



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERIA EN ALIMENTOS
Y BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Tema: Optimización del proceso de extracción de antocianinas de los frutos de la colca
(*Miconia crocea*)

Trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Félix Roberto Jerez Chango

Tutor: PhD. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Orestes Darío López Hernández

Certifica:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de Titulación bajo la modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de Abril del 2021

PhD. Orestes Darío López Hernández

C.I.: 1754784864

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Jerez Chango Félix Roberto, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink on a light yellow background. The signature is cursive and appears to read 'Félix Jerez'.

Jerez Chango Félix Roberto

C.I. 180459131-9

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Cordova
Presidente del Tribunal

M.Sc. Jeanette Verónica Carrera Cevallos
CI: 1716192271

Ing.Mg. Juan de Dios Espinoza Moya
C.I: 1803201431

Ambato, 17 de Septiembre de 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Jerez Chango Félix Roberto

C.I. 180459131-9

AUTOR

DEDICATORIA

*A Venedicto y Rosa, mis padres,
este trabajo es para ustedes que siempre confían
en mí y me brindan su apoyo a cada momento.*

*A mi hermana Nancy y mi cuñado Klever, por estar siempre
presentes en todos los momentos importantes de mi vida.*

A Nayeli y Mailen, mis queridas sobrinas, mi fuente de inspiración.

A mis amigos y familiares que fueron parte de este proceso, ¡gracias!

AGRADECIMIENTOS

A la Comunidad Teligote, por permitirme realizar la recolección de los frutos de la colca en el Cerro Teligote y a Don Juanito por compartirme un poco de sus conocimientos en el uso de la colca.

A la Universidad Técnica de Ambato, a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por la formación académica.

A todos los maestros que me inculcaron el interés por las plantas a lo largo de mi carrera universitaria, en especial al Dr. Walter Simbaña.

A mi tutor PhD. Orestes López por su paciencia y apoyo en el desarrollo de mi tesis.

A todos mis amigos con los que compartimos experiencias y momentos dentro y fuera de clases.

ÍNDICE GENERAL.

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I	1
EL PROBLEMA.....	1
1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.2 JUSTIFICACIÓN	1
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivo específico.....	3
CAPITULO II.....	4
ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS	4
2.1 Generalidades de la familia Melastomataceae y el género Miconia.....	4
2.2 Taxonomía de <i>Miconia crocea</i> (Desr.) Naudin.	4
2.3 Importancia de <i>Miconia crocea</i>	6
2.4 Antocianinas	6
2.5 Disolventes.....	7
2.6 Metodología de superficie de respuesta (MSR).....	7
2.7 Diseño 2 ² para ajustar la superficie de respuesta.	8
2.8 HIPOTESIS.....	8
2.8.1 Hipótesis nula	8
2.8.2 Hipótesis alternativa	8
2.9 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES	8
2.9.1 Variables dependientes.....	8
2.9.2 Variables independientes.....	8

CAPÍTULO III	9
MATERIALES.....	9
3.1 Materiales.....	9
3.2 Reactivos.....	9
3.3 Equipos	9
METODOLOGÍA.....	9
3.4 Trabajo en el campo.....	9
3.5 Trabajo de laboratorio.....	10
3.5.1 Obtención de harina de colca.....	10
3.5.2 Obtención de extracto vegetal líquido	10
3.5.3 Determinación de sólidos totales	11
3.5.4 Análisis de los extractos vegetales mediante espectrofotometría.....	11
3.6 Procesamiento y análisis	12
3.6.1 Diseño experimental	12
CAPÍTULO IV	13
RESUTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1 Obtención de extractos de antocianinas.....	13
4.2 Análisis estadístico.....	14
4.3 Análisis de la eficiencia de la extracción.....	18
VERIFICACIÓN DE LA HIPOTESIS	19
CAPÍTULO V.....	20
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	20
5.1 Conclusiones.....	20
5.2 Recomendaciones	20
BIBLIOGRAFÍA	21
ANEXOS	32
6.1 Anexo 1. Datos de la extracción y concentración de antocianinas obtenidas por medio de Espectrofotometría UV-Vis.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Miconia crocea creciendo en su hábitat natural del Cerro Teligote, Cantón San Pedro de Pelileo, provincia de Tungurahua. Se puede observar las ramas con la corteza del tallo (A), hojas subcoriáceas (B), inflorescencia en cima con abundantes flores blanca y estambres amarillos (C) e infrutescencia con varios frutos maduros de color negro (D)	5
Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de antocianinas.....	15
Figura 3. a. Gráfico de efectos principales para antocianinas. b. Gráfico de interacción para la extracción de antocianinas.....	16
Figura 4. Superficie de respuesta estimada expresada en mg/100 g.	17

