

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

OBTENCIÓN DE EXTRACTO COLORANTE POR MACERACIÓN A
PARTIR DE LAS SEMILLAS DE AYRAMPO (*Opuntia soehrensii*)
PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DE CANDARAVE

TESIS

Presentada por:

Bach. RUTH NOEMI JUSTO CONDORI

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

TACNA - PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias

TESIS

OBTENCIÓN DE EXTRACTO COLORANTE POR MACERACIÓN A PARTIR DE LAS SEMILLAS DE AYRAMPO (*Opuntia soehrensii*) PROCEDENTES DE LA PROVINCIA DE CANDARAVE

Sustentada y aprobada el 05 de julio del 2018, siendo el jurado calificador:

PRESIDENTE:


.....
Dra. Liliana Del Carmen Lanchipa Bergamini

SECRETARIO:


.....
Mgr. Luis Alberto Marín Aliaga

VOCAL:


.....
Mgr. Nicolás Guillermo Sequeiros Flores

ASESOR:


.....
MSc. Marcial Alfredo Castillo Cohaila

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mis padres: Rosendo Adrián Justo Pacci y María Condori Copa; a mi hermano Ricardo y a mi abuelo Gregorio Justo Aduvire y a toda mi familia, que siempre me mostraron su cariño y apoyo incondicional.

A Julio H. C., por su apoyo y motivación para no desistir y culminar la presente tesis.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por ser mi luz y mi fortaleza en los momentos difíciles y de desánimo y por haberme permitido culminar con éxito mi carrera

A mi asesor MSc. Marcial Alfredo Castillo Cohaila, por su apoyo, su amistad y sus consejos en el desarrollo y culminación de la presente tesis.

Al Ing. Leonardo Espillico C.; por su apoyo, sugerencias y recomendaciones durante el desarrollo de la investigación.

Al Ing. Guillermo Salazar, técnico de laboratorio de Análisis de alimentos de ESIA, por su valiosa colaboración.

Al MSc. Arístides Choquehuanca por su valiosa colaboración y consejos.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.3 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.4 JUSTIFICACIÓN.....	6
1.5 LIMITACIONES	8
1.6 OBJETIVOS.....	8
1.6.1 Objetivo General	8
1.6.2 Objetivos Específicos	8
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES	9
2.1 HIPÓTESIS.....	9
2.1.1 Hipótesis General	9
2.1.2 Hipótesis Específicas	9

2.2	VARIABLES.....	9
2.2.1	Indicadores de las variables	9
2.3	MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	10
2.4	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	10
CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA		13
3.1	CONCEPTOS GENERALES Y DEFINICIONES	13
3.1.1	Extracto	13
3.1.2	Maceración	13
3.1.3	Residuo	13
3.1.4	Métodos espectrofotométricos	14
3.2	ENFOQUES TEÓRICOS - TÉCNICOS	14
3.2.1	Características generales del ayrampo	14
3.2.2	Usos del ayrampo	16
3.2.2.1	Alimentaria	16
3.2.2.2	Textilería	17
3.2.2.3	Medicinal	17
3.2.3	Beneficios del ayrampo	17
3.2.4	Descripción morfológica	18
3.2.4.1	Tallos o pencas	18
3.2.4.2	Flores	19
3.2.4.3	Frutos	20

3.2.5	Clasificación taxonómica	21
3.2.6	Composición del ayrampo	21
3.2.7	Colorantes	21
3.2.7.1	Clasificación de los colorantes	22
3.2.7.2	Colorantes Naturales	23
3.2.7.3	Colorantes Sintéticos	26
3.2.8	Materia colorante de las semillas de ayrampo	27
3.2.8.1	Betalaínas	27
3.2.8.2	Estabilidad de las betalaínas	29
3.2.9	Extracción de colorantes	29
3.2.9.1	Métodos de extracción de colorantes	30
3.2.9.2	Factores que determinan la extracción del colorante	35
3.2.10	Método para cuantificación de betalaínas	37
3.3	MARCO REFERENCIAL	38
CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN		40
4.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	40
4.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	40
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.3.1	Materiales	40
4.3.2	Métodos de análisis	43
4.3.2.1	Materia prima	43

4.3.2.2	Colorante	43
4.3.3	Diseño procedimental	44
4.3.3.1	Procedimiento para la obtención de extracto colorante..	44
4.3.4	Procedimiento de la investigación	51
4.3.5	Diseño experimental	52
4.3.5.1	Box – Behnken	52
4.3.5.2	Factorial	53
4.3.6	Análisis de datos	54
CAPÍTULO V. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS		55
5.1	MATERIA PRIMA	55
5.1.1	Tamaño del ayrampo	55
5.1.2	Distribución del peso del ayrampo	56
5.1.3	Tamaño de semillas de ayrampo	57
5.1.4	Composición proximal de las semillas de ayrampo	57
5.1.5	Características fisicoquímicas de las semillas de ayrampo ..	58
5.2	CONTENIDO DE COLORANTE EN EL EXTRACTO	59
5.2.1	Para Box-Behnken	59
5.2.2	Para diseño factorial	60
5.3	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62
5.3.1	Diseño Box-Behnken	62
5.3.1.1	Para betacianinas	62

5.3.1.2	Para betaxantinas	63
5.3.1.3	Para betalaínas	63
5.3.2	Diseño factorial 3 ²	64
5.3.2.1	Para betacianinas	64
5.3.2.2	Para betaxantinas	66
5.3.2.3	Para betalaínas	67
5.3.2.4	Condiciones adecuadas de maceración para obtención del extracto colorante	69
5.4	PRODUCTO FINAL	70
5.4.1	Caracterización del producto final	70
5.4.2	Balance de materia del producto final	71
5.5	ESTABILIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE	72
5.5.1	Análisis estadístico	74
5.5.1.1	Retención de betacianinas	74
5.5.1.2	Retención de betaxantinas	75
5.5.1.3	Retención de betalaínas	76
	CONCLUSIONES	78
	RECOMENDACIONES	79
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Matriz de consistencia.....	11
Tabla 2. Operacionalización de variables	12
Tabla 3. Clasificación taxonómica del ayrampo	21
Tabla 4. Composición fisicoquímica del ayrampo.	21
Tabla 5. Diseño experimental para Box - Behnken.....	53
Tabla 6. Combinación de los factores.....	53
Tabla 7. Diseño experimental para diseño factorial	54
Tabla 8. Combinación de los factores.....	54
Tabla 9. Valores de diámetro y altura del ayrampo.....	55
Tabla 10. Distribución del peso del ayrampo	56
Tabla 11. Valores de diámetro y altura de semillas de ayrampo.....	57
Tabla 12. Composición proximal de las semillas	58
Tabla 13. Resultado fisicoquímico de las semillas.....	58
Tabla 14. Concentración de betacianinas, betaxantinas y betalaínas	60
Tabla 15. Concentración de betacianinas.....	61
Tabla 16. Concentración de betaxantinas.....	61
Tabla 17. Concentración de betalaínas	62
Tabla 18. Condiciones adecuadas de obtención del colorante.....	69

Tabla 19. Máxima concentración de betacianinas,	69
Tabla 20. Caracterización del extracto colorante de ayrampo	70
Tabla 21. Retención de betacianinas al mes de almacenamiento	73
Tabla 22. Retención de betaxantinas al mes de almacenamiento	73
Tabla 23. Retención de betalaínas al mes de almacenamiento.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tallos o pencas del ayrampo	19
Figura 2. Flores de ayrampo	20
Figura 3. Ayrampo	20
Figura 4. Clasificación de los colorantes.....	23
Figura 5. Columnas para lixiviación	32
Figura 6. Equipo de reflujo	33
Figura 7. Equipos de extracción continua	34
Figura 8. Aparato para extracción por arrastre	35
Figura 9. Lavado del ayrampo	44
Figura 10. Cortado del ayrampo	45
Figura 11. Obtención de semillas de ayrampo.....	45
Figura 12. Secado de las semillas de ayrampo.	46
Figura 13. Maceración de las semillas.....	47
Figura 14. Separación de los sólidos.	48
Figura 15. Semillas sin colorante.....	48
Figura 16. Centrifugado de los extractos de	49
Figura 17. Extracto colorante de ayrampo	49
Figura 18. Diagrama de flujo para obtención de extracto colorante.....	50

Figura 19. Procedimiento de investigación según Box-Behnken	51
Figura 20. Procedimiento de la investigación para factorial.....	52
Figura 21. Diagrama de Pareto estandarizado para betalaínas.....	64
Figura 22. Diagrama de Pareto Estandarizado para betacianinas.....	65
Figura 23. Gráfica de efectos principales para betacianinas.	65
Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para betaxantinas	66
Figura 25. Efectos principales para betaxantinas.	67
Figura 26. Diagrama de Pareto estandarizado para betalaínas.....	68
Figura 27. Efectos principales para betalaínas.	68
Figura 28. Balance de materia	71
Figura 29. Porcentaje de retención de betacianinas	75
Figura 30. Porcentaje de retención de betaxantinas.....	76
Figura 31. Porcentaje de retención de betalaínas	77

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Directiva 2008/128/CE de la comisión de las comunidades europeas	91
Anexo 2. Imágenes de recolección del ayrampo	93
Anexo 3. Imágenes de determinación del tamaño del fruto y semilla	94
Anexo 4. Imágenes de lectura espectrofotométrica a 538 y 483 nm	95
Anexo 5. Absorbancias de betacianinas y betaxantinas	96
Anexo 6. Fórmula para cuantificación de betacianinas y betaxantinas	97
Anexo 7. Cálculos para determinar concentración de betacianinas y betaxantinas	98
Anexo 8. ANVA para betacianinas, betaxantinas y betalaínas según diseño Box-Behnken	99
Anexo 9. ANVA para betacianinas, betaxantinas y betalaínas según diseño factorial	100
Anexo 10. Cálculo del porcentaje de pigmento retenido.....	101
Anexo 11. Resultados del % del pigmento retenido a 4°C y 18°C	102
Anexo 12. Prueba t para estabilidad de betacianinas, betaxantinas y betalaínas.....	103

RESUMEN

Para la obtención del extracto colorante se utilizó semillas secas de ayrampo, extraídas de los frutos que fueron recolectados de la provincia de Candarave, inicialmente se aplicó tres condiciones de maceración: tiempo (30, 60, 90 min), velocidad de agitación (0, 90, 180 rpm) y temperatura (20, 30, 40 °C). Se determinó estadísticamente que la temperatura no es significativa para las condiciones experimentales, por lo cual se vio por conveniente realizar otros ensayos para los factores significativos como son: tiempo (30, 35, 40 min) y velocidad de agitación (190, 195, 200 rpm), aplicándose un diseño factorial 3^2 . Estadísticamente resultó que las mejores condiciones de maceración para la mayor obtención de extracto colorante son: tiempo de 38,35 min y velocidad de agitación de 198,82 rpm a estas condiciones se obtienen: 177,927 mg de betacianinas/100 g, 69,073 mg de betaxantinas/100 g y 246,9 mg de betalaínas/100 g.

ABSTRACT

To obtain the coloring extract dry seeds of ayrampo were used, extracted from the fruits that were collected from the province of Candarave, initially three maceration conditions were applied: time (30, 60, 90 min), agitation speed (0, 90, 180 rpm) and temperature (20, 30, 40 ° C). It was statistically determined that the temperature is not significant for the experimental conditions, for which it was considered convenient to perform other tests for the significant factors such as: time (30, 35, 40 min) and agitation speed (190, 195, 200 rpm), applying a factorial design 32. Statistically it turned out that the best conditions of maceration for the greater obtaining of coloring extract are: time of 38,35 min and speed of agitation of 198.82 rpm to these conditions are obtained: 177,927 mg of betacyanins / 100 g, 69,073 mg of betaxanthines / 100 g and 246.9 mg of betalains / 100 g.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años hay una gran tendencia a restringir el uso de colorantes sintéticos debido a su posible toxicidad, lo que se refleja en los continuos cambios que se realizan en las legislaciones de alimentos. Como resultado de tales medidas ha aumentado el interés por los colorantes de origen natural como sustitutos, ya que hasta la fecha no hay evidencia de que su uso sea nocivo a la salud.

En la búsqueda de nuevas fuentes colorantes se encontró a las semillas del ayrampo, las cuales están recubiertas por materia colorante llamadas betalaínas y se divide en betacianinas y betaxantinas.

El ayrampo se encuentra de manera silvestre en la provincia de Candarave y es utilizado de forma artesanal como colorante. Sin embargo, es poca la importancia que se le ha dado, ya que este fruto puede ser considerado una fuente potencial de color, hecho que podría favorecer el nivel de vida y el desarrollo rural de los pobladores andinos de Candarave.

Por tal motivo la presente investigación tiene como objetivo determinar las condiciones de maceración que permitan la mayor obtención de extracto

colorante a partir de las semillas de ayrampo (*Opuntia soehrensii*) procedentes de la provincia de Candarave y de esta manera darle un criterio técnico a la obtención de este colorante natural.

El estudio consta de dos partes, en la primera parte se obtuvo extractos colorantes, siendo las condiciones de maceración el tiempo y la velocidad de agitación, en la segunda parte de la investigación se determinó la concentración de betacianinas, betaxantinas y betalaínas presentes en los extractos, determinándose así las mejores condiciones de maceración.

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos años el interés de los consumidores por la seguridad de los alimentos a llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir los colorantes artificiales por otros naturales, además existen estudios por el Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad Pública de Navarra (Ibáñez et al., 2003) que diversos colorantes sintéticos que se utilizan para colorear alimentos, causan posibles efectos adversos sobre la salud. Debido a esta problemática existen estudios de investigación sobre la obtención de colorantes naturales de diversas plantas que puedan ser una nueva alternativa para reemplazar a los colorantes sintéticos. En el Perú algunas empresas importantes como Gloria, utilizan colorantes naturales como el SIN 120 y SIN 160b, por tal motivo es de importancia dar a conocer otras alternativas de colorantes naturales que presenta la región de Tacna y que pueden ser utilizadas para colorear alimentos.

Las semillas del ayrampo tienen un gran potencial como colorante y son utilizadas tradicionalmente por la comunidad de la provincia de

Candarave para colorear sus productos artesanales como helados, refrescos, mazamoras y fibras de lana; sin embargo, ésta práctica en los últimos años se viene perdiendo debido a la falta de continuidad de esta tradición.

La obtención tradicional de los pigmentos de las semillas del ayrampo, se realiza por maceración en agua con un tiempo de reposo a temperatura ambiente y con agitación manual esporádica a criterio propio del que realiza la tarea; observándose que en los diferentes ensayos que realiza un poblador, que las tonalidades del color difieren entre sí, debido a que no hay uniformidad en las condiciones de maceración que se realizan para extraer los colorantes de las semillas, lo que motiva la preocupación de los que realizan este proceso de obtención artesanal, debido a la falta de criterio técnico con que se obtiene este extracto colorante.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Problema general

¿Qué condiciones de maceración permiten la mayor obtención de extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo (*Opuntia soehrensii*) procedentes de la provincia de Candarave?

Problemas específicos

- Qué tiempo permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.
- Que velocidad de agitación permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo

1.3 DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Delimitación Temporal

El estudio es transversal debido a que abarcó un periodo de 8 meses a partir del periodo productivo del ayrampo que es el mes de abril.

Delimitación Espacial

El presente trabajo, se realizó en los laboratorios de la Escuela de Industrias Alimentarias, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

Delimitación Teórica

La presente investigación se limitó a determinar las condiciones de maceración (tiempo y velocidad de agitación). Para evaluar el extracto colorante se determinó la concentración de betacianinas y betaxantinas para luego cuantificar las betalaínas.

Para complementar la presente investigación se realizó el análisis físico-químico de la materia prima. Para el extracto obtenido en las mejores condiciones de maceración se determinó el balance de materia y la caracterización fisicoquímica. Finalmente se evaluó la estabilidad de los extractos al mes de almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente.

1.4 JUSTIFICACIÓN

Actualmente hay un interés mundial en el aprovechamiento de los colorantes naturales. Debido a la necesidad de expandir la variedad de colorantes y por otro a la implicación de que son naturales y seguros para el consumo (Enriquez, 2005); por tal motivo es de importancia dar a conocer otras alternativas de colorantes naturales. Tal es el caso del ayrampo, del cual se tienen pocos estudios y la información que existe está muy dispersa, debido principalmente a que es un fruto silvestre, poco conocido y explotado. Sin embargo, este fruto puede ser considerado una fuente de color interesante, además existen estudios de que el ayrampo podría ser una fuente viable de obtención de pigmentos rojos para ser usados como colorantes naturales.

La presente investigación buscó mejorar la obtención artesanal del extracto colorante a partir de las semillas del ayrampo, de esta manera darle un criterio técnico a esta práctica realizada por los pobladores y

revalorar esta tradición que se viene perdiendo debido a la poca importancia que se le da a este fruto nativo que crece en la Región de Tacna, los cuales pueden ser usados como colorantes naturales para la industria alimentaria, hecho que podría favorecer el nivel de vida y el desarrollo rural de los pobladores andinos de Candarave.

Según, Soriano (2001), Gamarra, Chirinos y Campos (2004) coinciden que la obtención del colorante de ayrampo es a una relación de 1:3 con respecto a semilla y agua.

Lock (1997), Sánchez (2006) y Gamarra, Chirinos y Campos (2004), indican que el método usual de extracción de este tipo de pigmentos es por maceración los cuales se maceran por lo general en agua.

Según Enriquez (2005) para la gran mayoría de colorantes vegetales necesitan bajas temperaturas durante la extracción ya que son susceptibles a la degradación térmica y que el aumento de temperatura parece no tener un efecto notable en el proceso de extracción.

Enriquez (2005), Soriano (2001), Gamarra, Chirinos y Campos (2004) mencionan que las extracciones de este tipo de pigmentos se realizan con tiempos cortos de contacto con el solvente.

