botón desarrollado se encontró significancia estadística para el contenido de antocianinas (mg/L) en el factor solvente (mejor tratamiento con agua destilada, 484.9 mg/L).

5.2 Recomendaciones

- Realizar investigaciones para determinar el contenido de antocianinas en los pétalos de *Rosa* spp. en otras variedades de rosas.
- Utilizar el pigmento antociánico de los pétalos de las rosas para repotenciar el aspecto visual de productos respecto a su color en una proporción de 0.05 a 0,1 % del peso del alimento, como por ejemplo mermelada, jalea, yogur, embutidos, etc.
- Se recomienda usar etanol con porcentajes superiores de alcohol, en pétalos de rosas de diferentes variedades, para determinar efectos diferentes a esta investigación.

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Acosta, A; Arias, T; Gómez, V; Gutiérrez, S; Parra, M. 2014. Análisis de las características de los diferentes pigmentos fotosintéticos y accesorios que se encuentran en los diferentes tipos de vegetales. Tesis Lic. Valledupar, Colombia, UPC. 40 p.
- Aranceta, J; Pérez, C. 2006. Fruta, verduras y salud. 1 ed. España, Pérez C M., Madrid. 272 p.
- Arzate, AM; Bautista, MD; Piña, JL; Reyes, JI; Vásquez, LM. 2014. Técnicas tradicionales y biotecnológicas en el mejoramiento genético del rosal (*Rosa Spp.*). 1 ed. México, UAEMEX, Toluca. 114 p.
- Atani. 2013. Ciclos de floración: Rosales de floración única, continua, repetitiva (en línea, blog). Barcelona, España, CATIE. Consultado 27 may. 2019. Disponible en <http://archivo.infojardin.com/tema/ciclos-de-floracion-rosales-de-floracion-unica-continua-repetitiva-articulo.352277/>
- Castañeda, L. K., y Vásquez Ramos, C. E. 2018. Determinación del contenido de antocianinas total del camote morado (*Ipomoea Batatas L.*) provenientes de Virú y Chiclayo. Tesis Ing. Ind. Alim, Cajamarca, Perú, Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo. 75 p.
- Camavilca, M., y Leyva, J. 2015. Identificación de antocianinas y carotenoides en flores de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) por cromatografía en capa fina. Tesis Ing. Ind. Alim. Huancayo, Perú, Universidad Nacional del Centro del Perú. 112 p.
- Chemat, F; Abert, M; Karthikeyan, H; Khadhraoui, B; Hilali, S; Perino, S; Fabiano, A. 2019. Disolventes alternativos para la extracción verde de alimentos y productos naturales: Panorama, principios, aplicaciones y prospectos. Rev. Pubmed - Molecules 24(16): 3007

- Dermatol, C. 2013. Albert Szent-Györgyi (1893-1986): El científico que descubrió la vitamina C. Biblioteca Nacional de Medicina. Institutos Nacionales de Salud 31(3): 327-31.
- Dyankova, S; Doneva, M. 2016. Extraction and characterization of anthocyanin colorants from plant sources. *Agricultural science and technology (Product Quality and Safety)* 8(1):85-89.
- García, M; Quintero, R; López Munguía, A. 2004. *Biología alimentaria*. 5 ed. rev. México D. F., México, Editorial Limusa S. A. de C. V. 620 p.
- Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Actas Biológicas Colombianas* 13(3): 27-36.
- Giusti, MM; Wrolstad, RE. 2001. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols* 0(1):2-13.
- Granato, D; Sávio, D. 2016. *Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas: Uma abordagem teórico – prática*. 1 ed. Río de Janeiro, Brasil, Elsevier Ltda. 576 p.
- He, J; Giusti, M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Ann. Rev. Food Scientist Technology* 1(1): 163–187.
- Herrera, MA. 2017. Estabilidad térmica del extracto colorante de orujos de uva (*Vitis aestivalis* – cinérea x *Vitis vinífera*) en una bebida m. Tesis Ing. Ind. Alim. Lima, Perú, UNAM. 128 p.
- Heredia, F; Francia, E; Rivas, J; Vicario, I; Santos, C. 1998. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes I. pH effect. *Rev. Food Chemical* 63(4): 491–498.
- Herrera, MA. 2017. Estabilidad térmica del extracto colorante de orujos de uva (*Vitis aestivalis* – cinérea x *Vitis vinífera*) en una bebida modelo. Tesis ing. Agr. Lima, Perú, UNAM. 118 p.