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la colca de acuerdo con el navegar taxonómico del Jardín Botánico de Misuri (Naudin, 1850), Estados Unidos.	5
Tabla 2. Estructura del diseño experimental.....	12
Tabla 3. Distribución de tratamientos.....	12
Tabla 4. Análisis de varianza para antocianinas extraídas a partir de colca.....	14
Tabla 5. Valores óptimos para los factores A y B	19

ÍNDICE DE ECUACIONES

Fórmula 1. Determinación de sólidos totales.....	11
Fórmula 2. Concentración de antocianinas.	11
Fórmula 3. Determinación de la concentración de antocianinas.....	16

RESUMEN

La investigación fue desarrollada con el objetivo de optimizar el proceso de extracción de antocianinas de los frutos de *Miconia crocea*, provenientes del Cerro Teligote, al sureste del cantón San Pedro de Pelileo, Provincia de Tungurahua. A los extractos del fruto seco pulverizado se aplicaron los análisis espectrofotométricos para poder cuantificar la concentración de antocianinas. Durante la optimización del proceso de extracción se empleó la metodología de superficie de respuesta con dos factores: A (disolvente) y B (relación material vegetal sobre volumen de disolvente). Para la extracción se trabajó con una temperatura de 70 grados Centígrados, durante 60 minutos. El disolvente que permitió obtener la mayor concentración de antocianinas fue la mezcla etanol con ácido clorhídrico (85:15). Con una relación material vegetal sobre volumen de disolvente 1:25, se alcanzó 29,39 mg de antocianinas por cada 100 g de material vegetal seco extraído.

Palabras clave: Cianidina, disolventes, antocianinas, colca, *Miconia crocea*.

ABSTRACT

The research was developed to optimize the anthocyanin extraction process from *Miconia crocea* fruits, from Cerro Teligote, southeast of the San Pedro de Pelileo canton, Tungurahua Province. Spectrophotometric analyzes were applied to the pulverized dried fruit extracts to be able to quantify the anthocyanin concentration. During the optimization of the extraction process, the response surface methodology was used with two factors: A (solvent) and B (ratio of plant material over the volume of solvent). For the extraction, a temperature of 70 degrees Celsius was used for 60 minutes. The solvent that allowed the highest anthocyanin concentration to be obtained was the ethanol mixture with hydrochloric acid (85:15). With a 1:25 ratio of plant material to solvent volume, 29.39 mg of anthocyanins were achieved for every 100 g of extracted dry plant material

Keywords: Cyanidin, solvents, anthocyanins, colca, *Miconia crocea*.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1 TEMA DE INVESTIGACIÓN

Optimización del proceso de extracción de antocianinas de los frutos de la colca (*Miconia crocea*).

1.2 JUSTIFICACIÓN

Mundialmente, las plantas son la base de la vida en el planeta tierra, de donde se extraen un gran número de productos metabólicos que son utilizados en la industria farmacéutica (Granda, 2005), alimentaria (Horvitz et al., 2017; Vilcacundo et al., 2018), medicinal (De Las Heras et al., 1998; Ruiz et al., 2010; Valarezo et al., 2013), entre otros. Además, entre los metabolitos secundarios de interés comercial se encuentran los terpenos, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (polifenoles). Estos últimos presentan múltiples propiedades como su capacidad anticarcinogénicas, antimutagénicas, antirradicales, antiaterogénicas, antimicrobianas, las mismas que pueden ser aprovechadas para el beneficio en la salud humana (Maurren & Prieto, 1999).

Los polifenoles que se extraen de las plantas pueden presentar variaciones estructurales (Collado, 2011), estas variaciones al parecer dependen de la especie de planta, factores como la zona geográfica, tipo de suelo (Valencia-Avilés et al., 2016). Según los números de anillos fenólicos y grupos hidroxilo enlazados, pueden clasificarse en ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, lignanos, estilbenos y flavonoides (Quiñones et al., 2012).

Dentro de los flavonoides, se hallan grupos de familias de pigmentos naturales muy importantes en el reino vegetal como la clorofila (Leyva, 2009) y las antocianinas (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul), tal vez estos compuestos están presentes en las plantas silvestres de interés alimentario, aunque escasos son los estudios llevados a cabo en Ecuador.

Con una superficie de 283.791 km², Ecuador es uno de los 17 países más megadiversos (Mittermeier et al., 1997) con mayor diversidad biológica por kilómetro cuadrado del mundo. Un ejemplo son las 17.548 especies de plantas vasculares (Ulloa-Ulloa et al., 2017) que alberga el país. La riqueza de esta diversidad vegetal también se ve reflejada en sus usos ancestrales para la mayoría de las culturas ecuatorianas. Según Balslev et al.,

(2008), de las 5172 especies útiles reportadas, el 60 % son medicinales, el 55 % son fuente de materiales, el 30 % son comestibles y el 20 % tienen usos sociales; estos porcentajes sobrepasan el 100 %, ya que varias de las especies disponen de múltiples usos tradicionales.