1.5 LIMITACIONES

Existe escasa información bibliográfica sobre el ayrampo especialmente en su composición química, taxonómica y de obtención de este colorante.

Las semillas de ayrampo procedentes de Candarave no se expenden en la ciudad de Tacna, por tal motivo se esperó su periodo de recolección, que fue en el mes de abril.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo General

Determinar las condiciones de maceración que permitan la mayor obtención de extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo (*Opuntia soehrensii*) procedentes de la provincia de Candarave.

1.6.2 Objetivos Específicos

- Determinar el tiempo de maceración que permita la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.
- Determinar la velocidad de agitación que permita la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.

CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1 HIPÓTESIS

2.1.1 Hipótesis General

El incremento de las condiciones de maceración aumenta la obtención de extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo.

2.1.2 Hipótesis Específicas

- El incremento del tiempo de maceración permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.
- El incremento de la velocidad de agitación permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.

2.2 VARIABLES

- a) Variable independiente: Condiciones de maceración.
- b) Variable dependiente: Extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo

2.2.1 Indicadores de las variables

Indicadores de la variable independiente:

- Tiempo de maceración

- Velocidad de agitación

Indicadores de la variable dependiente:

- Concentración de betacianinas
- Concentración de betaxantinas
- Concentración de betalaínas

2.3 MATRIZ DE CONSISTENCIA

Para el presente estudio se realizó la matriz de consistencia que se observa en la tabla 1.

2.4 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

A continuación, se presenta en la tabla 2 la operacionalización de variables la cual describe la definición conceptual y operacional de la variable dependiente e independiente y sus respectivas dimensiones, indicadores, unidades de medida y escala.

Tabla 1. Matriz de consistencia

TITULO: Obtención de extracto colorante por maceración a partir de las semillas de ayrampo (<i>Opuntia soehrensii</i>) procedentes de la provincia de Candarave							
Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Población y muestra	Diseño	Técnicas e instrumentos	Estadígrafo
<p>Problema Principal</p> <p>¿Qué condiciones de maceración permiten la mayor obtención de extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo (<i>Opuntia soehrensii</i>) procedentes de la provincia de Candarave?</p> <p>Problemas Secundarios</p> <p>- ¿Qué tiempo permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo?</p> <p>- ¿Qué velocidad de agitación permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo?</p>	<p>Objetivo General</p> <p>Determinar las condiciones de maceración que permitan la mayor obtención de extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo (<i>Opuntia soehrensii</i>) procedentes de la provincia de Candarave</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>-Determinar el tiempo que permita la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.</p> <p>- Determinar la velocidad de agitación que permita la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>El incremento de las condiciones de maceración aumenta la obtención de extracto colorante a partir de semillas de ayrampo.</p> <p>Hipótesis específicas:</p> <p>-El incremento del tiempo permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo</p> <p>-El incremento de la velocidad de agitación permite la mayor obtención del colorante de las semillas de ayrampo.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>-Condiciones de maceración</p> <p>Variable dependiente</p> <p>-Extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo</p>	<p>Población</p> <p>La población está compuesta por el ayrampo procedente de la Provincia de Candarave.</p> <p>Muestra</p> <p>Se utilizó 1 500 g de semillas de ayrampo que se distribuyeron en 750 g y 675 g para el diseño factorial</p>	<p>Tipo</p> <p>Experimental</p> <p>Diseño:</p> <p>Factorial 3²</p>	<p>Técnica:</p> <p>-Espectrofotométrica</p> <p>-Determinación de grasas por método Soxhlet</p> <p>-Determinación de humedad: A.O.A.C. (2005)</p> <p>-Determinación de proteínas por método de Kjeldahl</p> <p>-Determinación de pH por método potenciométrico.</p> <p>-Determinación de azúcares reductores (Método de Fehling):</p> <p>Instrumentos:</p> <p>-Espectrofotómetro UV/Vis</p> <p>-Baño maría</p> <p>-Agitador de paletas</p> <p>-Balanza</p> <p>-Refrigerador</p>	<p>-Análisis de varianza</p>

Tabla 2. Operacionalización de variables

Variables							
Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones		Unidad de medida	Escala/ Valor Final	
<ul style="list-style-type: none"> Condiciones de maceración 	<p>Consiste en mantener en contacto a temperatura ordinaria y durante un tiempo variable una cantidad determinada de la sustancia a la que se quiere extraer el componente con el volumen de disolvente prescrito. Se favorece la maceración con la agitación (Jover y García, 2004).</p>	<p>Es el tiempo y agitación en que las semillas de ayrampo deben permanecer en maceración sin que estas desprendan impurezas o retenga buena parte del colorante sin separar.</p>	Tiempo de maceración		Minutos (min)	De intervalo	
			Velocidad de agitación			Revoluciones por minuto (rpm)	30 35 40
<ul style="list-style-type: none"> Extracto colorante a partir de las semillas de ayrampo 	<p>El extracto es la fase líquida formada por el disolvente y el soluto que han sido solubilizados durante la extracción. (Aguado et al., 1999). El ayrampo contiene betalainas que actúan como pigmentos rojos (betacianinas) y amarillos (betaxantinas) (Soto, 2014).</p>	<p>Para evaluar el contenido de betalainas se cuantifica según lo descrito por Castellanos et al. (2008) convirtiendo las unidades de absorbancia en unidades de concentración (García et al., 2012).</p>	Betacianinas	Concentración de betacianinas	mg/g		Absorbancias a 538 nm
			Betaxantinas	Concentración de betaxantinas		mg/g	Absorbancias a 483 nm
			Betalainas	Concentración de betalainas			Absorbancias a 538 nm y 483 nm

CAPÍTULO III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1 CONCEPTOS GENERALES Y DEFINICIONES

3.1.1 Extracto

Es la fase líquida formada mayoritariamente por el disolvente y el soluto o solutos que han sido solubilizados durante la extracción (Aguado et al., 1999).

3.1.2 Maceración

Consiste en mantener en contacto a temperatura ordinaria y durante un tiempo variable una cantidad determinada de la sustancia a la que se quiere extraer el componente con el volumen de disolvente prescrito. El tiempo de duración de la maceración es variable y, según los casos, se encuentra indicado. La maceración es recomendable para la extracción de aquellas sustancias que tienen principios activos muy solubles o que se alteren con el calor. Se favorece la maceración con la agitación (Jover y García, 2004).

3.1.3 Residuo

También denominado agotado o refinado. Se trata de un sólido humedecido formado por todos los sólidos que no se han disuelto, aunque

también incorpora parte de la disolución que ha quedado adherida a las partículas sólidas (Aguado et al., 1999).

3.1.4 Métodos espectrofotométricos

Son métodos cuantitativos, de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y, según sea la radiación utilizada, como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta e infrarroja. Asimismo, se refiere a la medida de cantidades relativas de luz absorbida por una muestra, en función de la longitud de onda (García et al., 2012).

3.2 ENFOQUES TEÓRICOS - TÉCNICOS

3.2.1 Características generales del ayrampo

Ayrampo o ayrampu es el nombre propio de una cactácea alto andina y de tolares, en cojín y con semillas rojas, *Opuntia soehrensii*, y consigna la materia colorante roja que producen los frutos (Villagrán y Castro, 2004).

El ayrampo, es el nombre común de la *Opuntia soehrensii* (familia cactaceae), es una planta herbácea pequeña, perenne, de tallos o pencas aplanadas, ovoides; sus frutos son pequeñas bayas carnosas, que cuando están en el periodo de maduración son de color rojizo o vinoso, muy jugoso,

de sabor ligeramente dulce, conteniendo muchas semillas ricas en materia colorante. En el Perú, se le encuentra al estado silvestre en los andes (Ayacucho, Apurímac y Junín) de donde es originaria (Lock, 1997).

Es un cacto espinoso que pertenece a la familia cactácea se conoce como ayrampu en aymará y achupalla en quechua; la cual es de forma de la tuna, en la cual se encuentran las semillas de color carmesí, este pequeño cacto no requiere condiciones para desarrollar, crecen en los cerros en forma silvestre, tiene espina menuda y delgada, se mantiene en una temperatura fresca. La parte que se emplea es el fruto, su recolección se realiza en los meses de marzo y abril (Zenteno, 2004, citado en Huayta,2016).

Esta planta crece en suelos sueltos, arenosos, calcáreos en tierras marginales y poco fértiles, superficiales, pedregosos, caracterizándole una amplia tolerancia edáfica; sin embargo, los suelos altamente arcillosos y húmedos no son convenientes para su cultivo. Crece desde el nivel del mar hasta los 3000 m.s.n.m., alcanzando su mejor desarrollo entre los 1700 y 2500 m.s.n.m. (Sarmiento, 2003, citado en Soto, 2014). Su reproducción se efectúa por medio de semillas o por propagación agámica (asexual) o también denominada "propagación por pencas", este último es el más

común y consiste en plantar o enterrar pencas (Soto, 2014). Según el INEI (2015) la provincia de Candarave está a una altura de 3 460 msnm y el ayrampo proveniente de esta provincia se desarrolla bien a esta altitud.

Los frutos son empleados por los artesanos textiles, para el teñido de fibras de lana; en alimentos sirve para dar color a dulces, mazamorras, refrescos y otros postres. En el Perú, se le encuentra al estado silvestre en los andes (Ayacucho, Apurímac, Junín) de donde es originaria (Lock, 1997).

3.2.2 Usos del ayrampo

El ayrampo todavía sin uso industrial, es también un colorante del fruto de un pequeño cactus de la misma familia de la tuna. A pesar de ello estas frutas son escasamente comercializadas, se aprovechan sólo a nivel local rara vez llevan hasta los mercados urbanos (Lock, 1997).

3.2.2.1 Alimentaria

La mayoría de los frutos de las cactáceas y sobre todo del ayrampo se extrae pigmentos betaciánicos usados como colorantes de alimentos (Huayta, 2016). Las semillas son usadas para darle color a dulces, mazamorras, refrescos y otros postres (Lock, 1997). El ayrampo se utiliza para preparar algunos alimentos como: mazamorras, chichas (denominados “ponches” en Puquio y Apurímac), jugos e incluso bebidas

fermentadas, entre otros. Existen versiones de adultos mayores que, el puca picante, plato típico ayacuchano, se elaboraba antiguamente con ayrampo antes de que se introdujese la betarraga en su preparación (Godenzi, 2013).

3.2.2.2 Textilería

Aún en la actualidad muchas de las comunidades nativas del Perú nuestro y de otros países utilizan diversas plantas en el teñido artesanal, especialmente en la fibra y lana (alpaca, oveja), utilizando las semillas de ayrampo (Lock, 1997).

3.2.2.3 Medicinal

El ayrampo es utilizado en afta de los niños, viruela, lavado de heridas, fiebre y contra las hemorragias nasales (Huayta, 2016). Su empleo es recomendado para casos de fiebre interna, infección de las vías urinarias, contra el reumatismo, afecciones pulmonares, presión arterial elevada y para el tratamiento de úlceras de estómago (Zenteno, 2004).

3.2.3 Beneficios del ayrampo

El ayrampo contiene altos porcentajes de betalainas cuya actividad antioxidante es vinculada con la actividad anticancerígena. Si bien la

betarraga ha sido incluida entre los 10 vegetales con mayor poder antioxidante, hay evidencia creciente de una poderosa actividad del fruto de ayrampo (Morales, 2007). El ayrampo contiene betalaínas (metabolitos secundarios de las plantas nitrogenados que actúan como pigmentos rojos y amarillos). Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles con buenas características tecnológicas para ser utilizados en productos lácteos, bebidas, confitería y helados, ya que imparten coloraciones que van del rojo al amarillo. Además, su uso está aprobado desde 1960 por la FDA y en México la Secretaría de Salud permite su aplicación en alimentos y cosméticos (Godenzi, 2013).

3.2.4 Descripción morfológica

Esta planta está constituida por unas 2000 especies originarias de las regiones tropicales y templadas de América del sur. Normalmente se distribuyen en zonas muy diversas, aunque predominantemente áridas, serranas y montañas, son plantas perennes (Solano, 1998 citado en Huayta, 2016).

3.2.4.1 Tallos o pencas

Suculentos, continuos o articulados (conformando segmentos o cladodios), ovoides, planos, angulosos, presentando en su superficie

protuberancias longitudinales llamadas costillas, en las que se encuentran distribuidas una serie de protuberancias llamadas aréolas, elípticas o circulares, donde nacen las ramas, flores, espinas (Solano, 1998 citado en Huayta, 2016). Las pencas del ayrampo se observan en la figura 1.



Figura 1. Tallos o pencas del ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017).

3.2.4.2 Flores

Estambres numerosos dispuestos en espiral. Ovario ínfero (Solano, 1998). Flores amarillas, anaranjadas o rojas de unos 4 cm de diámetro con estilo verde (Kiesling et al., 2011). Las flores del ayrampo se observan en la figura 2.



Figura 2. Flores de ayrampo
Fuente: Huayta (2016)

3.2.4.3 Frutos

Es una baya carnosa de forma esférica (Solano, 1998 citado en Huayta, 2016). Además, cita que estas semillas se encuentran recubiertas por un tejido parenquimatoso que contiene el colorante, que representa el 3,5% de la muestra (pepa más pulpa). El ayrampo se observa en la figura 3.



Figura 3. Ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)

3.2.5 Clasificación taxonómica

Se describe la clasificación taxonómica en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación taxonómica del ayrampo

Reino	Vegetal
División	Antofitas
Clase	Dicotiledóneas
Orden	Opuntiales cactaceales
Familia	Cactáceas
Género	Opuntia
Especie	<i>Opuntia soehrensii</i>
Nombre	Ayrampo

Fuente: (Tipe, 1989, citado en Godenzi, 2013)

3.2.6 Composición del ayrampo

Se describe la composición fisicoquímica del ayrampo en la tabla 4.

Tabla 4. Composición fisicoquímica del ayrampo.

Determinación	%
Humedad.	21,2
Ceniza	10,2
Fibra neta	6,1
Grasa cruda	1,7
Proteínas (N x 6,25)	6,8
Azúcares reductores	6,7
Colorante bruto	23,6
Pepa (sin colorante)	23,7

Fuente: (Tipe, 1989, citado en Godenzi, 2013)

3.2.7 Colorantes

La primera sensación percibida en un alimento, que incluso influye sobre el sabor y el olor, es el color. Pero los alimentos naturales poseen un

color que varía tanto con la estacionalidad de la materia prima como con los tratamientos tecnológicos aplicados en su procesado. Así que para hacerlos atractivos a los consumidores deben colorearse artificialmente.

Más aún, el coloreado puede condicionar el éxito o fracaso comercial de un producto. Para ello se pueden utilizar sustancias obtenidas de fuentes naturales o preparadas por métodos físicos o químicos. Pero no todas las sustancias colorantes son adecuadas con fines alimentarios, ya que algunas incluso pueden resultar perjudiciales para la salud. Actualmente, y en la medida de lo posible, se recurre a colorantes naturales en lugar de sintéticos, ya que existe una presión importante por parte de los consumidores (Ibáñez et al., 2003).

3.2.7.1 Clasificación de los colorantes

De acuerdo con su origen y procedencia, los colorantes son obtenidos de fuentes naturales, ya sean microorganismos, vegetales, animales o minerales y aquellos producidos por síntesis química (Sintéticos) incluyendo a los colorantes semejantes a los naturales (Enriquez, 2005). En la figura 4 se observa la clasificación de los colorantes.

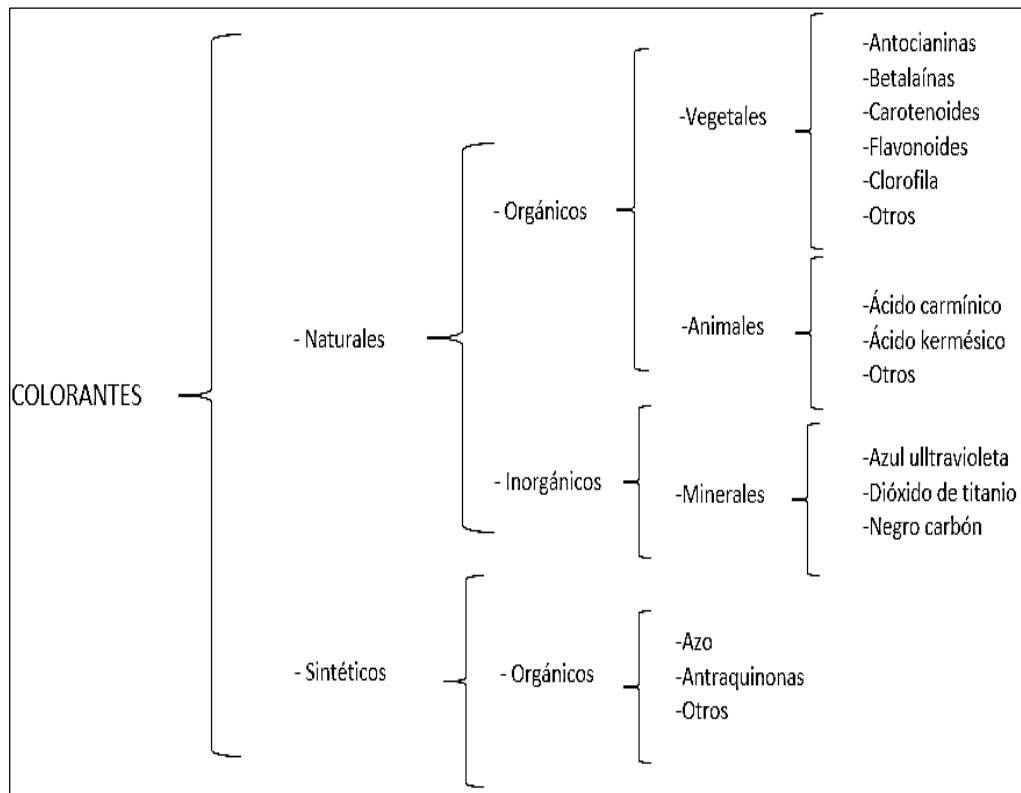


Figura 4. Clasificación de los colorantes
Fuente: Quintero (1993), citado en Enriquez, 2005.