- Jenshi, J; Saravana, M; Aravindhana, KM; Suganya, P. 2011. The effect of light, temperature, pH on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Plant Biology* 1(5): 3-8.
- Kumari, P. 2017. Isolation and Characterization of Anthocyanin Pigments from Indian Rose Varieties as a Potential Source of Nutraceuticals. *Rev. Indian Journal of Agricultural Sciences* 87(10): 1340-1346.
- Lock, O. 1997. *Colorantes naturales*. 1 ed. rev. Alvarado, M. Lima, Perú. Fondo editorial. 280 p.
- Marín, S. E; Mejia, C. M. 2012. Extracción de colorante a partir de la flor de Jamaica. Tesis Ing. Quim. Managua, Nicaragua, UNI. 65 p.
- Martinez, H. 2015. Técnica de análisis espectrofotométrica de antocianinas en materias primas de la región de Ayacucho. Tesis Ing. Agroind. Ayacucho, Perú, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 134 p.
- Mondragón, JC. 2017. Cultivo y comercialización de rosas se incrementa en Cajamarca. *RPP Noticias*, Lima, Perú; 08 Sept: 1.
- Mingyuan, Z; Xiaoming, S; Yu, W; Zongda, X; Xiaoyan, Y. 2019. Análisis de componentes de antocianinas en pétalos en diferentes etapas de floración de tres cultivares híbridos de *Rosa Rugosa*. *Avances de biociencias y biotecnología* (10)1:9-11.
- Pella, MR. 2004. Estudio de separación del colorante del Camu-Camu. Tesis Ing. Quim. Lima, Perú. Universidad Nacional de Ingeniería. 128 p.
- Pereira, D; Valentao, P; Pereira, J; Andrade, P. 2009. Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules* 14(6): 2202–2211.

- Piovesana, A; Zapata, CP. 2019. Study of Acidified Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from *Hibiscus Sabdariffa L.* calyces. The Open Food Science Journal 1(11): 25-34.
- Prior, R; Wu, X. 2006. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities, Free Radical Research 40(10): 1014–1028.
- Puertas, MA. Ríos, Y. Rojano, BA. 2013. Determinación de antocianinas mediante extracción asistida por radiación de microondas en frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) de alto consumo en Antioquia-Colombia. Revista Cubana Plantas Medicinales 18(2):288-297.
- Rosen Tantau. 2008. Rosas Estándar (en línea, blog). Uetersen, Schleswig-Holstein, Alemania, CATTIE. Consultado 26 sept. 2018. Disponible en <http://www.rosentantau.com/rosas-estandar/>.
- Sánchez Gamboa, J. V. 2019. Contenido de antocianinas y actividad antioxidante in vitro de *Hibiscus sabdariffa L.* (flor de jamaica) procedente de Huaura-Huacho. Tesis Lic. Nutr. Trujillo, Perú, Universidad César Vallejo. 50 p.
- Thu, NL; Kim, DT; Phuoc, L; Ut, TT; Sao, MD; Ngoc, NT. 2015. Effect of ethanol on the anthocyanin extraction from the purple rice of Vietnam. Science Publishing G. 3(1-2): 45-48.
- Valero, ID. 2018. Tipos de rosas (en línea, blog). s. l., CATIE. Consultado 26 sept. 2018. Disponible en <https://www.jardinedia.com/tipos-de-rosas/>.
- Vankar, P; Srivastava, J. 2010. Evaluation of Anthocyanin Content in Red and Blue Flowers. International Journal of Food Engineering 6(4):5-14.
- Vankar, PS. Bajpai, D. 2010. Rose anthocyanins as acid base indicators. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry 9(5):879-884.