Ellos también manifiestan que, al considerar la distribución geográfica, el 42 % proviene del Oriente, el 47 % de los Andes y el 12 % de la Costa y las Islas Galápagos. Una de las especies de plantas con usos ancestrales en el Ecuador es *Miconia crocea* (Desr.) Naudin. Previos estudios fitoquímicos con especies del género *Miconia* ilustran una rica composición fenólica (Pieroni et al., 2011; Serna & Martínez, 2015), mientras las actividades biológicas sugieren acción analgésica, antimicrobiana, antipalúdica, antioxidante, antiinflamatoria, antinociceptiva, antimutagénica, acción antitumoral (Celotto et al., 2003; Cunha et al., 2008; Gatis-Carrazzoni et al., 2019; Rodrigues et al., 2008, 2011; Serpeloni et al., 2008, 2011; Spessoto et al., 2003) y antioxidante (Gontijo et al., 2019).

Miconia crocea de la familia Melastomataceae es una de las 200 a 254 especies (Freire & Fernández, 2002; Goldenberg et al., 2013; Ulloa & Fernández, 2015) que habitan en el país. La diversidad de usos etnobotánicos de *M. crocea* documentados (p. e. Balslev et al., 2008; Cerón, 2002; De la Torre et al., 2006), sugieren un buen modelo de planta nativa para el estudio de antocianinas. La especie se localiza en las provincias de Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha y Tungurahua, a una altitud desde 1000 a 4000 m.s.n.m. En Tungurahua ha sido reportada en el Cerro Teligote del cantón San Pedro de Pelileo. En diversas regiones de Ecuador, *M. crocea* ha recibido diferentes nombres: chukchu, killu yuyu, kullka, yamu chukchu (kichwa), amarillo, colquilla (castellano) (Balslev et al., 2008) o colca (Oleas et al., 2016; Ruales, 2013).

Bajo esta premisa, las investigaciones de la especie en Ecuador se han enfocado por ejemplo en la taxonomía (Goldenberg et al., 2013; Naudin, 1850), la etnobotánica (Balslev et al., 2008; De la Torre et al., 2006; Freire & Fernández, 2002), y la florística (Oleas et al., 2016; Ruales, 2013). A pesar que ancestralmente es utilizada con fin alimenticio, combustibles, materiales, y medicinales (Balslev et al., 2008), ningún estudio existe acerca de mejorar las condiciones operacionales que permitan extraer el contenido máximo de antocianinas de los frutos *M. crocea*.

En adición, la importancia de estudiar a la colca también radica en que en el Ecuador se ha producido un continuo empobrecimiento biológico y destrucción de los ecosistemas

existentes, particularmente en la región andina, con ello se pierden plantas nativas que pueden ser de interés industrial y que además fueron utilizadas antiguamente para tratar diversas afecciones y representan una fuente natural para la investigación científica (Lange et al., 1995), de conservación y restauración ecológica de los ecosistemas ecuatorianos.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Optimizar el proceso de extracción de antocianinas a partir de los frutos de la colca.

1.3.2 Objetivo específico

- Determinar las condiciones apropiadas para la extracción de antocianinas de los frutos de la colca mediante la aplicación de un diseño experimental.
- Evaluar la relación material vegetal-volumen de disolvente sobre la eficiencia de extracción de antocianinas de los frutos de colca.
- Determinar el contenido de antocianinas de los frutos de la colca.

CAPITULO II

ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

2.1 Generalidades de la familia Melastomataceae y el género *Miconia*.

La familia Melastomataceae incluye alrededor de 5 400 especies y 170 géneros (Conti et al., 1997; Goldenberg et al., 2015; Renner, 1989; Stone, 2006), presentes en el nuevo mundo. Esta familia es rica en ácidos fenólicos que presentan estructuras complejas como los taninos hidrolizables (Isaza et al., 2005).

Ecuador es hogar de 43 géneros y 553 especies, de éstos, 24 géneros y 124 especies fueron citados con alguna utilidad para el ser humano, así de las 124 especies, 27 (21,8 %) tienen utilidades alimenticias, 32 (25,8 %) son usadas para la construcción, 59 (47,6 %) son medicinales, 8 (6,4 %) tienen utilidad en rituales ancestrales, 4 (3,2 %) son ornamentales y 50 (40,3 %) tienen otros usos (Freire & Fernández, 2002). Además, constituyen elementos claves en los ecosistemas andinos, especialmente arriba de los 2 000 msnm (Balslev et al., 2008).