3.2.7.2 Colorantes Naturales

Los colorantes se clasifican en colorantes orgánicos e inorgánicos el primero se dividen en vegetales y animales, el segundo en inorgánicos los cuales se detallan a continuación:

A. Orgánicos: Se dividen en vegetales y animales

a) Vegetales: Estos colorantes están contenidos en las distintas partes de los vegetales, como son las raíces, cortezas, partes

leñosas, hojas, flores, frutos, semillas, resinas y extractos, por lo tanto, estas son las fuentes naturales de las que se extraen los colorantes vegetales (Ojeda, 1992, citado en Enriquez, 2005).

- Antocianinas: Son derivados del benzopireno que presentan coloraciones rojas y azules. Se extraen de diversas frutas (fresas, cerezas, etc.) y flores (Contento, 1997). En términos generales se trata de sustancias relativamente inestables que se decoloran con facilidad, principalmente por el efecto de la luz. Son estables en medios ácidos (pH bajo) por lo tanto deben almacenarse en estas condiciones (Enriquez,2005)

- Carotenoides: Son los responsables del color rojo amarillo y naranja de una gran variedad de plantas y animales, tales como zanahoria, tomates, aceite de palma, salmón (Contento, 1997).

- Betalaínas: Se encuentra en plantas de la familia de los centroespermae. Los colores van del rojo al amarillo (Contento, 1997). Este colorante resiste bien las condiciones ácidas, se altera fácilmente con el calentamiento, pasando su color a marrón. No se conoce los efectos nocivos de este colorante, se

absorbe poco en el tubo digestivo y la OMS no ha fijado un límite a la dosis admisible (Enriquez,2005).

– Clorofilas: Son los pigmentos de coloración verde presentes en todas las plantas verdes. Estos son sin duda los más abundantes. (Contento, 1997).

b) Animales: Dentro de este grupo se encuentra la cochinilla (E-120), considerado como el mejor de los colorantes naturales. Antiguamente, se extraía con agua caliente y el extracto se comercializaba con el nombre de carmín de cochinilla (Pérez, 2004, citado en Enriques, 2005). El monascus es un colorante natural, de origen microbiano que no figura en la lista positiva de colorantes permitidos en la unión europea ni tampoco en la de Estados Unidos. Puede presentar tonalidades del amarillo al rojo (Pérez, 2004, citado en Enriques,2005).

B. Inorgánicos

a) Minerales: Entre los principales colorantes minerales tenemos: los colorantes de cadmio, cobre, cromo, plomo y zinc, este tipo de colorante han sido prohibidos debido a la toxicidad que presentan (Ojeda,1992, citado en Enriquez,2005).

3.2.7.3 Colorantes Sintéticos

Los colorantes artificiales se los obtiene por síntesis química. Actualmente se conocen más de 3000, aunque la lista de los utilizados en alimentación es muy reducida a menos del 10% del total (Enriquez, 2005).

Astiasarán, Lasheras, Ariño y Martínez (2003) mencionan que las ventajas de los colorantes sintéticos frente a los naturales hacen que, a pesar de la fuerte tendencia a lo natural por la que se inclina la sociedad, todavía se sigan empleando los sintetizados en el laboratorio. Estas ventajas se pueden resumir en:

- Proporcionan una mayor intensidad de coloración, por lo que se requiere menor cantidad para obtener el mismo efecto.
- Suministra una mayor gama de colores.
- Son más estables a la luz, al pH y a la temperatura.

Sin embargo, se puede afirmar de forma genérica que la mayoría de los colorantes de síntesis presentan problemas de toxicidad a altas dosis, por lo que sus dosis de empleo están siendo restringidas. En la actualidad existe una tendencia en la industria alimentaria a emplear más los colorantes naturales (Astiasarán et al., 2003).

3.2.8 Materia colorante de las semillas de ayrampo

La materia colorante de este fruto, se encuentra bordeando a las pepitas. De la mayoría de los frutos de las cactáceas y sobre todo el ayrampo se extrae pigmentos betaciánicos usados como colorantes de alimentos (mazamorras, bebidas refrescantes), el fruto se adiciona de forma directa (Gamarra, 2003 citado en Huayta, 2016). Las semillas son usadas para darle color a dulces, mazamorras, refrescos y otros postres (Lock, 1997).

Las betalaínas son los pigmentos más importantes presentes en el ayrampo y comprenden a las betacianinas de color rojo violeta y las betaxantinas de color amarillo. El rojo del ayrampo está constituido por las betacianinas (Tipe y Looock (1990), citado en Huaranga, 2014). La betanina o colorante E-162 es autorizada por la comisión de las comunidades europeas como aditivos alimentarios, el cual establece los criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios, los cuales se observan en el anexo 1.

3.2.8.1 Betalaínas

Las betalaínas son compuestos orgánicos solubles en agua, con peso molecular entre 400 y 500. La estructura de las betalaínas es diferente a la de otros pigmentos encontrados en el reino vegetal, ya que ésta contiene

nitrógeno. A la fecha se conocen unas setenta betalaínas y todas ellas poseen la misma estructura básica, formada por la condensación de una amina primaria o secundaria como el triptófano y un aldehído llamado ácido betalámico. Las betalaínas están formadas por dos tipos de pigmentos, los rojo-violeta denominados betacianinas y los amarillos denominados betaxantinas (Fennema, 1995). Franco (2004) menciona que una de las principales características de las betalaínas es que absorben fuertemente la luz y se ha observado que las betacianinas exhiben un máximo de absorción de luz aproximadamente a 537- 538 nm.

Las betaxantinas son productos de condensación de este ácido con aminas o aminoácidos y abarcan las tonalidades amarillas a naranjadas (López, 2014). Con respecto a las betaxantinas, se tienen pocos datos ya que han sido poco estudiadas, debido principalmente a que son más difíciles de aislar, pero se tienen indicios de que son mucho más lábiles que las betacianinas. La primera betaxantina aislada y caracterizada fue la indicaxantina por Piatelli y Minale en 1964 a partir de los frutos del cactus *Opuntia ficus-indica*. Estructuralmente las betaxantinas son muy semejantes a las betacianinas, solo difieren de ellas en que el grupo indol es sustituido por un aminoácido.

Las betacianinas pueden presentar diferentes sustituyentes y proporcionan los colores rojo y violeta, siendo la betanina la más conocida (Lopez,2014). En la familia Cactaceae la betanina es la betacianina que se encuentra en mayor cantidad. La betacianina más abundante en el betabel es la betanina y se encuentra en una proporción de 75% a 95% del total de betalaínas y es la más estudiada a la fecha (Franco, 2004).

3.2.8.2 Estabilidad de las betalaínas

La termolabilidad de las betalaínas es probablemente el factor que más restringe su uso como colorante de alimentos. La exposición de las betalaínas a luz también produce su degradación. Estudios realizados a los extractos de ayraimo han demostrado que la estabilidad mayor se encuentra a pH 4,0 y 5,0. El agregado de aditivos antioxidantes, previene en cierto modo la degradación del colorante, habiéndose encontrado mejores resultados con ácido tartárico (0,15%), benzoato de sodio (0,15%), ácido cítrico (0,15%) y galato de propilo (0,01 %) (Lock, 1997).

3.2.9 Extracción de colorantes

Para la extracción de colorantes se debe buscar el método más práctico con miras a una posible producción industrial, tomando en cuenta las siguientes condiciones (Enriquez, 2005):

- Recuperación máxima del colorante para un mejor aprovechamiento de la materia prima.
- Concentración elevada de los extractos, lo que redundará en un menor gasto de solvente por unidad de peso del material y ahorro en las operaciones de evaporación y filtración.
- Baja o nula toxicidad del solvente empleado para garantizar la seguridad del personal en las operaciones de extracción y porque el producto está destinado al consumo humano.
- Bajo contenido de impurezas, o bien, que estas sean de fácil remoción.

3.2.9.1 Métodos de extracción de colorantes

La producción de los colorantes naturales, se basa en procesos de extracción. Esto es evidente, ya que las patentes registradas para colorantes, casi en todas, el proceso de obtención del pigmento es por medio de extracción (García et al., 2004). A continuación, se mencionan los siguientes métodos extractivos:

a) Extracción por Maceración

El proceso de maceración consiste en remojar el material a extraer, con un disolvente apropiado, hasta que este penetre en los tejidos

ablandando y disolviendo las porciones solubles. En un recipiente que no se ataque con el disolvente (preferentemente de vidrio), se coloca el material a extraer y se cubre con el disolvente elegido. Se tapa y se deja en reposo, con agitación esporádica. Posteriormente se filtra el líquido y si el material aun contuviera las sustancias de interés, se repite el proceso con disolvente fresco (puro) tantas veces como sea necesario (Lamarque et al., 2008).

b) Lixiviación o percolación

La extracción sólido-líquido también llamada lixiviación, es el retiro de una fracción soluble en forma de solución a partir de una fase sólida permeable e insoluble con que se asocia. La separación implica la disolución selectiva con difusión o sin ella. El lavado, consiste sólo en el desplazamiento de un líquido intersticial por otro con el que es miscible. El constituyente soluble puede ser sólido o líquido y estar incorporado, combinado químicamente o absorbido o bien, mantenido mecánicamente en la estructura porosa del material insoluble (Solís et al., 2001). El equipo para lixiviación se observa en la figura 5.

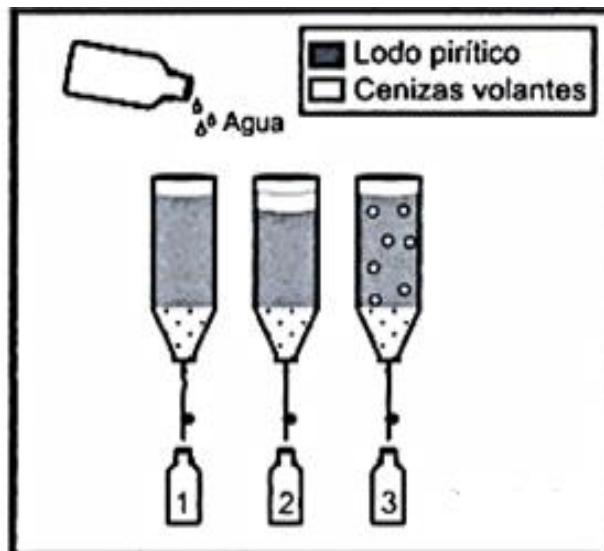


Figura 5. Columnas para lixiviación
Fuente: Pérez et al. (2005)

c) Reflujo

En este proceso, el material fragmentado disuelto en un disolvente convenientemente escogido, se somete a ebullición. Debido a que un calentamiento prolongado de la solución podría conducir a la evaporación total del solvente, se utiliza un equipo de reflujo que consta de un balón de destilación y un refrigerante.

La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o

descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque et al., 2008). El equipo para reflujo se observa en la figura 6.

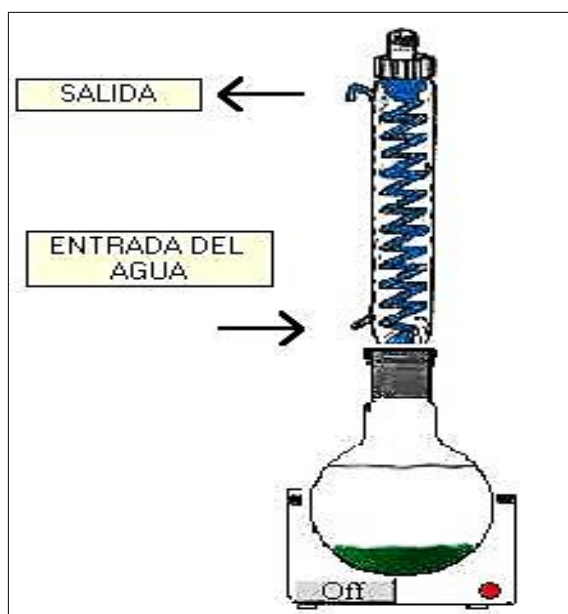


Figura 6. Equipo de reflujo
Fuente: Lamarque et al. (2008)

d) Extracción continua

Frecuentemente, el soluto que se requiere extraer forma emulsiones difíciles de romper, o bien, un soluto orgánico puede ser más soluble en agua que en un disolvente orgánico, por lo que se recurre a la extracción continua (Chen et al., 2014). Los equipos de extracción continua se observan en la figura 7.

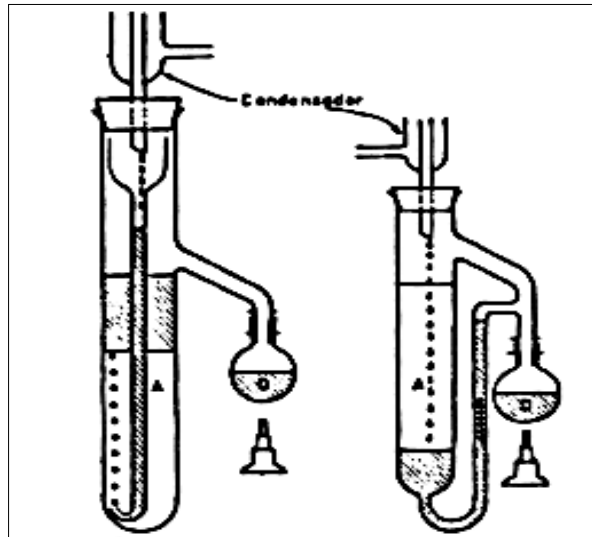


Figura 7. Equipos de extracción continua
Fuente: Valcárcel y Gómez (1988)

e) Extracción por arrastre con vapor de agua

La extracción por arrastre con vapor se emplea para extraer la mayoría de los aceites esenciales es una destilación de mezcla de dos líquidos inmiscibles y consiste, en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua, el cual ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición por adición de tensión de vapor, del vapor que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen del cuello de cisne se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos

inmiscibles, agua, aceite esencial y, finalmente, se separan en un decantador o vaso florentino (Bagué y Álvarez, 2012). El aparato para extracción por arrastre con vapor de agua se observa en la figura 8.

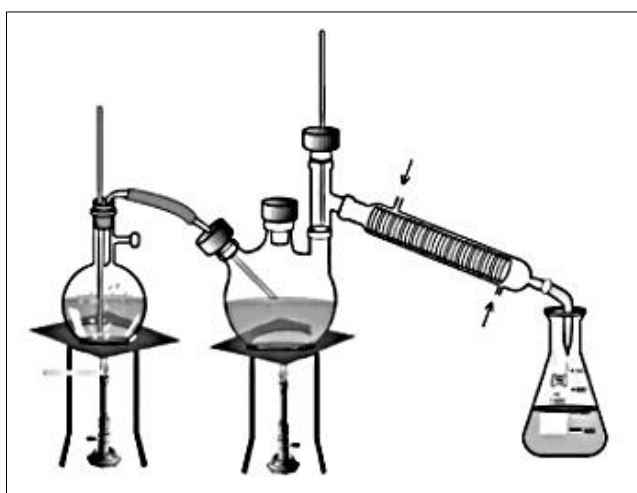


Figura 8. Aparato para extracción por arrastre con vapor de agua
Fuente: Chen et al. (2014)

3.2.9.2 Factores que determinan la extracción del colorante

Las semillas de ayrampo es materia prima óptima para la recuperación de un colorante natural de tono rojizo, mediante el uso del solvente universal (agua) y que es apta para la industria alimentaria y su consumo masivo. La recuperación de este colorante en base a la utilización de agua está en función a variables y parámetros medibles como tiempo de contacto, temperatura de trabajo y agitación del medio de mezcla (Soriano, 2001). Estos factores de extracción se describen a continuación:

- Solvente: El líquido escogido debe ser selectivo y con baja viscosidad, generalmente se usa solvente en estado puro. El solvente debe ser eficaz y económico, generando mayores rendimientos a un bajo costo. Los principios activos de las plantas son extraídos principalmente con etanol para sus posteriores estudios y utilidades. Sin embargo, el agua ha sido desde siempre el mejor solvente al considerar su poder de extracción en fase sólido- líquido (Ullauri, 2010). La mayor eficiencia en el proceso se logra cuando se trabaja con una relación de cantidad de semilla a volumen de solvente de 1:3 (Devia y Saldarriaga, 2003).
- Temperatura: En la mayoría de los casos la solubilidad del material que está siendo extraído, se incrementa con la temperatura, aumentando la velocidad de extracción, sin embargo, la gran mayoría de colorantes vegetales necesitan bajas temperaturas durante la extracción ya que son susceptibles a la degradación térmica (Enriquez, 2005).
- Tiempo de maceración: El tiempo es otra de las variables que se debe considerar en el proceso, porque es necesario determinar cuánto tiempo deben permanecer las semillas para retirar la máxima cantidad de colorante, sin que éstas comiencen a desprender impurezas o quede buena parte de colorante sin separar (Devia y Saldarriaga, 2003). Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario,

no influye en el proceso negativamente, pero sí influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesario, lo que acarrea un encarecimiento del proceso (García, 2012).

- Agitación del sistema: La agitación del solvente es importante, incrementa la difusión de la masa en el líquido, aumentando la transferencia de masa (Ullauri, 2010). La velocidad de agitación es otro parámetro importante, porque a bajas velocidades se obtiene un mayor rendimiento, el cual se fija como un parámetro definido por las características del agitador (Devia y Saldarriaga, 2003).