- Vásquez, MI. 2011. Determinación del contenido de antocianinas totales de la coronta de maíz morado (*Zea Mays* L.), variedades UNC 47 e INIA 601 en Cajamarca. Tesis Ing. Ind. Alim. Cajamarca, Perú, Universidad Nacional de Cajamarca. 93 p.
- Vázquez, B. 2014. Extracción y uso potencial de las antocianinas del bagazo de café (*Coffea arábica* sp.) como colorantes en bebidas. Tesis Ing. Mec. Agr. Buenavista, México, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 43 p.
- Vera, JA. 2015. Evaluar cuatro sustratos para el enraizamiento de patrones de rosas de la variedad natal brier en la zona de el quinche, provincia de pichincha. Tesis Ing. Adm. y Prod. Agrop. Lojas, Ecuador. Universidad Nacional de Loja. 51 p.
- Wang, L. 2001. Analysis of Petal Anthocyanins to Investigate Flower Coloration of Zhongyuan (Chinese) and Daikon Island (Japanese) Tree Peony Cultivars. *Journal of Plant Research* 114(1): 33-41.
- Vidana, G. C., Yan, Y. y Sim, W. 2021. Antocianinas de la flor de *Clitoria Ternatea*: Biosíntesis, extracción, estabilidad, actividad antioxidante y aplicaciones. Tesis Cien. Subang Jaya, Malasia, UMM. s. p.
- Voet, D; Voet JG. 2006. Bioquímica. 3 ed. Voet, JG. Montevideo, Uruguay. Editorial Médica Panamericana. 1764 p.
- Yang, M; Cho, E; Ha, J. 2002. Chemical composition of rose petals (*Rosa hybrida* L.) as a food material. *Korea Food Research* 129(2): 272-278.
- Zhao, CL; Yu, YQ; Chen ZJ; Wen, GS; Wei, FG; Zheng, Q; Wang, CD; Xiao, XL. 2017. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemical* 214: 119–128.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

ANEXO A: FOTOGRAFÍAS DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS PÉTALOS DE ROSAS VARIEDAD “FREEDOM”