Para Goldenberg et al., (2013, 2018), *Miconia* es el género más grande dentro de las melastomatáceas y consta de 1 057 a 1 060 especies. Siendo muy polimórfico, es encontrado en forma de arbustos, hierbas o árboles, cuyo tamaño, oscilan entre 0,3 a 25 m de altura (Guerrero, 2019). Se distribuyen desde México a Argentina y Uruguay. No obstante, la más alta riqueza se halla en Colombia, Brasil, Ecuador y Venezuela (Goldenberg et al., 2018).

2.2 Taxonomía de *Miconia crocea* (Desr.) Naudin.

Miconia crocea, de hoy en adelante, citada en el texto como colca es un arbusto o árbol nativo que llega a medir 1,5 a 10 m de alto (Oleas et al., 2016 ; Ulloa & Fernández, 2015). Los tallos son teretes con corteza de color café grisácea (Fig. 1A). Sus hojas de 4,5–10,8 × 2–3,8 cm son simples, opuestas, ovado-elípticas a elíptico-lanceoladas, subcoriáceas, la base obtusa, los márgenes setuloso aserrados, el ápice agudo a ligeramente acuminado; el haz es lustrosos, glabro, mientras el envés densamente hirsuto en las axilas de los nervios primarios; pecíolos rojizos, 1–2,5 cm de largo (Fig. 1B).

Las flores de 6-7-meras, miden 6–8 mm de largo; hipanto terete, verde claro, 3–4 mm de largo; cáliz tubular, verde-rojizo, los lóbulos con dientes externos agudos, proyectados apicalmente; pétalos blancos, 2–3 mm de largo; estambres amarillos; estigma capitado (Fig.

1C). La infructescencia tiene numerosos frutos, el cual es una baya negra, jugosa (Fig. 1D); ápice del cáliz cuando seco, se repliega formando una reborde blanquecino; semillas numerosas (Ulloa & Fernández, 2015), oblongos triangulares en forma de cuña u ovoides (Ramírez & Mendoza, 2006).

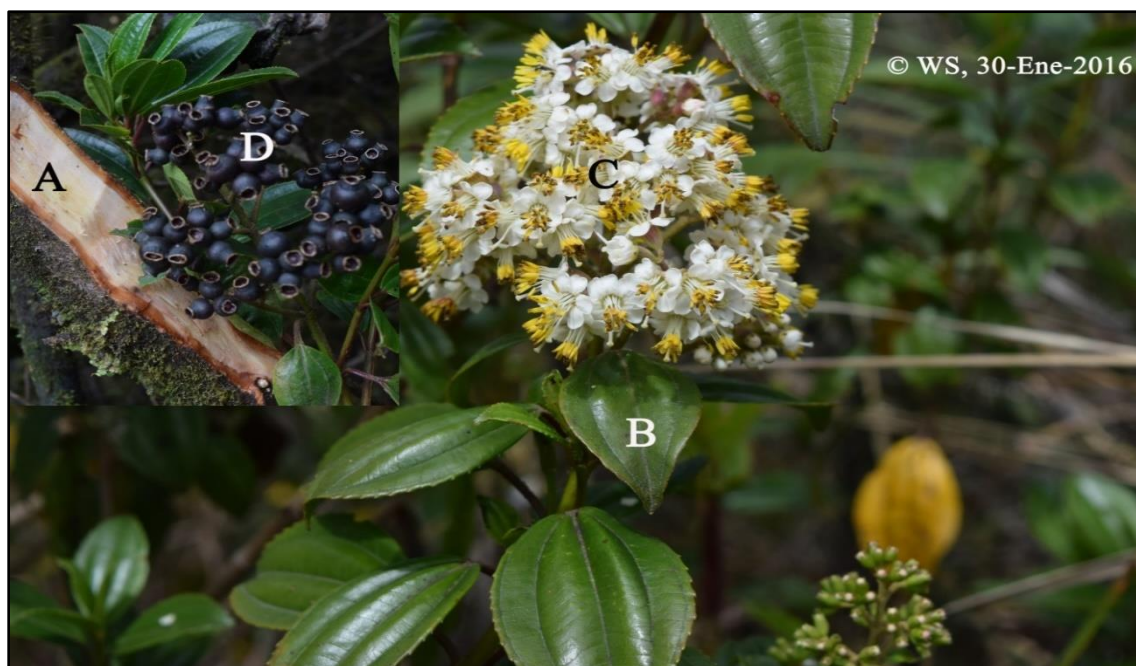


Figura 1. *Miconia crocea* creciendo en su hábitat natural del Cerro Teligote, Cantón San Pedro de Pelileo, provincia de Tungurahua. Se puede observar las ramas con la corteza del tallo (A), hojas subcoriáceas (B), inflorescencia en cima con abundantes flores blanca y estambres amarillos (C) e infructescencia con varios frutos maduros de color negro (D)

Por otro lado, la Tabla 1 muestra la clasificación de la colca, según la base de datos del Missouri Botanical Garden (www.tropicos.org).