3.2.10 Método para cuantificación de betalaínas

El contenido de betacianinas y betaxantinas se cuantifica según lo descrito por Castellanos et al. (2008) mediante la medición de la absorbancia de los extractos de betalaínas a 538 y 483 nm en un espectrofotómetro UV/Vis., para la conversión de las unidades de absorbancia en unidades de concentración se utiliza la expresión: $B(\text{mg/g}) = (A \times FD \times PM \times V) / (\epsilon \times P \times L)$, donde B es betacianinas o betaxantinas, A es la absorbancia a 538 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas, FD es el factor de dilución al momento de leer en el espectrofotómetro, PM es el peso molecular (betanina = 550 g/mol e indicaxantina = 308 g/mol), V es el volumen del extracto, ϵ es el coeficiente de extinción molar (betanina =

60 000 l/molxcm, e Indicaxantina = 48 000 l/molxcm) y L es la longitud de la celda (1 cm) y para determinar el contenido de betalaínas se suma las concentraciones de betacianinas y betaxantinas (García, Salinas y Valle-Guadarrama, 2012).

3.3 MARCO REFERENCIAL

Para el presente trabajo se hallaron los antecedentes referidos a la obtención de colorantes naturales de ayrampo que servirán de apoyo para justificar la propuesta de cómo se realizará la investigación:

Soriano, R. (2001), en su Tesis titulada “Obtención de colorante natural de ayrampo (*Opuntia soehrensii*)”, realizó la extracción a nivel de laboratorio a partir de materia prima (semillas de ayrampo procedentes de Bolivia) y agua tratada, los mejores resultados de extracción fueron a una proporción de 1 a 3 a una temperatura de 30 °C y con una agitación de recipiente de trabajo de 180 rpm (revoluciones por minuto) con un tiempo de contacto soluto – solvente de 15 a 30 minutos, con una recuperación de 28,5% del peso total de semilla.

Gamarra, Chirinos y Campos (2004), en su trabajo de investigación titulado “Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y betaninas en extractos acuosos de ayrampo (*Opuntia soehrensii* Britton &

Rose) y evaluación de su estabilidad”, para la extracción acuosa del colorante de las semillas de ayrampo, trabajaron con semillas provenientes del departamento de Arequipa, previamente seleccionadas y congeladas, para la extracción se empleó agua destilada en una relación de materia prima : agua de 1:3 y se dejó en reposo a temperaturas de 4 y 30 °C con tiempos de 0, 6, 12 y 24 horas, posteriormente las muestras fueron filtradas. Estadísticamente resultó un mayor contenido de betaninas mediante la extracción a 30 °C y sin maceración (tiempo cero) los cuales dieron los mejores resultados.

Copa R. (2011), en su Tesis titulada “Elaboración de helado artesanal a base de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) – soya (*Glicine max*) y ayrampo (*Opuntia soehrensii*)”, obtuvo extracto de las semillas de ayrampo utilizando solo variables fijas como solvente agua a una temperatura de 43 °C por 10 min y en reposo.

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El diseño de esta investigación es del tipo experimental, debido a que se manipula la variable independiente y esta tiene un efecto en la variable dependiente pues es una relación causa – efecto.

4.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

La población está compuesta por 7 890,8 g de ayrampo procedentes de la Provincia de Candarave de donde se obtuvieron 750 g de semillas secas para el diseño Box-Behnken y 675 g de semillas secas para el diseño factorial.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1 Materiales

- a) Materiales de laboratorio e insumos
 - Materia prima: semillas de ayrampo de la Provincia de Candarave.
 - Agua destilada.
 - Piceta.
 - Probeta graduada de 100 ml.

- Matraz erlenmeyer de 250 – 500 ml.
- Filtrador metálico.
- Probetas de 10 - 100 ml.
- Botellas de vidrio, color ámbar.
- Tubos de ensayo.
- 2 celdas para espectrofotómetro.
- Tablas de picar.
- Cuchillos.
- Vasos de precipitados de 250 ml.
- Balón Kjeldahl.
- Espátulas.
- Termómetro.

b) Equipos

- Espectrofotómetro UV-Visible. Marca HEWLETT PACKARD. Alemania.
- Agitador de paletas: Marca Heidolph. Modelo: RZR 2 051. Alemania.
- Baño maría. Marca CIMATEC S.A.C. Temperatura desde 20 °C hasta 120 °C. Alemania.
- Equipo Soxhlet: Marca LAB-LINE. USA.
- Estufa: Marca MEMMERT. Alemania.

- Mufla: Marca THERMOLYNE. USA.
- Potenciómetro digital. Marca METROHM.
- Cocinilla eléctrica. Thermolyne. Type: 2 200. USA.
- Vernier o “pie de rey”.
- Campana-Extractor de gases: Marca: CRUMA Modelo: Captair. USA.
- Centrífuga: Marca: SELECTA. Capacidad: 9 000 rpm. Alemania.
- Secador de cajones: Alemania.
- Refrigeradora doméstica: Marca INRESA.

c) Reactivos

- Reactivo Folin – Ciocalteau.
- Ácido tánico.
- Carbonato de sodio.
- Rojo de metilo.
- Bencina.
- Solución de ácido sulfúrico al 0,10 N.
- Ácido clorhídrico.
- Solución de ácido bórico 4%.
- Solución de Fehling A.
- Solución de Fehling B.

- Solución de glucosa anhidra.
- Solución de hidróxido de sodio al 0,0906 N.

4.3.2 Métodos de análisis

4.3.2.1 Materia prima

Se realizó la caracterización fisicoquímica de las semillas de ayrampo como se detalla a continuación:

- Acidez titulable: Método NTP 205 039 (1975).
- pH: Método NTP 209 059 (1974).
- Humedad: método por la A.O.A.C. (2005).
- Cenizas: Método por la A.O.A.C. (2005).
- Fibra: NTP 205 003 (1980).
- Proteínas: Método de micro Kjeldahl por la A.O.A.C. (2005).
- Grasas: Método Soxhlet por la A.O.A.C (1984).
- Sólidos solubles: Método refractométrico.

4.3.2.2 Colorante

- Betalaínas: Método descrito por Castellano et al. (2008).
- Betacianinas: Método descrito por Castellano et al. (2008).
- Betaxantinas: Método descrito por Castellano et al. (2008).
- Azúcares reductores: Método de Fehling.

- Azúcares totales: Método del fenol sulfúrico.
- Fenoles totales: Método Folin – Ciocalteau.

4.3.3 Diseño procedimental

4.3.3.1 Procedimiento para la obtención de extracto colorante

En la figura 18 se muestra el diagrama de flujo para la obtención del extracto colorante de ayrampo y el cual se describe a continuación:

a) Ayrampo

Se recolectó el mes de abril 8 kilos de ayrampo del cerro Antavilca de la provincia de Candarave, como se observa en las imágenes del anexo 1.

b) Lavado

Los frutos se lavaron con abundante agua para eliminar el polvo adherido en la superficie, como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Lavado del ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)

c) Cortado

Una vez lavado los frutos se retiró la cáscara, esta operación se realizó de manera manual con cuchillos, efectuando un corte longitudinal en el fruto, como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Cortado del ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)

d) Obtención de semillas

Luego de retirarles las cáscaras se procedió a extraer las semillas con la ayuda de una espátula, como se observa en la figura 11.



Figura 11. Obtención de semillas de ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)

e) Secado de semillas

Las semillas extraídas fueron previamente secadas en un secador de cajones por 1 hora y 20 minutos a 45 °C para evitar la degradación del pigmento, como se observa en la figura 12. La humedad de las semillas después del secado fue de 11,16%.



Figura 12. Secado de las semillas de ayrampo.
Fuente: Elaboración propia (2017).

f) Maceración

La maceración se realizó con semillas de ayrampo sin triturar, debido a que presentan un diámetro de 1,17 mm y el colorante se encuentra bordeando a las semillas. Las semillas de ayrampo se colocaron en un vaso de precipitado con agua destilada con una relación de semilla - solvente 1:3, después se llevó a baño maría a temperatura de 20 °C y se agitó la

muestra con un agitador de paletas, para la extracción del colorante se trabajó a diferentes tiempos y velocidades de agitación. Se cubrió el vaso de precipitado con papel aluminio para protegerlos de la luz, como se observa en la figura 13.



Figura 13. Maceración de las semillas de ayrampo con agitación.
Fuente: Elaboración propia (2017).

g) Filtrado

Se separó el extracto colorido del material sólido haciendo una filtración por gravedad en un filtro metálico de 0,25 mm de diámetro, como se observa en la figura 14.

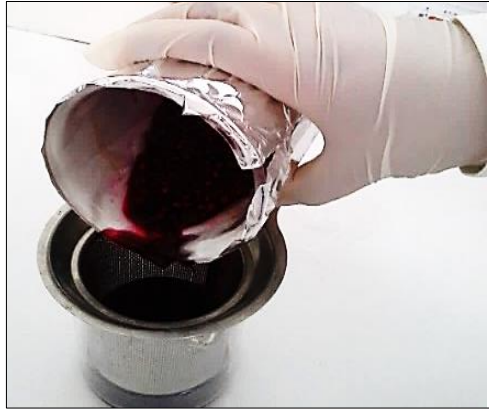


Figura 14. Separación de los sólidos.
Fuente: Elaboración propia (2017).

h) Lavado

Luego del filtrado se les extrajo el remanente del colorante que quedó en las semillas mediante un lavado en una porción del 53% de solvente con respecto a la relación inicial, luego se procedió a juntar los dos filtrados. Las semillas de ayrampo, luego del lavado se observa en la figura 15.



Figura 15. Semillas sin colorante.
Fuente: Elaboración propia (2017).

i) Centrifugado

El conjunto se centrifugó a 3 500 rpm durante 15 minutos para eliminar las partículas que pudieron pasar a través del filtro como se muestra en la figura 16, luego el extracto obtenido se llenó en frascos de vidrio color ámbar como se observa en la figura 17.



Figura 16. Centrifugado de los extractos de ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)



Figura 17. Extracto colorante de ayrampo
Fuente: Elaboración propia (2017)

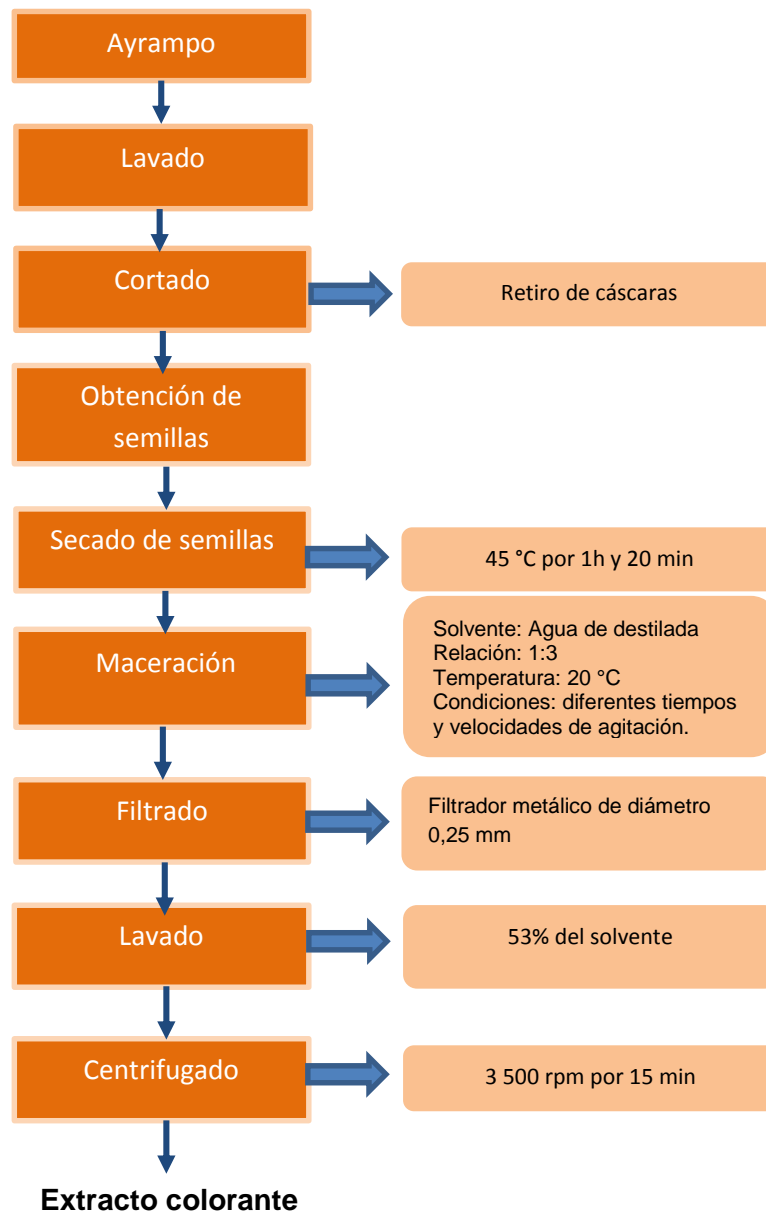


Figura 18. Diagrama de flujo para obtención de extracto colorante de ayrampo.
Fuente: Elaboración propia (2017).

4.3.4 Procedimiento de la investigación

El procedimiento de investigación consistió en macerar las semillas de ayrampo aplicando tres condiciones de maceración como: temperatura, velocidad de agitación y tiempo, obteniéndose así extractos colorantes para evaluarlos y así determinar las mejores condiciones de maceración. Para el diseño factorial se siguió el mismo procedimiento, pero se aplicó dos condiciones de maceración: tiempo y velocidad de agitación, como se observan en las figuras 19 y 20.

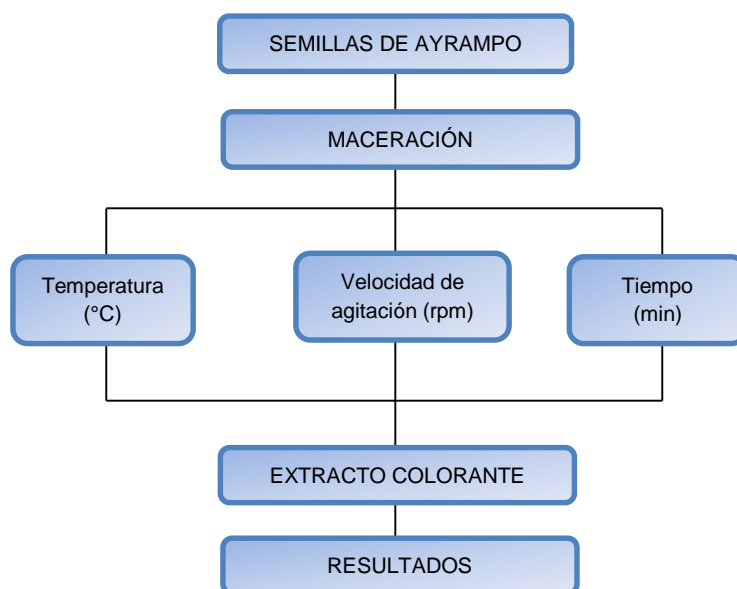


Figura 19. Procedimiento de investigación según Box-Behnken.

Fuente: Elaboración propia (2017).

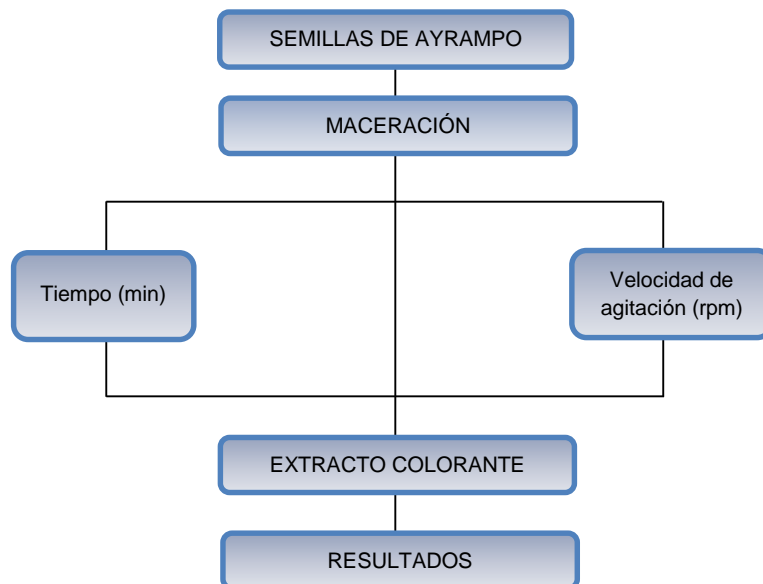


Figura 20. Procedimiento de la investigación para diseño factorial.

Fuente: Elaboración propia (2017).

4.3.5 Diseño experimental

4.3.5.1 Box – Behnken

Para determinar las condiciones de maceración se aplicó el diseño de Box-Behnken que es un tipo de diseño de superficie de respuesta dando un total de 15 corridas el cual ayudó a identificar qué nivel de los factores influyen directamente en la mayor concentración del pigmento obtenido. El diseño experimental para Box - Behnken y la combinación de los factores se observan en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Diseño experimental para Box – Behnken.

Factores	Descripción del factor	Descripción del nivel
A	Temperatura de maceración (°C)	20
		30
		40
B	Velocidad de agitación (rpm)	0
		90
		180
C	Tiempo de maceración (min)	30
		60
		90

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 6. Combinación de los factores.

Nº de corridas	A	B	C
1	20	0	60
2	20	180	60
3	40	0	60
4	40	180	60
5	20	90	30
6	20	90	90
7	40	90	30
8	40	90	90
9	30	0	30
10	30	0	90
11	30	180	30
12	30	180	90
13	30	90	60
14	30	90	60
15	30	90	60

Fuente: Elaboración propia (2017).

4.3.5.2 Factorial

Para determinar las condiciones de maceración se aplicó diseño factorial 3^2 y se combinaron los niveles de los factores en 9 tratamientos con tres repeticiones como se muestra en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Diseño experimental para diseño factorial.