Figura 6. Rosa en etapa de floración botón 1



Figura 7. Rosa en etapa de floración botón 2



Figura 8. Rosa en etapa de floración interm. 1



Figura 9. Rosa en etapa de floración interm. 2



Figura 10. Rosa en etapa de floración desarroll. 1



Figura 11. Rosa en etapa de floración desarroll. 2



Figura 12. Pétalos de rosas



Figura 13. Peso de pétalos de rosas



Figura 14. Calibración pH-metro



Figura 15. Medición de pH de las sustancias buffer



Figura 16. Preparación de solv. etanol al 40 %



Figura 17. Preparación de solv. agua destilada



Figura 18. Pétalos de rosas trituradas



Figura 19. Verter solvente para extracción



Figura 20. Molienda 1



Figura 21. Molienda 2



Figura 22. Verter contenido a m. kitazato



Figura 23. Extracción de antocianinas



Figura 24. Papel Watman N° 45 en embudo buschner



Figura 25. Filtración de extracto



Figura 26. Filtración culminada



Figura 27. Papel filtro mas muestra

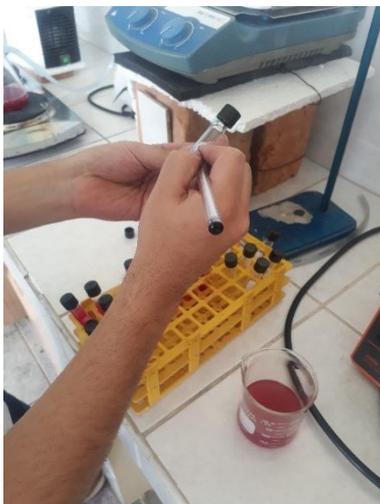


Figura 28. Rotulado de tubos de ensayo



Figura 29. Extractos de antocianina



Figura 30. Medición de sustancias buffer



Figura 31. Sustancias buffer



Figura 32. Extractos acidificados 1



Figura 33. Extractos acidificados 2



Figura 34. 0.5mL extrac. en sustancia buffer



Figura 35. Vertido de extrac. en sustancia buffer



Figura 36. Reposo de muestras por 20 min



Figura 37. Muestras listas para lectura en espectrofotómetro



Figura 38. Agua destilada para calibración blanco



Figura 39. Muestra en cubeta

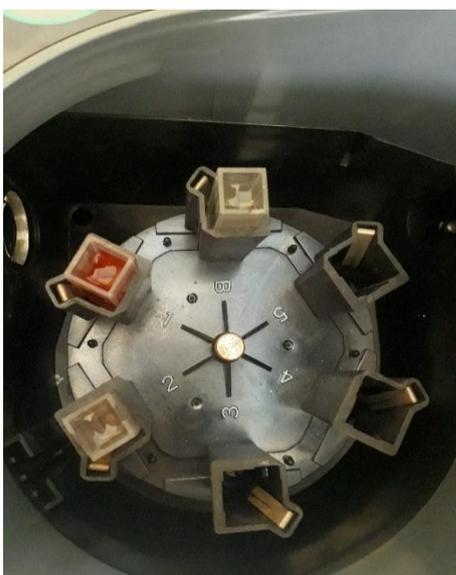


Figura 40. Muestras en espectrofotómetro

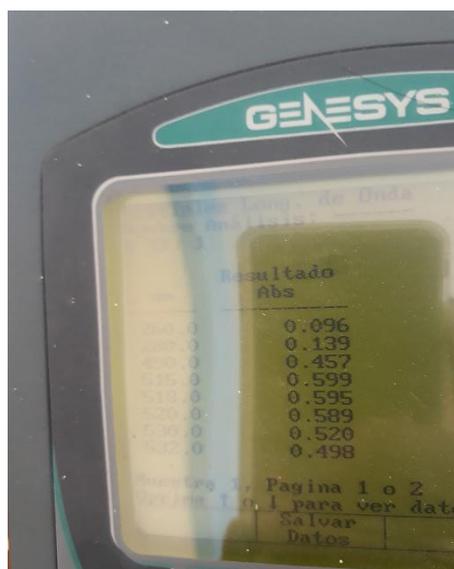


Figura 41. Lecturas de absorbancia a diferentes L. O.

ANEXO B: GLOSARIO DE TÉRMINOS UTILIZADOS

Rosa. Flor que pertenece a la familia Rosáceas, que tienen una variedad de colores y olores, pétalos en forma ovalada o de corazón y con espinas en el tallo.

Antocianina. Pigmento que se encuentra en el citoplasma de los órganos vegetales y proporcionan colores como el azul o el morado.

Antocianidina. Pertenecen a los glucósidos de la familia de los flavonoides, están formadas por enlaces de azúcar y protege a las plantas de la radiación ultravioleta.

Chalcona. Son cetonas aromáticas que tienen tonalidades oscuras y marrones.

pH diferencial. Es un método que nos permite calcular las antocianinas totales, que utiliza la reacción del oxonio de la antocianina a pH 1 y hemiacetal a pH 4.5.

Espectrofotometría. Mide la cantidad de luz que absorbe una muestra con una determinada longitud de onda.

Sustancias buffer. Son sustancias que mantienen constante el pH en determinada muestra.

HCl. Ácido clorhídrico.

Etanol. Conocido también como alcohol etílico, es un líquido que carece de color, transparente, cuya fórmula química es $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$.

Agua destilada. Es el agua normal que consumimos pero que pasa por un proceso de destilación, y resulta un agua purificada.

Varianza. Indica la variabilidad de los datos respecto a su dispersión con relación a la media, si es mayor el valor de la media habría mayor variabilidad.

Significancia estadística. Se asocia a la verificación de la hipótesis evaluando el valor-p de la prueba, evalúa la acción de un factor sobre otro y no sea al azar sino con una razón válida.