Tabla 1. Taxonomía de la colca de acuerdo con el navegar taxonómico del Jardín Botánico de Misuri (Naudin, 1850), Estados Unidos.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Myrtales
Familia	Melastomataceae
Género	Miconia
Nombre científico	<i>Miconia crocea</i>

2.3 Importancia de *Miconia crocea*.

Desde tiempos históricos la colca es usada ancestralmente por las comunidades andinas del Ecuador. Por ejemplo, en Tungurahua se ha registrado como: combustible; medicinalmente, la infusión de las hojas y flores se bebe en ayunas para tratar afecciones del hígado; también para tratar parásitos intestinales (Balslev et al., 2008) y tintes naturales. Medicinalmente es empleada como vermífugo, para estimular las dilataciones durante el parto, curar dolores de garganta y cuello, tratar la tuberculosis, dolor de muelas, infecciones bucales, micosis, sarnas, además de curar la diarrea en niños recién nacidos. Otros usos incluyen en la construcción, fabricación de herramientas, producción de carbón, como combustible, y en la restauración de paisajes de Quito (Ruales, 2013). En adición, la comunidad de Salasaka utilizaba los frutos maduros y hojas de la colca con otras plantas como colorante natural (Simbaña & Vargas, 2020) para teñir sus atuendos como las bayetas, ponchos, anacos. El material vegetal de la colca usada por los Salasakas era obtenido en el Cerro Teligote.

2.4 Antocianinas

Las antocianinas son responsables de los colores azul, morado, rojo, y naranja, están presentes en los frutos, verduras y en las flores (Khoo et al., 2017; Li et al., 2017). Las antocianinas de colores rojo y azul localizadas en las partes reproductivas (flores y frutos), cumplen también funciones como la atracción a insectos y aves con el objetivo de actuar como polinizadores y dispersores de semillas. Además, son beneficiosos en la salud; y su interés se ha incrementado vertiginosamente en los últimos años (Li et al., 2017). Por ejemplo, disponen de propiedades farmacológicas para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades (Alcaide, 2015).

Actualmente se conocen más de 100 antocianinas (Collado, 2011), de estas, 6 son de interés en los alimentos, la pelargonidina, cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina y malvidina (Garzón, 2010). Las antocianinas poseen una estructura básica donde su núcleo está constituido por un flavonoide básico, característica que los coloca en la familia de los flavonoides (Collado, 2011). Este núcleo consta de dos anillos aromáticos unidos por una unidad de tres carbonos, el tipo de antocianidina depende directamente del nivel de hidroxilación y metilación que se presente en los anillos, las antocianidinas en las plantas se acumulan en su forma glucosilada (unidas a un azúcar) las cuales se denominan antocianinas (Ortíz et al., 2011).

Estos compuestos presentan una gran solubilidad y estabilidad, posesionándolos como un compuesto muy útil como colorante natural para la industria alimentaria. Las investigaciones en torno a las antocianinas y a las propiedades que posee se han intensificado en los últimos años no solo por la gama de colores que puede ofrecer, así como también por la capacidad como antioxidante y su utilidad frente a diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades coronarias entre otros (Isaza et al., 2005).

2.5 Disolventes

Los disolventes son compuestos químicos que se pueden presentar en forma sólida, gaseosa o líquida, esta última la más común (GIDOLQUIM, 2014). Estos compuestos se emplean para suspender, extraer o disolver otros materiales o compuestos de interés sin alterar químicamente los disolventes ni otros materiales (ChemicalSafetyFacts, 2020). Existe una gran variedad de disolventes clasificados de acuerdo con el grupo químico al que pertenecen.

Dentro de estos tenemos a los inorgánicos y los orgánicos. Los primeros son aquellos que se unen mediante enlace iónico y no suelen presentar elementos como carbono o hidrógeno, pueden presentar una gran variedad de elementos de la tabla periódica, tenemos a los ácidos minerales (ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, entre otros), álcalis (hidróxido sódico, fosfato sódico, amoníaco) (Gadea et al., 2007). En cambio los disolventes orgánicos, están basados a diferencia de los disolventes inorgánicos en carbono e hidrógeno (Gutiérrez, 2007) unidos mediante enlace covalente, entre los disolventes orgánicos tenemos a los hidrocarburos (alifáticos, acíclicos, aromáticos, halogenados), cetonas, ésteres, ácidos orgánicos, alcoholes, etc. (Fittema, 2020)

2.6 Metodología de superficie de respuesta (MSR).

Esta metodología es una estrategia experimental y de análisis. El objetivo principal es permitir al investigador encontrar las condiciones operacionales óptimas de un proceso (Gutiérrez & Salazar, 2008). Es utilizada cuando existe un parámetro importante que debe ser analizado, permitiendo comprender todos aquellos factores cuantitativos que determinan su comportamiento (Nóchez & Ventura, 2009).