Factores	Descripción del factor	Descripción del nivel
A	Tiempo de maceración (min)	30
		35
		40
B	Velocidad de agitación (rpm)	190
		195
		200

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 8. Combinación de los factores para diseño factorial.

tiempo (min)	Velocidad de agitación (rpm)
30	190
30	195
30	200
35	190
35	195
35	200
40	190
40	195
40	200

Fuente: Elaboración propia (2017).

4.3.6 Análisis de datos

Se analizó los datos obtenidos con el Software estadístico Statgraphics Centurión XVI para evaluar los extractos y Excel 2016.

CAPÍTULO V. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

5.1 MATERIA PRIMA

5.1.1 Tamaño del ayrampo

Para determinar el tamaño del ayrampo, se pesó 1 kg de frutos y se muestreó aleatoriamente 30 frutos. Los frutos tuvieron un promedio de altura y diámetro de 27,48 mm y 23,34 mm. Jiménez (2014) menciona que el ayrampo presentan dimensiones de altura y diámetro de 35,1 mm y 33,1 mm. Kiesling et al. (2011) refiere que el ayrampo mide de 20 a 40 mm de diámetro. El diámetro y altura del ayrampo se observa en la tabla 9.

Tabla 9. Valores de diámetro y altura del ayrampo.

Muestra	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Muestra	Altura (mm)	Diámetro (mm)
1	28,2	24,6	16	23,7	25
2	27,4	22,1	17	25,5	24,8
3	23,5	23,3	18	24,3	24,4
4	30,9	23,5	19	23,9	22,1
5	25,7	22,1	20	24,9	25,1
6	39,5	20,9	21	24,5	22,9
7	28,2	22,8	22	28,4	23,6
8	27,2	22,8	23	23,2	21,7
9	29,2	21,3	24	32,5	22,8
10	27,8	22,3	25	26,8	26
11	27,1	22,4	26	24,8	23,1
12	31,1	29,7	27	28,6	21,3
13	31,2	23,3	28	26,1	20,3
14	28,8	21,8	29	27,6	23,8
15	29,4	23,9	30	24,5	26,6
		Promedio		27,48	23,34

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.1.2 Distribución del peso del ayrampo

Se tomaron frutos maduros a los cuales se les retiró las cáscaras y las semillas y se pesó por separado, para tener el peso referencial. Los pesos del ayrampo se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución del peso del ayrampo.

Muestra	Peso fruto (g)	Peso semilla (g)	Peso cáscara (g)	Semilla %	Cáscara %
1	9,11	4,42	4,65	48,52	51,04
2	6,13	2,13	4	34,75	65,25
3	6,91	3,26	3,57	47,18	51,66
4	4,2	1,65	2,5	39,29	59,52
5	4,7	2,98	1,75	63,40	37,23
6	3,62	1,57	2,02	43,37	55,80
7	5,77	1,43	4,33	24,78	75,04
8	4,3	1,99	2,31	46,28	53,72
9	4,68	2,37	2,31	50,64	49,36
10	6,98	2,5	4,46	35,82	63,90
11	6,2	1,73	4,45	27,90	71,77
12	5	2,5	2,42	50,00	48,40
13	5,44	1,34	4,1	24,63	75,37
14	4,63	1,82	2,79	39,31	60,26
15	5	2	3	40,00	60,00
16	3,25	1,23	1,98	37,85	60,92
17	5,73	2,67	3,04	46,60	53,05
18	5,65	2,78	2,84	49,20	50,27
19	4	1,2	2,73	30,00	68,25
20	6,5	3,69	2,79	56,77	42,92
21	4,43	0,81	3,61	18,28	81,49
22	4,92	1,95	2,99	39,63	60,77
23	9,3	5,34	3,92	57,42	42,15
24	3,73	1,09	2,49	29,22	66,76
25	4,93	2,28	2,67	46,25	54,16
26	9,06	3,31	5,75	36,53	63,47
27	8,86	3,65	5,2	41,20	58,69
28	4,85	1,3	3,54	26,80	72,99
29	10,66	4,5	6,14	42,21	57,60
30	9,06	3,37	5,66	37,20	62,47
Promedio	5,92	2,43	3,47	41,02	58,56

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.1.3 Tamaño de semillas de ayrampo

El resultado promedio de las mediciones del diámetro y altura de las semillas de ayrampo fue de 1,17 mm y 1,88 mm como se detallan en la tabla 11 y muestran que las semillas, son de forma ovalada y ligeramente abultadas en el centro como se observan en el anexo 2.

Tabla 11. Valores de diámetro y altura de semillas de ayrampo.

Muestra	Altura (mm)	Diámetro (mm)	Muestra	Altura (mm)	Diámetro (mm)
1	2,2	1,8	16	1,65	0,95
2	1,5	1	17	1,75	1
3	1,7	1	18	2,05	1
4	2,2	1,1	19	2,2	1,15
5	2,15	1,4	20	1,65	1,15
6	2	1,15	21	2	1,1
7	1,65	0,65	22	2	1,1
8	1,65	0,9	23	1,95	1,65
9	1,85	1	24	1,75	1
10	2	1,15	25	2,1	1,65
11	1,85	1	26	1,85	1,45
12	2	1,25	27	1,75	1,15
13	2,25	1,1	28	1,65	1
14	1,7	1,35	29	1,9	1,35
15	1,7	1,45	30	1,9	1
Promedio				1,88	1,17

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.1.4 Composición proximal de las semillas de ayrampo

Se determinó la composición proximal de las semillas de ayrampo como se detalla en la tabla 12:

Tabla 12. Composición proximal de las semillas de ayrampo.

Semillas	%
Humedad	63,7
Grasas	1
Cenizas	1,5
Proteínas(1)	2,4
Fibra	26,4
Carbohidratos (2)	5
(1) Nx6,25	
(2) Por diferencia	

Fuente: Elaboración propia (2017).

De acuerdo a Soto (2014), muestra resultados cercanos a la composición de las semillas ayrampo en 100 g de muestra; donde señala para humedad 70,5 g, grasas 1,2 g y cenizas 1,5 g. Según Morales, 2007, citado en Soto (2014), la proteína del ayrampo fue de 3 g.

5.1.5 Características fisicoquímicas de las semillas de ayrampo

Se tomaron frutos maduros de ayrampo de manera aleatoria para extraer las semillas, de las cuales se determinó sólidos solubles, acidez, pH, e índice de madurez como se detalla en la tabla 13.

Tabla 13. Resultado fisicoquímico de las semillas.

Análisis	%
°Brix (Sólidos solubles)	8,97
pH	4,5
Acidez (g/100 g) (ac. cítrico)	1,83
Índice de madurez	4,90

Fuente: Elaboración propia (2017).

Se tomaron semillas con °Brix promedio de 8,97. Este resultado es similar a Sarmiento y Glorio (2003) en el que tomaron frutos maduros de ayrampo con 8 °Brix.

La acidez se expresó en gramos de ácido cítrico por 100 g de muestra; teniendo como promedio 1,83. Según Sarmiento y Glorio (2003) la acidez titulable fue de 1,709 g de ácido cítrico/100 g.

El índice de madurez es hallado por la relación entre los sólidos solubles y la acidez titulable y dio como resultado promedio de 4,9. Según Sarmiento y Glorio (2003) trabajaron con un índice de madurez de 4,68.

5.2 CONTENIDO DE COLORANTE EN EL EXTRACTO

5.2.1 Para Box-Behnken

El contenido de colorante en el extracto se determinó mediante la concentración de betacianinas, betaxantinas y betalaínas, como se observan en la tabla 14.

Tabla 14. Concentración de betacianinas, betaxantinas y betalaínas.

Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo (min)	Betacianinas (mg/100 g)	Betaxantinas (mg/100 g)	Betalaínas (mg/100 g)
20	0	60	123,52	46,27	169,79
20	180	60	136,92	52,97	189,89
40	0	60	124,62	46,97	171,59
40	180	60	144,86	54,74	199,6
20	90	30	127,27	48,55	175,82
20	90	90	142,7	54,35	197,05
40	90	30	129,46	48,39	177,85
40	90	90	148,28	56,14	204,42
30	0	30	116,81	44,04	160,85
30	0	90	121,56	46,16	167,72
30	180	30	134,68	51,49	186,17
30	180	90	145,54	55,86	201,4
30	90	60	133,09	50,65	183,74
30	90	60	133,09	50,65	183,74
30	90	60	133,13	50,46	183,59

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.2.2 Para diseño factorial

La concentración de betacianinas y betaxantinas se determinó mediante la medición de las absorbancias a 538 nm y 483 nm como se muestra en el anexo 3 y 4, la conversión de las unidades de absorbancias a unidades de concentración se muestran en el anexo 5 y 6. Las concentraciones obtenidas para betacianinas se observan en la tabla 15, las concentraciones obtenidas para betaxantinas se observan en la tabla 16 y las concentraciones obtenidas para betalaínas se observan en la tabla 17, cada tratamiento se realizó con sus respectivas repeticiones.

Tabla 15. Concentración de betacianinas.

Tiempo (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Betacianinas mg/100 g			
		R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
30	190	124,878	124,529	124,355	124,587
30	195	130,277	130,103	129,928	130,103
30	200	133,063	133,063	133,412	133,179
35	190	138,114	137,766	138,114	137,998
35	195	171,728	171,903	172,077	171,903
35	200	172,251	171,903	171,903	172,019
40	190	140,030	139,682	140,030	139,914
40	195	171,903	171,903	171,903	171,903
40	200	172,251	171,728	171,903	171,961

Fuente: Elaboración propia (2017).

R₁, R₂, R₃ : Número de repeticiones.

Tabla 16. Concentración de betaxantinas.

Tiempo (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Betaxantinas mg/100 g			
		R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
30	190	51,522	52,180	52,058	51,920
30	195	52,790	52,546	52,424	52,587
30	200	54,131	53,643	53,887	53,887
35	190	53,765	53,887	53,765	53,806
35	195	66,323	66,201	66,201	66,241
35	200	67,786	67,908	67,786	67,826
40	190	53,887	53,887	53,765	53,847
40	195	66,567	66,445	66,445	66,485
40	200	66,932	66,810	66,810	66,851

Fuente: Elaboración propia (2017).

R₁, R₂, R₃ : Número de repeticiones.

Tabla 17. Concentración de betalaínas.

Tiempo (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Betalaínas mg/100 g			
		R ₁	R ₂	R ₃	Promedio
30	190	176,3995	176,7095	176,4134	176,5075
30	195	183,0666	182,6486	182,3525	182,6892
30	200	187,1943	186,7067	187,2988	187,0666
35	190	191,8794	191,653	191,8794	191,8039
35	195	238,051	238,1033	238,2774	238,1439
35	200	240,0365	239,8101	239,6882	239,8449
40	190	193,9172	193,5688	193,7953	193,7604
40	195	238,469	238,3471	238,3471	238,3877
40	200	239,1831	238,5387	238,7128	238,8115

Fuente: Elaboración propia (2017).

R₁, R₂, R₃ : Número de repeticiones.

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

5.3.1 Diseño Box-Behnken

5.3.1.1 Para betacianinas

Según el análisis de varianza para betacianinas del anexo 7 muestra que la velocidad de agitación y el tiempo tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0% a diferencia de la temperatura que tiene un valor P mayor que 0,05 indicando que no es significativo para el experimento aplicado para el diseño de Box-Behnken, por tal motivo se ve por conveniente trabajar con los factores significativos.

5.3.1.2 Para betaxantinas

Según el análisis de varianza para betaxantinas del anexo 7 muestra que la velocidad de agitación y el tiempo tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0% a diferencia de la temperatura que tiene un valor P mayor que 0,05 indicando que no es significativa para el experimento aplicado para el diseño de Box-Behnken, por tal motivo se ve por conveniente trabajar con los factores significativos.

5.3.1.3 Para betalaínas

Según el análisis de varianza para betalaínas del anexo 7 muestra que la velocidad de agitación y el tiempo tienen un valor-P menor que 0,05; indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0% a diferencia de la temperatura que tiene un valor P mayor que 0,05; indicando que no es significativo para el experimento aplicado para el diseño de Box-Behnken, por tal motivo se ve por conveniente trabajar con los factores significativos, estos resultados se pueden observar en la figura 21 del diagrama de Pareto que muestran que dos factores son significativos.

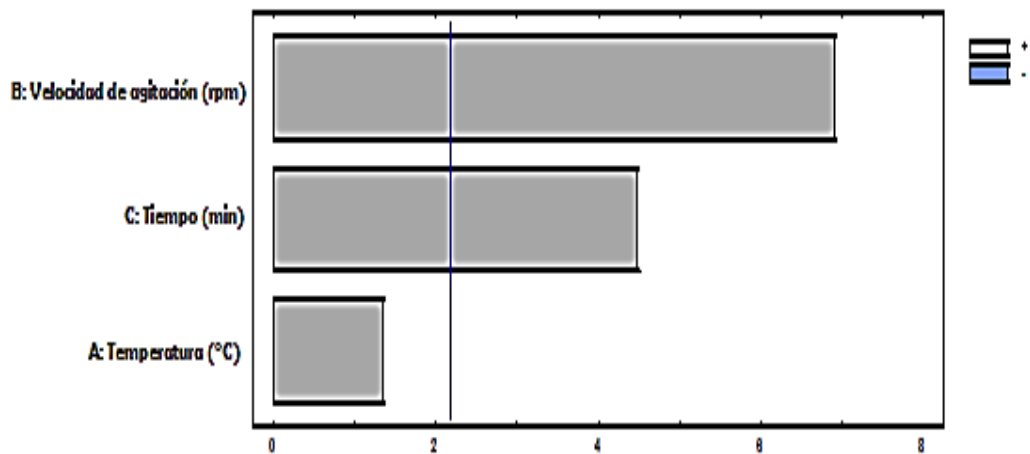


Figura 21. Diagrama de Pareto estandarizado para betalaínas.
Fuente: Elaboración propia (2017).

5.3.2 Diseño factorial 3²

5.3.2.1 Para betacianinas

La figura 22 indica que la velocidad de agitación y el tiempo de maceración es significativo para la mayor concentración de betacianinas en el extracto. En la figura 23 se puede observar los efectos de los factores principales para betacianinas que muestra que conforme se incrementa el tiempo aumenta la concentración de betacianinas hasta llegar a la máxima concentración y empieza la disminución de la misma; lo mismo se puede observar para la relación velocidad de agitación con la concentración de betacianinas. El análisis de varianza para betacianinas del anexo 8 muestra que los efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0%.

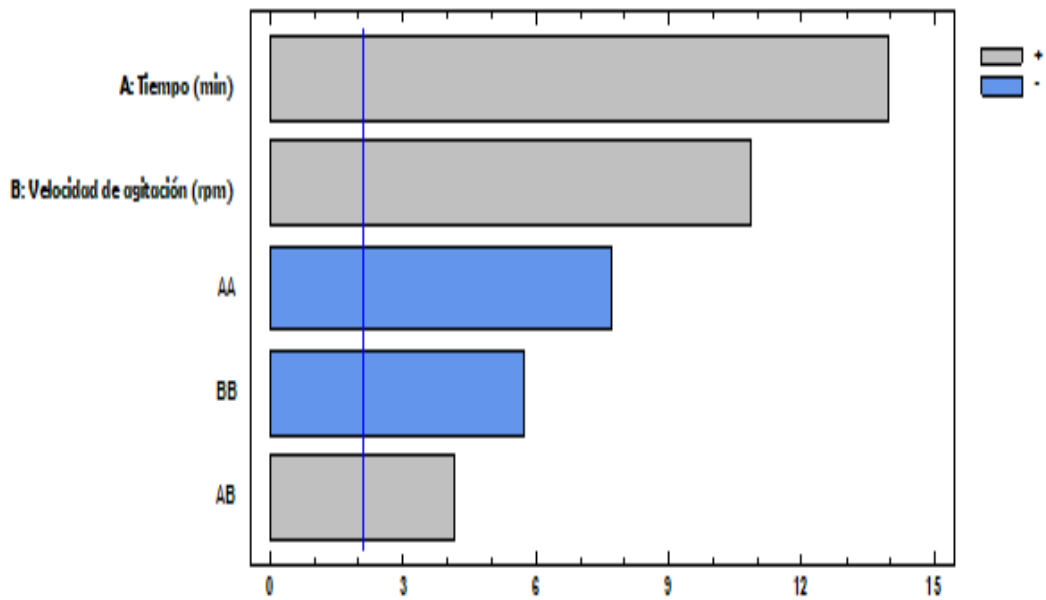


Figura 22. Diagrama de Pareto Estandarizado para betacianinas
Fuente: Elaboración propia (2017).

Gráfica de Efectos Principales para Betacianinas

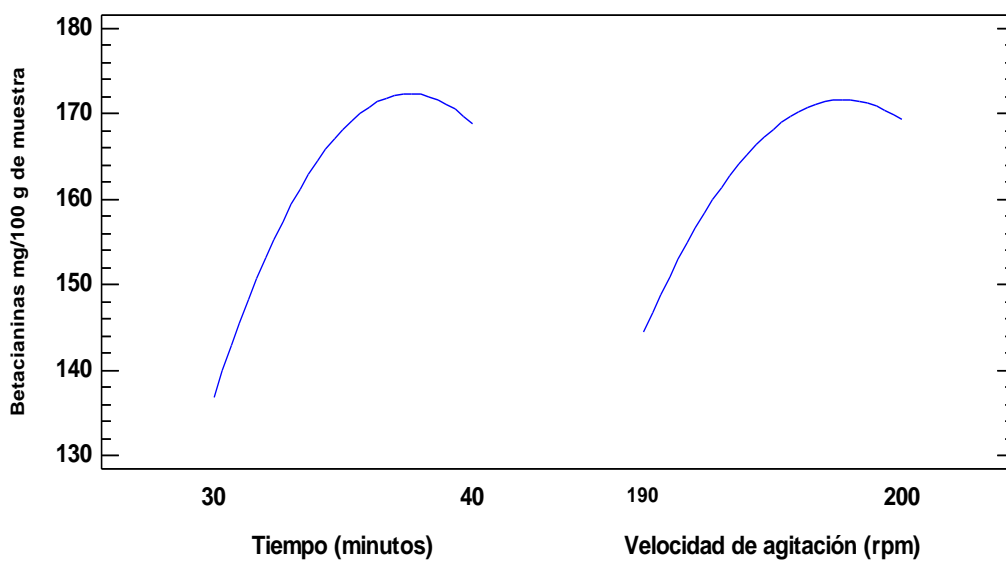


Figura 23. Gráfica de efectos principales para betacianinas.
Fuente: Elaboración propia (2017).