ANEXO C: CONTENIDO DE ANTOCIANINAS

Tabla 15. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón

| FACTOR | SOLVENTE (mg/L) | | | | |
|--------------------|---------------------------|----------|----------------------------|----------|--------|
| | ETANOL AL 40% ACIDIFICADO | | AGUA DESTILADA ACIDIFICADO | | |
| | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | T° |
| Etapa de floración | 30min | 15min | 30min | 15min | |
| BOTÓN | 488.0416 | 375.0652 | 277.4483 | 201.4007 | 70 °C |
| | 348.2530 | 232.1686 | 211.4290 | 147.6382 | 50 °C |
| | | | | | FACTOR |

Tabla 16. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón intermedio

| FACTOR | SOLVENTE (mg/L) | | | | |
|--------------------|---------------------------|----------|----------------------------|----------|--------|
| | ETANOL AL 40% ACIDIFICADO | | AGUA DESTILADA ACIDIFICADO | | |
| | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | T° |
| Etapa de floración | 30min | 15min | 30min | 15min | |
| BOTÓN INTERMEDIO | 457.1212 | 340.7035 | 279.9554 | 279.3768 | 70 °C |
| | 361.8142 | 178.5586 | 214.7503 | 120.3913 | 50 °C |
| | | | | | FACTOR |

Tabla 17. Contenido de antocianinas (mg/L) utilizando dos solventes en dos tiempos y dos temperaturas de extracción en la etapa de floración botón desarrollado

| FACTOR | SOLVENTE (mg/L) | | | | |
|--------------------|---------------------------|----------|----------------------------|----------|--------|
| | ETANOL AL 40% ACIDIFICADO | | AGUA DESTILADA ACIDIFICADO | | |
| | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | TIEMPO | T° |
| | 30min | 15min | 30min | 15min | |
| BOTÓN DESARROLLADO | 394.4446 | 295.7477 | 599.1881 | 521.4691 | 70 °C |
| | 342.6320 | 225.5428 | 431.5791 | 387.2173 | 50 °C |
| | | | | | FACTOR |

ANEXO D: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Solvente

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|----------|---------|---------------------------------------|
| SOLVENTE | 2 | Agua Destilada Ac., Etanol al 40% Ac. |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|----------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| SOLVENTE | 1 | 45846 | 45846 | 6.61 | 0.042 |
| Error | 6 | 41611 | 6935 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 83.2772 | 52.42% | 44.49% | 15.42% |

Medias

| SOLVENTE | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|--------------------|---|-------|-----------|----------------|
| Agua Destilada Ac. | 4 | 209.5 | 53.3 | (107.6, 311.4) |
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 360.9 | 105.0 | (259.0, 462.8) |

Desv.Est. agrupada = 83.2772

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| SOLVENTE | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|-------|------------|
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 360.9 | A |
| Agua Destilada Ac. | 4 | 209.5 | B |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|-------------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 2 | 50, 70 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 1 | 20247 | 20247 | 1.81 | 0.227 |
| Error | 6 | 67209 | 11201 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 105.837 | 23.15% | 10.34% | 0.00% |

Medias

| TEMPERATURA | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|-------------|---|-------|-----------|----------------|
| 50 | 4 | 234.9 | 83.7 | (105.4, 364.4) |
| 70 | 4 | 335.5 | 124.1 | (206.0, 465.0) |

Desv.Est. agrupada = 105.837

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| TEMPERATURA | N | Media | Agrupación |
|-------------|---|-------|------------|
| 70 | 4 | 335.5 | A |
| 50 | 4 | 234.9 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Tiempo

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|--------|---------|---------|
| TIEMPO | 2 | 15, 30 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| TIEMPO | 1 | 17011 | 17011 | 1.45 | 0.274 |
| Error | 6 | 70445 | 11741 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 108.355 | 19.45% | 6.03% | 0.00% |