La metodología de superficie de respuesta establece tres pasos a seguir. Primero, se busca plantear un experimento que arroje datos coherentes de la variable de respuesta, a continuación, se debe determinar un modelo matemático que se adapte a los datos y por

último se establece los valores que optimizan el valor de la variable respuesta (Sánchez, 2020).

2.7 Diseño 2^2 para ajustar la superficie de respuesta.

El diseño 2^2 es el primero de los diseños de la serie 2^k que permite analizar y ajustar la superficie de respuesta. Maneja únicamente dos factores A y B, cada uno de estos factores contiene dos niveles, alto (+) y bajo (-) (Nóchez & Ventura, 2009). Adicionalmente este diseño permite estudiar efectos lineales, de interacción y los efectos cuadráticos, además se utiliza para estudiar una región que se piensa sea más compleja o cuando se espera que el punto óptimo está dentro de la región experimental (Gutiérrez & Salazar, 2008).

2.8 HIPOTESIS

2.8.1 Hipótesis nula

No se determinarán las condiciones adecuadas para el proceso de extracción de antocianinas a partir de los frutos de la colca (*Miconia crocea*).

2.8.2 Hipótesis alternativa

Se determinarán las condiciones adecuadas para el proceso de extracción de antocianinas a partir de los frutos de la colca (*Miconia crocea*).

2.9 SEÑALAMIENTO DE VARIABLES

2.9.1 Variables dependientes

Eficiencia de extracción, % de sólidos totales, concentración de antocianinas.

2.9.2 Variables independientes

Tiempo de extracción (60 minutos), temperatura (70 °C), relación material vegetal / disolvente.

CAPÍTULO III

MATERIALES

3.1 Materiales

- Frascos ámbar, tubos falcón
- Magnetos Elicrom
- Material de escritorio
- Material de vidrio: balones de aforo, matraces Erlenmeyer, probetas graduadas, vasos de precipitación, pipetas.
- Papel Aluminio

3.2 Reactivos

- Ácido clorhídrico Fisher al 37 %
- Etanol al 96 % de pureza Scharlau
- Ácido cítrico

3.3 Equipos

- Balanza analítica OhausPionner
- Balanza de humedad Kern MLS 50-3
- Centrifuga (Hettich Zentrifugen, Germany)
- Destilador de agua QUIMIS
- Espectrofotómetro UV – VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Horno secador GANDER MTN
- Molino de cuchillas INOX – EQUIP
- Plancha de calentamiento ThermoScientific
- Refrigerador Indurama

METODOLOGÍA

3.4 Trabajo en el campo

Entre el 2018-2019, frutos maduros de individuos adultos fueron colectados en el bosque andino del Cerro Teligote, específicamente en el sector La Cruz (1°22'09.00" S; 78°33'36.3"

O; 3304 m.s.n.m), localizado en la comunidad de Teligote, aproximadamente a 6,5 km al suroeste del cantón San Pedro de Pelileo.

Los frutos colectados se guardaron en el interior de una funda plástica ziploc y se transportó a los laboratorios de la FCIAB-UTA para su posterior procesamiento.

3.5 Trabajo de laboratorio

3.5.1 Obtención de harina de colca

El tratamiento de la materia prima se realizó en los laboratorios de la UODIDE-ICIA anexa a la FCIAB. Una vez en los laboratorios, los frutos colectados se colocaron en el horno secador (Garder MTN), por 24 horas a una temperatura de 60 °C y se obtuvo la fruta seca. Luego, el fruto seco fue sometido a un proceso de molienda en un molino de cuchillas INOX – EQUIP. Finalmente, el polvo fino se guardó en una funda plástica ziploc para subsecuentes estudios.

3.5.2 Obtención de extracto vegetal líquido

En la extracción de antocianinas se tomó en cuenta dos factores: relación material vegetal / disolvente (etanol – ácido cítrico y etanol – ácido clorhídrico). Ambos factores fueron sujetos a una temperatura de 70 °C, por un tiempo de 60 minutos, y se realizó 3 réplicas de cada uno. En la preparación de los dos disolventes se utilizó, para el primero etanol al 96 % de pureza con ácido clorhídrico al 37 % en relación 85:15 y para el segundo se empleó etanol al 96 % de pureza con ácido cítrico (comercial) en relación 50 ml: 21,0350 g.