5.3.2.2 Para betaxantinas

La figura 24 indica que la velocidad de agitación y el tiempo son significativos para la mayor concentración de betaxantinas, en la figura 25 se puede observar los efectos de los factores principales para betaxantinas que muestra que conforme se incrementa el tiempo aumenta la concentración de betaxantinas hasta a la máxima concentración y empieza la disminución; lo mismo se observar para la relación velocidad de agitación con la concentración de betaxantinas. El ANVA para betaxantinas del anexo 8 muestra que los factores tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0%.

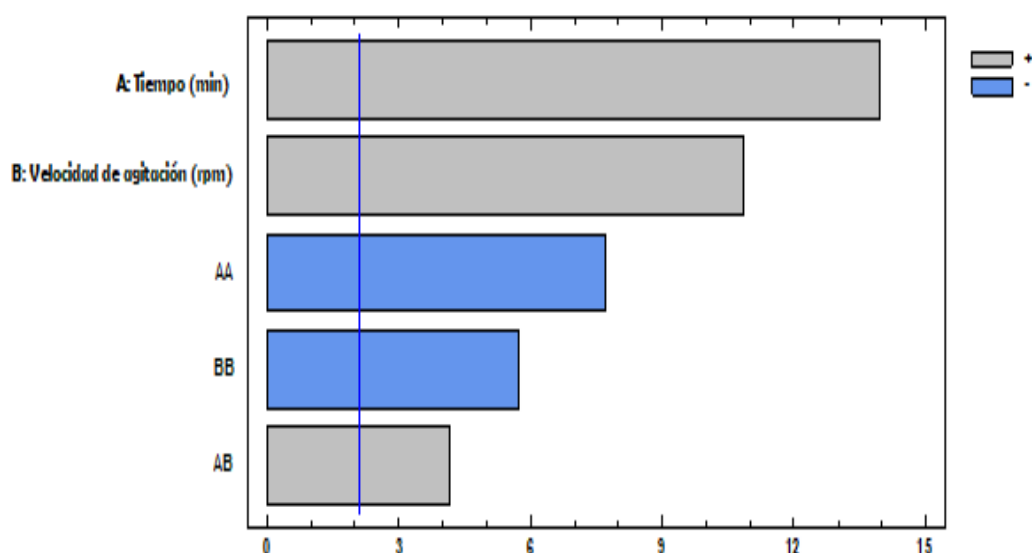


Figura 24. Diagrama de Pareto estandarizado para betaxantinas
Fuente: Elaboración propia (2017).

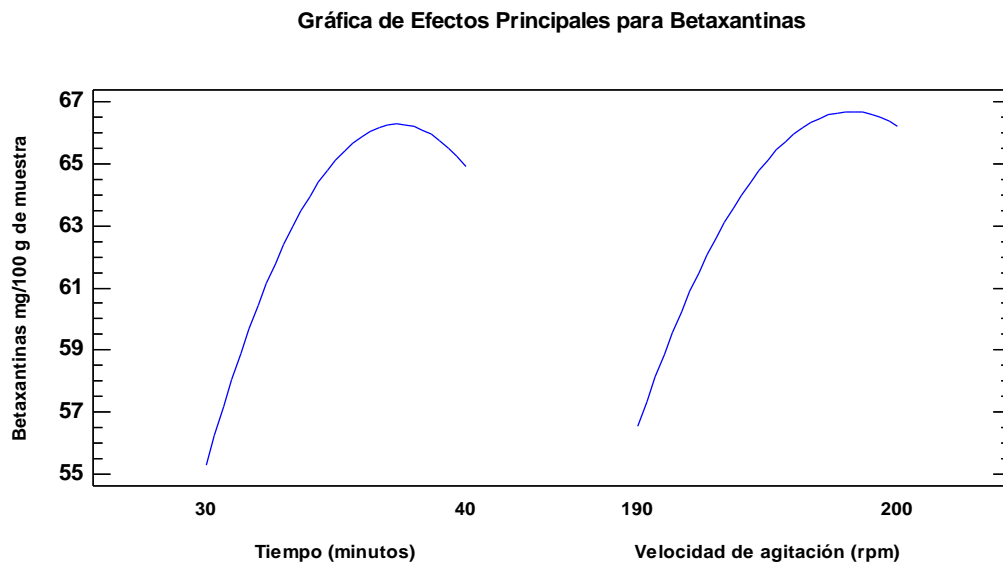


Figura 25. Efectos principales para betaxantinas.
Fuente: Elaboración propia (2017).

5.3.2.3 Para betalaínas

La figura 26 indica que la velocidad de agitación y el tiempo son significativos para la mayor concentración de betacianinas en el extracto, en la figura 27 se puede observar los efectos de los factores principales para betalaínas que muestran que conforme se incrementa el tiempo aumenta la concentración de betalaínas hasta que en un punto llega a la máxima concentración y empieza la disminución de la misma; lo mismo se puede observar para la relación velocidad de agitación con la concentración de betalaínas. El análisis de varianza para betalaínas del anexo 8 muestra que los efectos tienen un valor-P menor que 0,05 indicando que son significativos con un nivel de confianza del 95,0%.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Betalainas

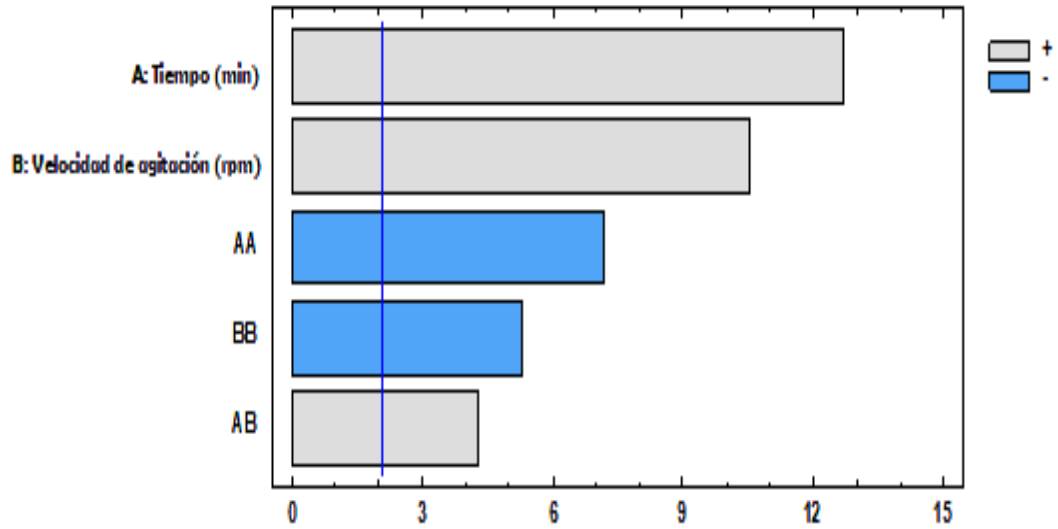


Figura 26. Diagrama de Pareto estandarizado para betalainas
Fuente: Elaboración propia (2017).

Gráfica de Efectos Principales para Betalainas

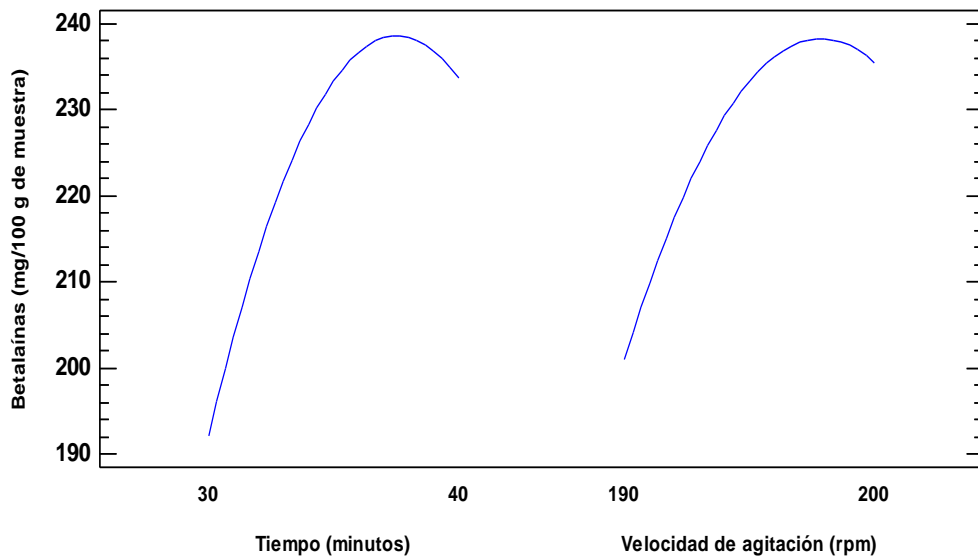


Figura 27. Efectos principales para betalainas.
Fuente: Elaboración propia (2017).

5.3.2.4 Condiciones adecuadas de maceración para obtención del extracto colorante

La tabla 18 muestra que las condiciones adecuadas de obtención del extracto colorante de ayrampo es a 38,35 min y 198,82 rpm.

Tabla 18. Condiciones adecuadas de obtención del colorante

Factor	Bajo	Alto	Condiciones adecuadas
Tiempo	30 min	40 min	38,35 min
Velocidad de agitación	190 rpm	200 rpm	198,82 rpm

Fuente: Elaboración propia (2017).

Utilizando las condiciones de maceración adecuadas de tiempo 38,35 min y velocidad de agitación de 198,82 rpm se obtiene un extracto colorante de ayrampo con 177,927 mg de betacianinas/100 g de muestra, 69,073 mg de betaxantinas/100 g de muestra y 246,9 mg de betalaínas/100 g de muestra. Estos resultados se observan en la tabla 19.

Tabla 19. Máxima concentración de betacianinas, betaxantinas y betalaínas.

Respuesta	Concentración
Betacianinas	177,927 mg/100 g
Betaxantinas	69,073 mg/100 g
Betalaínas	246,9 mg/100 g

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.4 PRODUCTO FINAL

5.4.1 Caracterización del producto final

La caracterización fisicoquímica del extracto colorante obtenido en las mejores condiciones se muestra en la tabla 20.

Respecto al contenido de betacianinas Gamarra et al. (2004) señala que obtuvieron 180 mg/100 g semilla seca y según Huayta (2016) menciona que el ayrampo presenta de 75 mg a 95 mg por 100 g de semillas, en el presente trabajo se obtuvo 172,93 mg/100 g de semilla, en cuanto a betaxantinas y betalaínas no se encontraron estudios realizados al extracto acuoso de ayrampo. En azúcares reductores se obtuvo de 4,8% según Tipe, 1989, citado en Godenzi, 2013 obtuvo 6,7% de azúcares reductores. En cuanto a los fenoles totales, el valor obtenido fue de 12,9 mg ac. tánico/g de semilla y el valor reportado por Gamarra et al. (2004) fue de 12,57 mg ac. clorogénico/g de semilla.

Tabla 20. Caracterización del extracto colorante de ayrampo.

Componente	Valor
Betalaínas (mg/100 g)	239,97
Betacianinas (mg/100 g)	172,93
Betaxantinas (mg/100 g)	67,04
° Brix	2,6
Acidez (g/100 g) (ac. cítrico)	1,8
Azúcares reductores (% de glucosa en 100 g)	4,8
Fenoles totales (mg/g)	12,9
Azúcares totales (% de glucosa en 100 g)	6,8

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.4.2 Balance de materia del producto final

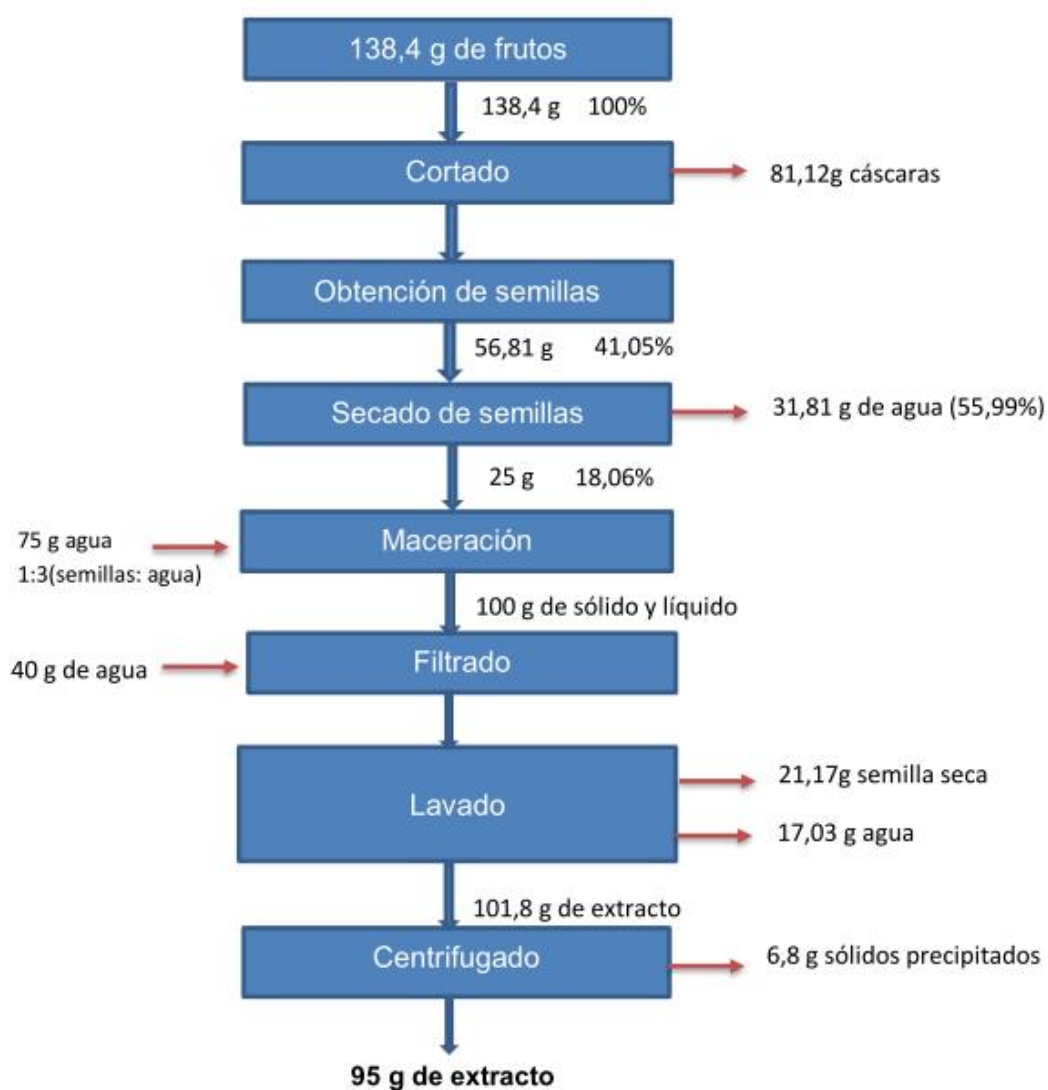


Figura 28. Balance de materia

Fuente: Elaboración propia (2017)

En la Figura 28 se muestra el balance de materia del extracto colorante de ayrampo obtenido con las mejores condiciones de maceración.

Respecto a las semillas húmedas, estas representan 41,05% del peso total del fruto y las semillas secas representan el 18,06% del peso total del ayrampo, respecto al peso de semilla seca Soto (2014) menciona que las semillas secas representan el 27, 2% del peso total del ayrampo.

Respecto al extracto colorante de ayrampo se obtuvo 95 g. Según Carpio y Portugal (2014) obtuvieron 67 g de extracto de ayrampo siendo estos resultados menores a los obtenidos en este estudio.

5.5 ESTABILIDAD DEL EXTRACTO COLORANTE

La estabilidad de los extractos se determinó al mes de almacenamiento a 4 °C y a temperatura ambiente (18 °C) con un pH promedio de 4,6. Se dio lectura espectrofotométrica a las muestras a 538 nm y 483 nm, las absorbancias obtenidas se convirtieron en unidades de concentración según el método descrito en el anexo 5. Con estos resultados se calculó el porcentaje de pigmento retenido mediante el método descrito por Cai et al., 1998, véase en el anexo 9 y 10. Los resultados del porcentaje de pigmento retenido al mes de almacenamiento

a 4 °C y 18 °C para betacianinas, betaxantinas y betalaínas se observan en las tablas 21,22 y 23.

Tabla 21. Retención de betacianinas al mes de almacenamiento.

N° de muestra	Ambiente (18 °C)	Refrigerado(4 °C)
1	56,803 %	82,106%
2	58,188%	86,033%
3	66,739%	88,056%
4	58,351%	96,003%
5	43,803%	77,102%
6	53,257%	86,331%
7	47,925%	86,224%
8	30,902%	69,108%
9	32,633%	75,692%

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 22. Retención de betaxantinas al mes de almacenamiento.

N° de muestra	Ambiente (18 °C)	Refrigerado (4 °C)
1	77,959%	76,08%
2	76,893%	88,717%
3	99,849%	82,428%
4	98,565%	99,773%
5	73,006%	80,491%
6	79,868%	93,829%
7	71,019%	92,528%
8	60,208%	76,467%
9	68,267%	79,027%

Fuente: Elaboración propia (2017).

Tabla 23. Retención de betalaínas al mes de almacenamiento.