Medias

| TIEMPO | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|--------|---|-------|-----------|----------------|
| 15 | 4 | 239.1 | 97.2 | (106.5, 371.6) |
| 30 | 4 | 331.3 | 118.5 | (198.7, 463.9) |

Desv.Est. agrupada = 108.355

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| TIEMPO | N | Media | Agrupación |
|--------|---|-------|------------|
| 30 | 4 | 331.3 | A |
| 15 | 4 | 239.1 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO D: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN INTERMEDIO

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Solvente

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|----------|---------|---------------------------------------|
| SOLVENTE | 2 | Agua Destilada Ac., Etanol al 40% Ac. |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|----------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| SOLVENTE | 1 | 45846 | 45846 | 6.61 | 0.042 |
| Error | 6 | 41611 | 6935 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 83.2772 | 52.42% | 44.49% | 15.42% |

Medias

| SOLVENTE | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|--------------------|---|-------|-----------|----------------|
| Agua Destilada Ac. | 4 | 209.5 | 53.3 | (107.6, 311.4) |
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 360.9 | 105.0 | (259.0, 462.8) |

Desv.Est. agrupada = 83.2772

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| SOLVENTE | N | Media | Agrupación |
|--------------------|---|-------|------------|
| Etanol al 40% Ac. | 4 | 360.9 | A |
| Agua Destilada Ac. | 4 | 209.5 | B |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|-------------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 2 | 50, 70 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 1 | 20247 | 20247 | 1.81 | 0.227 |
| Error | 6 | 67209 | 11201 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 105.837 | 23.15% | 10.34% | 0.00% |

Medias

| TEMPERATURA | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|-------------|---|-------|-----------|----------------|
| 50 | 4 | 234.9 | 83.7 | (105.4, 364.4) |
| 70 | 4 | 335.5 | 124.1 | (206.0, 465.0) |

Desv.Est. agrupada = 105.837

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| TEMPERATURA | N | Media | Agrupación |
|-------------|---|-------|------------|
| 70 | 4 | 335.5 | A |
| 50 | 4 | 234.9 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Tiempo

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|--------|---------|---------|
| TIEMPO | 2 | 15, 30 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|--------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| TIEMPO | 1 | 17011 | 17011 | 1.45 | 0.274 |
| Error | 6 | 70445 | 11741 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 108.355 | 19.45% | 6.03% | 0.00% |

Medias

| TIEMPO | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|--------|---|-------|-----------|----------------|
| 15 | 4 | 239.1 | 97.2 | (106.5, 371.6) |
| 30 | 4 | 331.3 | 118.5 | (198.7, 463.9) |

Desv.Est. agrupada = 108.355

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| TIEMPO | N | Media | Agrupación |
|--------|---|-------|------------|
| 30 | 4 | 331.3 | A |
| 15 | 4 | 239.1 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANEXO E: ETAPA DE FLORACIÓN BOTÓN DESARROLLADO

ANOVA de un solo factor: Contenido de antocianina vs Temperatura

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$
Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

| Factor | Niveles | Valores |
|-------------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 2 | 50, 70 |

Análisis de Varianza

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| TEMPERATURA | 1 | 20247 | 20247 | 1.81 | 0.227 |
| Error | 6 | 67209 | 11201 | | |
| Total | 7 | 87456 | | | |

Resumen del modelo

| S | R-cuad. | R-cuad. (ajustado) | R-cuad. (pred) |
|---------|---------|--------------------|----------------|
| 105.837 | 23.15% | 10.34% | 0.00% |

Medias

| TEMPERATURA | N | Media | Desv.Est. | IC de 95% |
|-------------|---|-------|-----------|----------------|
| 50 | 4 | 234.9 | 83.7 | (105.4, 364.4) |
| 70 | 4 | 335.5 | 124.1 | (206.0, 465.0) |

Desv.Est. agrupada = 105.837

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

| TEMPERATURA | N | Media | Agrupación |
|-------------|---|-------|------------|
| 70 | 4 | 335.5 | A |
| 50 | 4 | 234.9 | A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.