En la preparación de la materia vegetal / volumen de disolvente se pesó 2 g de muestra en una balanza analítica marca OhausPionner y se midió 50 ml de disolvente para la relación 1/20, en la relación 1/25 se pesó 2,5 g de muestra en 50 ml de disolvente. Estas soluciones preparadas se colocaron en matraces Erlenmeyer marca Pyrex® debidamente cubiertas con papel aluminio evitando la evaporación del disolvente y protegiendo la degradación del compuesto bioactivo.

El matraz Erlenmeyer se colocó en una plancha de calentamiento (TermoScientific) durante 60 minutos a una temperatura de 70 °C con agitación. Luego de terminar el tiempo de extracción se colocó la solución en tubos falcón de 50 ml y se llevó a la centrifuga a 3000 rpm, por 10 minutos, el sobrenadante de las muestras centrifugadas se colocó en frascos ámbar y se desechó el precipitado.

3.5.3 Determinación de sólidos totales

Para realizar la determinación de sólidos totales de las extracciones se manejó una balanza de humedad marca Kern MLS 50-3, donde se efectuó los análisis por triplicado. El valor de sólidos totales extraídos (%SST) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%SST=100 - \% \text{ Humedad}$$

Fórmula 1. Determinación de sólidos totales.

3.5.4 Análisis de los extractos vegetales mediante espectrofotometría

Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientificacu SkanGo para determinar la absorbancia de cada extracto, utilizando etanol como blanco. Para determinar la longitud de onda se realizó un barrido espectral empleando un rango de 300 a 800 nm. Esto permitió encontrar el punto donde la absorbancia del analito se maximiza que es en 535 nm. Así mismo, se utilizó esta longitud de onda para poder cuantificar de manera correcta el contenido de antocianinas del extracto.

La cuantificación de antocianinas se realizó mediante el modelo descrito en (Abdel-Aal & Hucl, 1999) con la siguiente ecuación:

$$C = \frac{A}{\varepsilon} \times \frac{Vol}{1000} \times MW \times \frac{1}{samplewt} \times 10^6$$

Fórmula 2. Concentración de antocianinas.

Donde:

C = Concentración de antocianinas expresadas en mg/100 g.

A = Absorbancia.

ε = Absortividad molar del compuesto cianidina 3 glucósido 25,965 $c^{-1}M^{-1}$

Vol = Volumen total del extracto de antocianinas.

MW = Peso molecular de cianidina 3 glucósido 449 g/mol

3.6 Procesamiento y análisis

3.6.1 Diseño experimental

Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos se analizaron mediante un software estadístico Statgraphics Centurión versión XVII.I. Los datos al ser analizados estadísticamente proporcionaron evidencias objetivas que permitirán reconocer los factores que afectan a la extracción de antocianinas.

El diseño experimental fue un diseño 2^2 (A x B) con tres réplicas de cada uno de los tratamientos. Se aplicó la metodología de superficie de respuesta lo que permitió encontrar las condiciones óptimas del proceso.

Tabla 2. Estructura del diseño experimental.

FACTORES (A x B)	NIVELES
A: Disolvente	F1= Etanol – Ácido Cítrico
	F2= Etanol – Ácido Clorhídrico
B: Relación material vegetal / volumen del disolvente.	R3= Relación 1:20
	R4= Relación 1:25

Elaborado por: Jerez, 2020

Tabla 3. Distribución de tratamientos.

INTERACCIÓN	TRATAMIENTO
F1R3	Etanol – Ácido Cítrico, Relación 1:20
F1R4	Etanol – Ácido Cítrico, Relación 1:25
F2R3	Etanol – Ácido Clorhídrico, Relación 1:20
F2R4	Etanol – Ácido Clorhídrico, Relación 1:25

Elaborado por: Jerez, 2020

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de extractos de antocianinas.

En el proceso de extracción de antocianinas de la colca, se realizó mediante el estudio de dos factores: disolvente (factor A) relación material vegetal / volumen de disolvente (factor B). La extracción de antocianinas es un proceso importante que se ve influenciado por varios factores, tales como el pH, conformación química, luz, el oxígeno, la copigmentación, la polimerización, la temperatura y el tiempo de extracción (Cabezas, 2019; Herrera, 2017; Limaymanta & Ramos, 2016), entre otros.