N° de muestra	Ambiente (18 °C)	Refrigerado (4 °C)
1	63,026%	80,334%
2	63,573%	86,806%
3	76,277%	86,435%
4	69,632%	97,061%
5	51,926%	78,045%
6	60,782%	88,452%
7	54,343%	87,976%
8	39,075%	71,161%
9	42,608%	76,626%

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.5.1 Análisis estadístico

5.5.1.1 Retención de betacianinas

Estos resultados fueron analizados aplicando datos pareados con un intervalo de confianza del 95%. La prueba-t que se muestra en el anexo 12 evalúa la hipótesis de que la media de ambiente (18 °C) - refrigerado (4 °C) es igual a 0,0 versus la hipótesis alterna de que la media de ambiente-refrigerado es no igual a 0,0. Debido a que el valor-P para esta prueba es menor que 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis nula con un 95,0% de confianza. Los resultados muestran que sí hay influencia de la temperatura de almacenamiento en las betacianinas debido a que estas son más estables a una temperatura de refrigeración de 4 °C y que se degradan más fácilmente a una temperatura ambiental en este caso la temperatura del

laboratorio fue de 18 °C y el porcentaje de pigmento retenido para betacianinas fue mayor a temperatura de 4 °C como se observa en la figura 29.

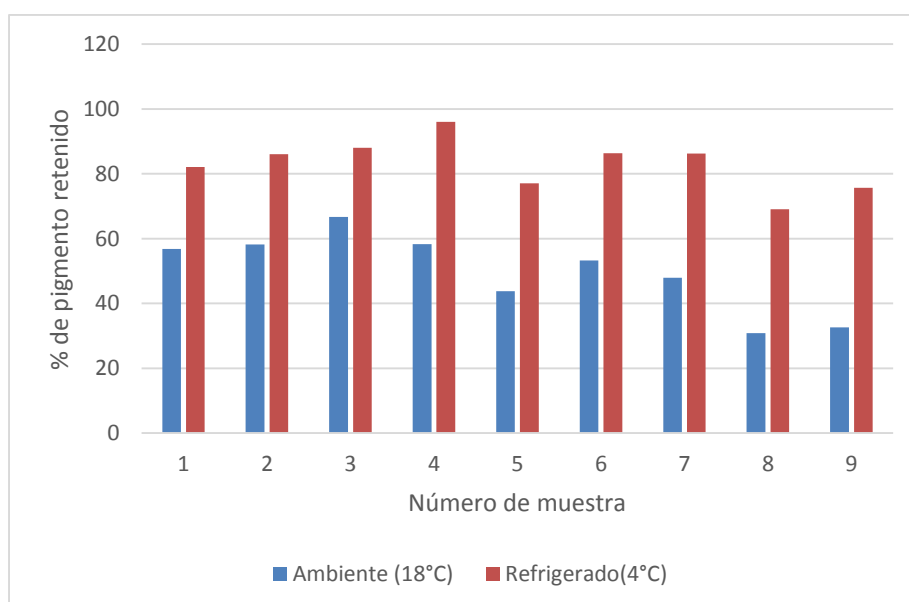


Figura 29. Porcentaje de retención de betacianinas al mes de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.5.1.2 Retención de betaxantinas

Estos resultados fueron analizados aplicando datos pareados con un intervalo de confianza del 95% de misma manera que se evaluó betacianinas. El valor-P para esta prueba es mayor o igual a 0,05 como se observa en el anexo 12, por tal motivo se acepta la hipótesis nula, con un nivel de confianza del 95,0%. Los resultados muestran que no existe

diferencia en los tratamientos y por tal motivo no hay diferencia si se almacena a temperatura ambiente (18 °C) o en refrigeración (4 °C). El porcentaje de retención para betaxantinas se muestran en la figura 30.

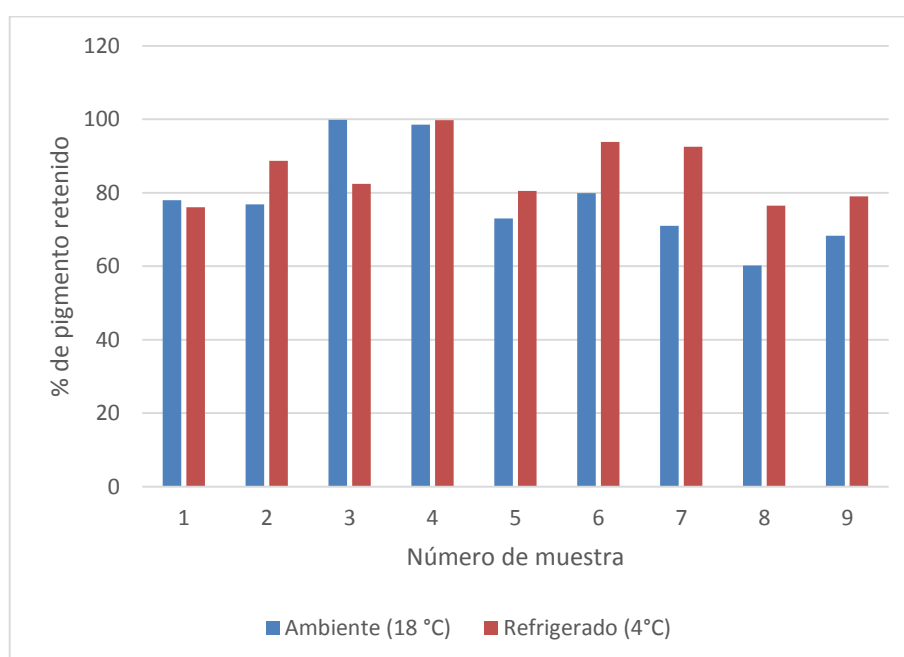


Figura 30. Porcentaje de retención de betaxantinas al mes de almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia (2017).

5.5.1.3 Retención de betalaínas

Estos resultados fueron analizados aplicando datos pareados con un intervalo de confianza del 95% de la misma manera que se evaluó betacianinas y betaxantinas. El valor-P para esta prueba es menor que 0,05 por lo cual se rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza de 95,0%

como se muestra en el anexo 12. Los resultados muestran que, si hay influencia de la temperatura de almacenamiento en las betalaínas debido a que estas son más estables a una temperatura de refrigeración de 4 °C y que se degradan más fácilmente a una temperatura ambiental. El porcentaje de retención de betalaínas se observan en la figura 31.

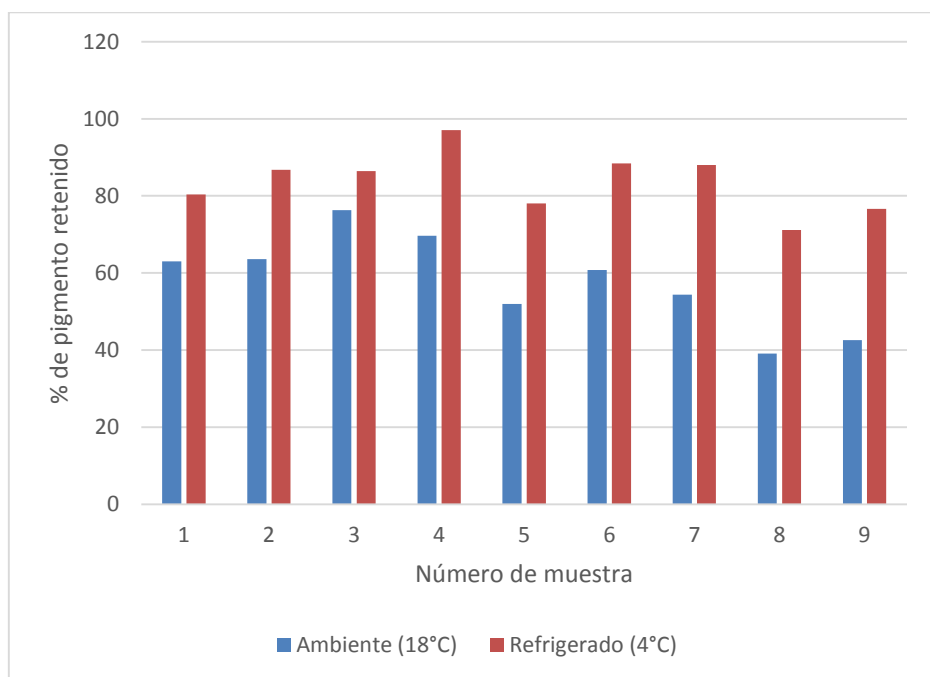


Figura 31. Porcentaje de retención de betalaínas al mes de Almacenamiento.

Fuente: Elaboración propia (2017).

CONCLUSIONES

1. Se determinó que las condiciones de maceración para la mayor obtención de extracto colorante (246,9 mg de betalaínas/100 g de muestra), son el tiempo y la velocidad de agitación.
2. Se determinó que el tiempo que permite obtener la mayor extracción del colorante es 38,35 min.
3. Se determinó que la velocidad de agitación que permite obtener la mayor extracción del colorante es a 198,82 rpm.
4. Las betacianinas presentes en el extracto de ayrampo y almacenados a 4 °C y 18 °C, presentaron más estabilidad al almacenamiento a 4 °C, debido que retuvieron mayor porcentaje de pigmento.
5. Las betaxantinas a diferencia de las betacianinas fueron estables al almacenamiento a 4 °C y 18 °C.
6. Las betalaínas presentes en el extracto de ayrampo presentaron más estabilidad al almacenamiento a 4 °C.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar otras condiciones de maceración como la aplicación de temperaturas menores a los 20 °C.
2. Se recomienda continuar la investigación aplicada al campo de la conservación del extracto colorante a partir de semillas de ayrampo.
3. Se recomienda que el extracto colorante de ayrampo se almacene en refrigeración a temperatura de 4 °C.
4. Se recomienda el reciclaje de los residuos orgánicos generados después de la obtención del colorante de ayrampo, como la elaboración de compost o como suplemento alimenticio para los animales a fin de reducir el impacto ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguado, J., Calles, J.A., Cañizares, P., López, B., Santos, A., Serrano, D. (1999). *Ingeniería de la industria alimentaria*. Vol II *Operaciones de procesado de alimentos*. Editorial Síntesis. Madrid, España, p. 55.
- Astiasarán, I., Lasheras, B., Ariño, A., y Martínez, A. (2003). *Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España, p.135.
- Bagué, A.J., y Álvarez, N. S. (2012). *Tecnología farmacéutica*. Ediciones Club Universitario, España, p.177.
- Boletín oficial del estado. (2009, 10 de enero). *Diario oficial de la unión europea*. EN: <https://www.boe.es/doue/2009/006/L00020-00063.pdf>
- Cai, Y., Sun, M., & Corke, H. (1998). *Colorant properties and stability of amaranthus betacyanin pigments*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(11), 4491- 4495. EN: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf980457g>
- Carpio, Y. L., y Portugal, J. L. (2014). *Determinación de parámetros tecnológicos para la obtención de un colorante natural de ayrampo*

(Opuntia Soherensii) y su aplicación en la obtención de un alimento a base de harina de yuca (*Manihot esculenta crantz*). Tesis de pregrado. Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

Castellanos, E., & Yahia, E.M (2008) *Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 56: 5758-5764. EN: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802012000500003&script=sci_arttext

Chen, Y., Del Valle, M. A., Ariño, A., Valdebenito, N., y Zacconi, F. (2014). *Mediciones y métodos de uso común en el laboratorio de química*. Ediciones Universidad Católica, Chile, pp.126 -128.

Contento, A. M. (1997). *Nuevos métodos fotométricos y cromatográficos para la determinación de colorantes rojos en alimentos*. Universidad de Castilla-La Mancha. Cuenca, España, p. 12.

Copa, R. (2011). *Elaboración de helado artesanal a base de extracto de yacón (*Smallanthus sonchifolius*) – soya (*Glicine max*) y ayrampo (*Opuntia soehrensii*)*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

Devia, J., y Saldarriaga, L. (2003). *Planta piloto para obtener colorante de la semilla del achiote (Bixa orellana)*. Universidad EAFIT. Medellín, Colombia.9(131),8-22.

EN:publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/.../805.

Enriquez, C. (2005). *Estudio de la extracción y estabilidad del colorante del ataco (Amaranthus hybridus) con potencial de aplicación como aditivo alimentario*. Tesis doctoral. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador. EN:

<https://books.google.com.pe/books?id=c4wzAQAAMAAJ>

Franco, M. (2004). *Caracterización parcial del pigmento rojo del fruto de la jiotilla (Escontria chiotilla); una cactácea sub explotada*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F. EN: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI11759.pdf>.

Fennema, O. R. (1995). *Química de los alimentos*. Segunda edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España, pp. 773-849.

Gamarra, S., Chirinos, R., y Campos, D. (2004). *Evaluación de la capacidad antioxidante, compuestos fenólicos y betaninas en extractos acuosos de ayrampo (Opuntia soehrensii) y evaluación de su estabilidad*.

Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú, pp 204 - 224.

EN:

www.lamolina.edu.pe/Investigacion/web/anales/pdf_anales/LVII-2.pdf

García, E. (2012). *Extracción y caracterización fisicoquímica de la fracción colorante de la semilla del aguacate (Persea americana miller) a nivel laboratorio*. Tesis de pregrado. Universidad de San Carlos de Guatemala.

García, L., Salinas, Y., y Valle-Guadarrama, S. (2012). *Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en pitaya de mayo (Stenocereus griseus)*. Fitotecnia mexicana. México, 35(5), 1 - 5. EN: [www.scielo.org.mx/scielo.php? pid=S0187-73802012000500003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802012000500003)

García, M., Quintero, R., y López, A. (2004). *Biotecnología alimentaria*. Limusa. México D.F, p. 501.

Godenzi, J. (2013). *El ayrampo, potencial frutícola en vías de extinción en la región Ayacucho*. EN:

<http://www.juliopablogodenzivargas.blogspot.com/>

Huaringa, M. (2014). *Evaluación de betaninas y actividad antioxidante en pulpa concentrada de tuna (Opuntia ficus indica) ecotipo morado*.

Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Centro del Perú. EN:
[http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1948/Huaringa%20Alvarado.pdf?](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1948/Huaringa%20Alvarado.pdf)

Huayta, Y. (2016). *Determinación de los parámetros de coloración y su estabilidad del colorante ayrampo (Opuntia soehrensii Britt & Rose) en la elaboración del yogurt*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del Altiplano. EN: <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/3268>

Ibáñez, F., Irigoyen, A., y Torre, P. (2003). *Aditivos Alimentarios*. Universidad Pública de Navarra, España. EN:
www.nutricion.org/publicaciones/revista_agosto_03/.../aditivos.pdf

Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2015). *Departamento Tacna: Población total proyectada y ubicación geográfica de la capital legal*. EN:
[https:// www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones.../Est/.../tacna_23_3.xls](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones.../Est/.../tacna_23_3.xls)

Jimenez, Y. L. (2014). *Evaluación de la estabilidad del colorante de ayrampo (Opuntia soehrensii)*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional del centro. Perú. EN:
<http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2653/Jimenez%20Ygnacio.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Jover, A., y García, J. (2004). Manual auxiliar de farmacia. Editorial MAD. España, p. 100.

Kiesling, R., Saravia, M., Oakley, L., Muruaga, N., Metzging, D., y Novara, L. (2011). Aportes botánicos de Salta, flora del valle de Lerma. Universidad Nacional de Salta, Argentina. 10 (7), 33-36. EN: <http://eprints.natura.unsa.edu.ar/424/1/CACTACEAE.pdf>

Lamarque, A., Zigadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D. (2008). *Fundamentos teóricos-prácticos de química orgánica*. Encuentro Grupo Editor. Córdoba, Argentina, pp. 48-51.

Lock, O. (1997). *Colorantes naturales*. Pontificia Universidad Católica de Lima, Perú, pp. 207-208.

López, S. (2014). *Extracción y actividad antioxidante del colorante natural de la pulpa del fruto de Opuntia ficus-indica "tuna morada" y su aplicación en crema chantilly*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. EN: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4243/1/L%C3%B3pez_gs.pdf

Morales, P. (2007) *Estudio de la estabilidad de la betanina, capacidad antioxidante y fenólicos totales de los extractos de ayrampo (Opuntia*

soehrensii) y *beterraga* (*Beta vulgaris* L.) Tesis pregrado. Universidad Nacional Agraria la Molina. Perú.

Osorio, R. (2009). *Manual técnicas de laboratorio químico*. EN: <https://books.google.com.pe/books?isbn=9587142659>.

Ojeda, F. (1992). *Extracción de colorante de remolacha y diseño de la planta piloto. Tesis pregrado. Universidad Central de Quito, Ecuador*. EN: <https://books.google.com.pe/books?isbn=9587142659>.

Pérez, R., Nieto, J.M y Ruiz, G. (junio del 2005). *Mejora de la calidad de aguas ácidas de mina generadas por oxidación de pirita en la zona no saturada, VI Simposio de agua en Andalucía*. Sevilla, España. EN: <https://books.google.com.pe/books?isbn=847840578X>

Piatelli M., y Minalle L. (1964). *Pigments of centrospermae I. betacyanins from Phyllocactus hybridus and Opuntia ficus-indica phytochemistry*. 3: 307-311. EN: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI11759.pdf>

Sarmiento, V., y Glorio, P. (enero de 2003) *Estabilidad físico química y actividad antioxidante de las betalaínas del ayrampo (Opuntia soehrensii) durante el proceso de atomizado*. En M. Ascón (Presidencia). 1º Congreso internacional de científicos peruanos.

Congreso llevado a cabo en Lima, Perú. EN:
<http://socios.spc.org.pe/ecuadros/papers/ICICP.pdf>

Sánchez, N. (2006). *Extracción y caracterización de los principales pigmentos del Opuntia joconoste c.v. (xoconostle)*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional de México. México D.F. EN:
www.repositoriodigital.ipn.mx/.../PTA_M_20061219_001.PDF?

Soriano, R. (2001). *Obtención de colorante natural de ayrampo (Opuntia soehrensii)*. Tesis de pregrado. Universidad Técnica de Ururo. Bolivia. EN: Postgrado.uto.edu.bo/tesis/facultad-nacional-de-Ingenieria/carrera-de-ingenieria-quimica/351-obtencion-de-colorante-natural-a-partir-del-ayrampo.

Soto, H. (2014). *Efecto antibacteriano y antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soehrensii (ayrampo) y diseño de un gel de limpieza cutánea*. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú. EN:
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3888>.

Tipe, O. (1989). *Estudio técnico para la obtención de los colorantes a partir de los frutos del Opuntia soehrensii (Ayrampo)*. Tesis de pregrado. UNSCH, Ayacucho, Perú. EN:

<http://www.juliopablogodenzivargas.blogspot.pe/>

Tipe, C., y Lock O. (1990). *Estudio de la estabilidad del extracto del ayrampo (Opuntia soeherensii) y de la betanina*. Boletín de la Sociedad Química del Perú, 5, 26 - 40. EN:

https://www.researchgate.net/profile/Olga_Lock/publication/275652048.

Ullauri, P. (2010). *Transporte de masa en extracción Fase sólido-líquido*.

EN: <https://books.google.com.pe/books?>

Ulloa, J. A. (2007). *Frutas auto estabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos*. Universidad Autónoma de Nayarit. México, p. 24.

Valcárcel, M., y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*.

Ediciones Reverté. España, p. 213.

Solano, M. (1998). *Botánica sistemática*. Universidad Nacional del Altiplano, Puno.

Solís, J. A., Tapia, M., y Durán, M.C (2001). *Aceite de almendra de zapote mamey, un análisis de rendimientos y condiciones de extracción*. *Información Tecnológica*, 12(6), 23-28. EN:

<https://books.google.com.pe/books?id=xRgv4SWDKhMC>

Viloria, A., y Moreno M. (1999). *Betalaínas: una síntesis de su proceso*. EN:
<https://books.google.com.pe/books?>

Villagrán, C., y Castro V. (2004). *Ciencia indígena de los andes del norte de Chile*. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, p. 153. EN:
<https://books.google.com.pe/books?>

Zenteno, A. (2004). *Farmacopea Andina e Identificación de Plantas Instituto de Medicina Natural*. Editorial Sagitario Impresores. Perú.

ANEXOS

Anexo 1. Directiva 2008/128/CE de la comisión de las comunidades europeas.

Diario Oficial de la Unión Europea 10/1/2009

Criterios específicos de pureza

E 162 ROJO DE REMOLACHA

Sinónimos	Betanina
Definición	<p>El rojo de remolacha se obtiene de las raíces de cepas naturales de la remolacha roja (<i>Beta vulgaris</i> L. var. <i>rubra</i>) por presión de la remolacha triturada como jugo de presión o mediante extracción acuosa de raíces troceadas de remolacha, con posterior enriquecimiento del principio activo. El colorante está formado por diferentes pigmentos pertenecientes a la clase de la betalaina. El principal colorante consiste en betacianinas (rojo) de las que la betanina supone el 75-95 %. Pueden estar presentes pequeñas cantidades de betaxantina (amarillo) y productos de degradación de las betalainas (marrón claro).</p> <p>Además de los colorantes, el jugo o extracto contiene azúcares, sales o proteínas presentes naturalmente en la remolacha roja. La solución puede concentrarse y algunos productos pueden refinarse a fin de eliminar la mayoría de los azúcares, sales y proteínas.</p>
Clase	Betalaina
Einecs	231-628-5
Denominaciones químicas	Ácido {S-(R*,R*)-4-{2-(2-carboxi-5-(β-D-glucopiranosiloxi)-2,3-dihidro-6-hidroxi-1H-indol-1-il)-etenil}}-2,3-dihidro-2,6-piridina-dicarboxílico; 1-{2-(2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetrahidro-4-piridilideno)-etilideno}-5-β-D-glucopiranosiloxi)-6-hidroxiindolio-2-carboxilato
Fórmula química	Betanina: C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃
Peso molecular	550,48
Determinación	<p>Contenido de colorante rojo (expresado en betanina) no inferior al 0,4 %</p> <p>$E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 1 120 a aproximadamente 535 nm en solución acuosa de pH 5</p>

Einecs	231-628-5
Denominaciones químicas	Ácido (S-(R*,R*)-4-{2-(2-carboxi-5-(β-D-glucopiranosilo)-2,3-dihidro-6-hidroxi-1H-indol-1-il)-etenil})-2,3-dihidro-2,6-piridina-dicarboxílico; 1-{2-(2,6-dicarboxi-1,2,3,4-tetrahidro-4-piridilideno)-etilideno}-5-β-D-glucopiranosilo-6-hidroxiindolio-2-carboxilato
Fórmula química	Betanina: C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₁₃
Peso molecular	550,48
Determinación	Contenido de colorante rojo (expresado en betanina) no inferior al 0,4 % E _{1 cm} ^{1 %} 1 120 a aproximadamente 535 nm en solución acuosa de pH 5
Descripción	Líquido, pasta, polvo o sólido de color rojo o rojo oscuro
Identificación	
Espectrometría	Máximo en agua de pH 5 a aproximadamente 535 nm
Pureza	
Nitratos	No más de 2 g de anión nitrato/g de colorante rojo (tal como se haya calculado en la determinación)
Arsénico	No más de 3 mg/kg
Plomo	No más de 10 mg/kg
Mercurio	No más de 1 mg/kg
Cadmio	No más de 1 mg/kg
Metales pesados (expresados en Pb)	No más de 40 mg/kg

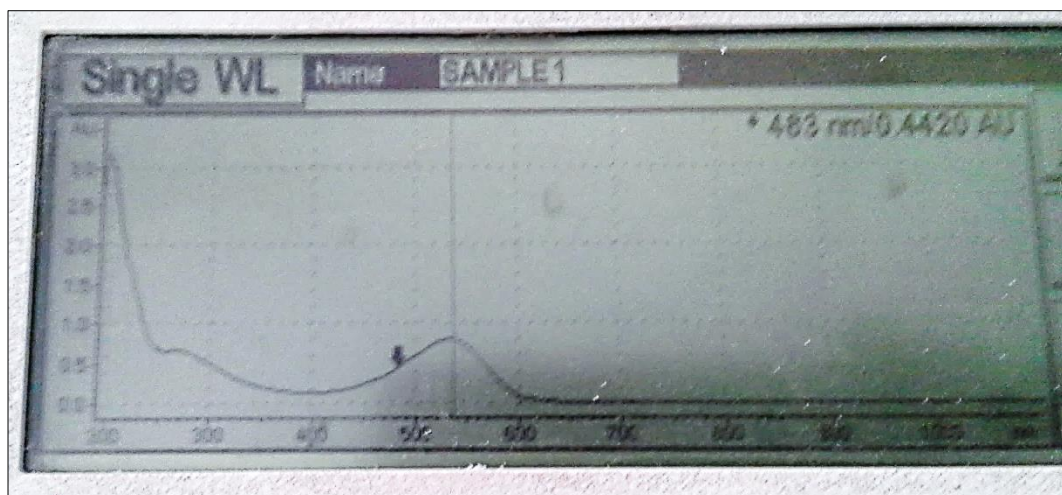
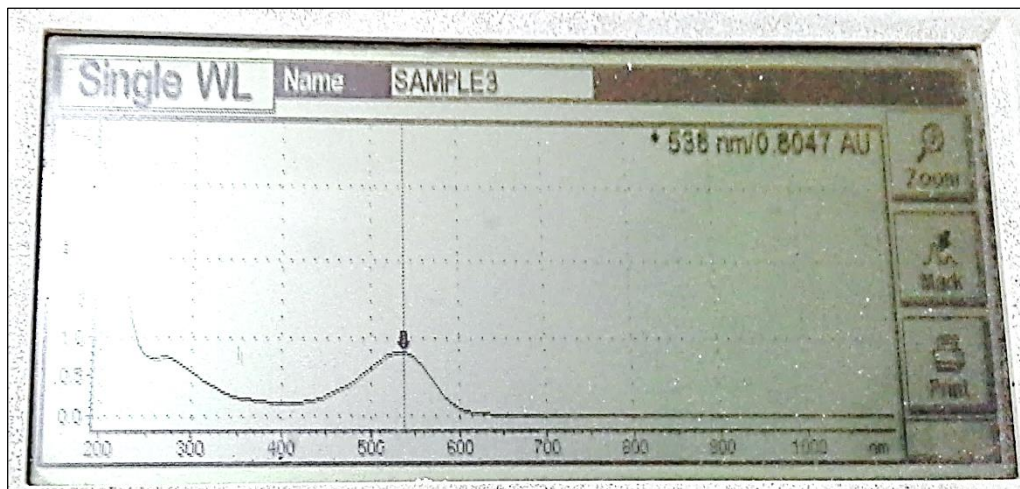
Anexo 2. Imágenes de recolección del ayrampo



Anexo 3. Imágenes de determinación del tamaño del fruto y semilla



Anexo 4. Imágenes de lectura espectrofotométrica a 538 y 483 nm



Anexo 5. Absorbancias de betacianinas y betaxantinas

Absorbancias para betacianinas									
Longitud de onda	30 min x 190 rpm	30 min x 195 rpm	30 min x 200 rpm	35 min x 190 rpm	35 min x 195 rpm	35 min x 200 rpm	40 min x 190 rpm	40 min x 195 rpm	40 min x 200 rpm
538 nm	0,717	0,748	0,764	0,793	0,986	0,989	0,804	0,987	0,989
	0,715	0,747	0,764	0,791	0,987	0,987	0,802	0,987	0,986
	0,714	0,746	0,766	0,793	0,986	0,987	0,804	0,987	0,987
Promedio	0,715	0,747	0,765	0,792	0,986	0,988	0,803	0,987	0,987

Absorbancias para betaxantinas									
Longitud de onda	30 min x 190 rpm	30 min x 195 rpm	30 min x 200 rpm	35 min x 190 rpm	35 min x 195 rpm	35 min x 200 rpm	40 min x 190 rpm	40 min x 195 rpm	40 min x 200 rpm
483 nm	0,4226	0,433	0,444	0,441	0,544	0,556	0,442	0,546	0,549
	0,428	0,431	0,44	0,442	0,543	0,557	0,442	0,545	0,548
	0,427	0,43	0,442	0,441	0,543	0,556	0,441	0,545	0,548
Promedio	0,426	0,431	0,442	0,441	0,543	0,556	0,442	0,545	0,548

**Anexo 6. Fórmula para cuantificación de betacianinas y betaxantinas
según Castellanos & Yahia (2008)**

$$B(\text{mg/g}) = \frac{A \times FD \times PM \times V}{\epsilon \times P \times L}$$

B = Betacianinas o betaxantinas

A= Absorbancias a 538 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas

FD= Factor de dilución al momento de leer en el espectrofotómetro

PM= Peso molecular (betanina = 550 g/mol e indicaxantina = 308 g/mol)

V = Volumen del extracto

ϵ = Coeficiente de extinción molar (betanina = 60 000 l/ mol x cm, e
indicaxantina 48 000 l/mol x cm)

P= Peso de semillas

L= Longitud de la celda (1 cm)

Anexo 7. Cálculos para determinar concentración de betacianinas y betaxantinas.

$$B(mg/g) = \frac{A \times FD \times PM \times V}{\epsilon \times P \times L}$$

$$B(mg/g) = \frac{0,804 \times 50 \times 550 \text{ g/mol} \times 95ml}{48\ 000 \text{ l/mol} \times cm \times 25g \times 1cm}$$

$$\text{Betacianinas} \left(\frac{mg}{g} \right) = 140,03 \text{ mg/100g}$$

$$B(mg/g) = \frac{0,4226 \times 50 \times 308 \text{ g/mol} \times 95ml}{48\ 000 \text{ l/mol} \times cm \times 25g \times 1cm}$$

$$\text{Betaxantinas} \left(\frac{mg}{g} \right) = 51,522 \text{ mg/100 g}$$

**Anexo 8. ANVA para betacianinas, betaxantinas y betalaínas según
diseño Box-Behnken.**

Análisis de varianza para betacianinas					
Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura (°C)	35,3637	1	35,3637	2,12	0,1738
B:Velocidad de agitación (rpm)	712,333	1	712,333	42,61	0,0000
C:Tiempo (min)	310,813	1	310,813	18,59	0,0012
Error total	183,896	11	16,7179		
Total (corr.)	1 242,41	14			

Análisis de varianza para betaxantinas					
Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura (°C)	2,09884	1	2,09884	1,03	0,3314
B:Velocidad de agitación (rpm)	125,021	1	125,021	61,50	0,0000
C:Tiempo (min)	50,0975	1	50,0975	24,64	0,0004
Error total	22,3622	11	2,03292		
Total (corr.)	199,58	14			

Análisis de varianza para betalaínas					
Fuente	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Temperatura (°C)	54,672	1	54,672	1,81	0,2057
B:Velocidad de agitación (rpm)	1 434,09	1	1 434,09	47,45	0,0000
C:Tiempo (min)	610,477	1	610,477	20,20	0,0009
Error total	332,466	11	30,2242		
Total (corr.)	2 431,71	14			

Anexo 9. ANVA para betacianinas, betaxantinas y betalaínas según diseño factorial

Análisis de varianza para betacianinas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo (min)	4 599,21	1	4 599,21	194,02	0,0000
B:Velocidad de agitación (rpm)	2 787,04	1	2 787,04	117,57	0,0000
AA	1 416,57	1	1 416,57	59,76	0,0000
AB	412,587	1	412,587	17,41	0,0004
BB	774,262	1	774,262	32,66	0,0000
Error total	497,805	21	23,705		
Total (corr.)	10 487,5	26			

Análisis de varianza para betaxantinas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo (min)	414,396	1	414,396	93,27	0,0000
B:Velocidad de agitación (rpm)	420,271	1	420,271	94,60	0,0000
AA	151,719	1	151,719	34,15	0,0000
AB	91,3711	1	91,3711	20,57	0,0002
BB	84,3107	1	84,3107	18,98	0,0003
Error total	93,2976	21	4,44274		
Total (corr.)	1 255,37	26			

Análisis de varianza para betalaínas

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo (min)	7 774,59	1	7 774,59	160,72	0,0000
B:Velocidad de agitación (rpm)	5 371,79	1	5 371,79	111,04	0,0000
AA	2 495,43	1	2 495,43	51,59	0,0000
AB	8 92,272	1	892,272	18,44	0,0003
BB	1 369,47	1	1 369,47	28,31	0,0000
Error total	1 015,87	21	48,3749		
Total (corr.)	1 8919,4	26			

Anexo 10. Cálculo del porcentaje de pigmento retenido, según Cai et al, 1998

$$\% P.R = \left(\frac{C.P.T_x}{C.P.T_0} \right) \times 100$$

% P.R = Porcentaje de pigmento retenido

C.P.T_x = Contenido de pigmento en el tiempo "x" (mg/100 g de peso de semilla)

C.P.T₀ = Contenido de pigmento en el tiempo cero (mg/100 g de peso de semilla)

$$\% P.R = \left(\frac{132,483}{137,998} \right) \times 100$$

$$\% P.R = 96,003$$

Anexo 11. Resultados del % del pigmento retenido a 4°C y 18°C

Temperatura refrigeración(4°C)									
N° de muestra	Betacianinas			Betaxantinas			Betalaínas		
	T _x	T ₀	% P.R	T _x	T ₀	% P.R	T _x	T ₀	% P.R
1	102,294	124,587	82,106	39,501	51,920	76,080	141,795	176,507	80,334
2	111,931	130,103	86,033	46,653	52,587	88,717	158,585	182,689	86,806
3	117,272	133,179	88,056	44,418	53,887	82,428	161,691	187,067	86,435
4	132,483	137,998	96,003	53,684	53,806	99,773	186,167	191,804	97,061
5	132,541	171,903	77,102	53,318	66,241	80,491	185,859	238,144	78,045
6	148,506	172,019	86,331	63,641	67,826	93,829	212,147	239,845	88,452
7	120,639	139,914	86,224	49,823	53,847	92,528	170,463	193,760	87,976
8	118,799	171,903	69,108	50,839	66,485	76,467	169,638	238,388	71,161
9	130,161	171,961	75,692	52,831	66,851	79,027	182,991	238,812	76,626

Temperatura ambiente (18°C)									
N° de muestra	Betacianinas			Betaxantinas			Betalaínas		
	T _x	T ₀	% P.R	T _x	T ₀	% P.R	T _x	T ₀	% P.R
1	70,770	124,587	56,803	40,476	51,920	77,959	111,246	176,507	63,026
2	75,704	130,103	58,188	40,436	52,587	76,893	116,140	182,689	63,573
3	88,883	133,179	66,739	53,806	53,887	99,849	142,689	187,067	76,277
4	80,523	137,998	58,351	53,034	53,806	98,565	133,557	191,804	69,632
5	75,298	171,903	43,803	48,360	66,241	73,006	123,658	238,144	51,926
6	91,612	172,019	53,257	54,172	67,826	79,868	145,783	239,845	60,782
7	67,054	139,914	47,925	38,241	53,847	71,019	105,295	193,760	54,343
8	53,121	171,903	30,902	40,029	66,485	60,208	93,150	238,388	39,075
9	56,117	171,961	32,633	45,637	66,851	68,267	101,754	238,812	42,608

Anexo 12. Prueba t para estabilidad de betacianinas, betaxantinas y betalaínas

Prueba t para estabilidad de betacianinas	
Estadístico t	-14,045
Valor -P	6,41011E-7

Prueba t para estabilidad de betaxantinas	
Estadístico t	-1,8184
Valor -P	0,106513

Prueba t para estabilidad de betalaínas	
Estadístico t	-9,78687
Valor -P	0,00000996707