En el caso de la temperatura es un factor que está relacionado directamente con la degradación de las antocianinas, estas resisten bien procesos a altas temperaturas durante cortos periodos de tiempo (Zapata, 2014), un temperatura adecuada favorece la extracción de antocianinas gracias a que inactiva la actividad hidrolítica de la polifenol oxidasa (Ongkowijoyo et al., 2018). Estudios que se han realizado demuestran que la mayor concentración de antocianinas ha sido obtenida a 70 °C de temperatura (Flores, 2017; Moreno, 2020; Muñoz et al., 2015; Ramos, 2019; Saavedra & Símpalo, 2018). Además, otro factor que se debe tomar en cuenta es el área de contacto, según Limaymanta & Ramos, (2016), al aumentar el área de contacto se disminuye el tiempo de extracción por lo tanto al obtener el polvo fino de los frutos de la colca seca ayudo a reducir el tiempo de reacción, estudios descritos en (Aranda, 2018; Burgos & Ibañez, 2016; Cabezas, 2019; Sánchez, 2017), manifiestan haber obtenido altas concentraciones de antocianinas a un tiempo de 60 minutos.

Las moléculas de antocianinas son hidrofílicas es decir, tienen un carácter polar por la presencia de grupos hidroxilo lo que permite su alta solubilidad en varios solventes como acetona, agua y alcoholes (Burgos & Ibañez, 2016). Es por ello que en la extracción sólido – líquido realizada se utilizó etanol al 96% para facilitar la solubilidad, el etanol es el más utilizado para este tipo de extracciones por su baja toxicidad (Limaymanta & Ramos, 2016).

Por otra parte, el núcleo flavilio de las moléculas de las antocianinas es muy reactivo por la deficiencia de electrones que presenta (Burgos & Ibañez, 2016), por lo tanto, su estabilidad está ligada a cambios del pH. Las antocianinas a un pH superior a 7 sufren oxidación con el aire por lo que se degradan fácilmente, a pH de 4 a 6 podría terminar en la degradación de la antocianina produciendo moléculas inestables como la pseudo base

carbinol y chalcona, a un pH de 1 a 2 predomina el catión flavilio que es una de las estructuras de las antocianinas más estables (Herrera, 2017).

Para favorecer tanto la solubilidad como la estabilidad y protección de las antocianinas extraídas se formó una mezcla azeotrópica utilizando etanol - ácido clorhídrico y etanol - ácido cítrico buscando alcanzar un pH de 1 a 2 en donde los extractos de antocianinas son más estables.

Los extractos de antocianinas fueron cuantificados por espectroscopia UV-VIS (Anexo 1), las moléculas de antocianinas pueden presentar picos de absorción en la región visible (pelargonidina, pelargonidina-3-glucósido, cianidina, cianidina-3-glucósido, delphinidina, delphinidina-3-glucósido) como en la ultravioleta (derivados acilados) (Cabezas, 2019). Mediante un barrido espectral se encontró el pico más alto perteneciente a la cianidina-3-glucósido ($C_{21}H_{21}O_{11}$) la cual absorbe a 535 nm, es soluble en HCl diluido en medio alcohólico y se descompone a 205 °C sin fundir (Guerra & Ortega, 2006), es uno de los compuestos con mayor interés en el campo de la medicina por su actividad antioxidante (Kuskoski et al., 2004) y es la antocianina más común que se encuentra en frutas y verduras (Adaku et al., 2020).

4.2 Análisis estadístico.

Luego de cuantificar los extractos de antocianinas se ejecutó un diseño experimental de superficie de respuesta, utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión XVI.I para establecer las condiciones óptimas para maximizar la concentración de antocianinas extraídas. En la tabla 4 se observa el análisis de varianza ANOVA para antocianinas realizado a los resultados del diseño experimental.

Tabla 4. Análisis de varianza para antocianinas extraídas a partir de colca.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Disolvente	363,66	1	363,66	2037,22	0,0000
B: RMVVD	23,52	1	23,52	131,76	0,0000
AB	3,2448	1	3,2448	18,18	0,0053
bloques	0,570417	2	0,285208	1,60	0,2778
Error total	1,07105	6	0,178508		
Total (corr.)	392,067	11			

Mediante el análisis de varianza, se observa que los dos factores analizados A (disolvente) y B (relación material vegetal / volumen de disolvente), muestran una influencia significativa en la variable de respuesta con un valor $p \leq 0,005$. Además, la interacción de los factores A y B también influyo directamente según el análisis de la tabla 4.

Para verificar los resultados obtenidos en la tabla ANOVA, tenemos el diagrama de Pareto (Figura 2), este diagrama es una herramienta muy útil que permite detectar aquellos factores que representan mayor influencia, estos factores están representados de forma decreciente (Sales, 2013). De esta manera se observa en la Figura 2 el factor A, o sea, el disolvente es el que presenta una influencia muchísimo mayor en la extracción de antocianinas. Por otro lado, tenemos que el factor B (RMVVD) que tiene una menor influencia en la extracción comparada a la que tiene el factor A. La interacción de los factores A y B es la que presenta la menor influencia al proceso de extracción debido a que la barra que corresponde a esta interacción no sobrepasa de manera amplia la línea vertical que indica el nivel de significancia (0,05).

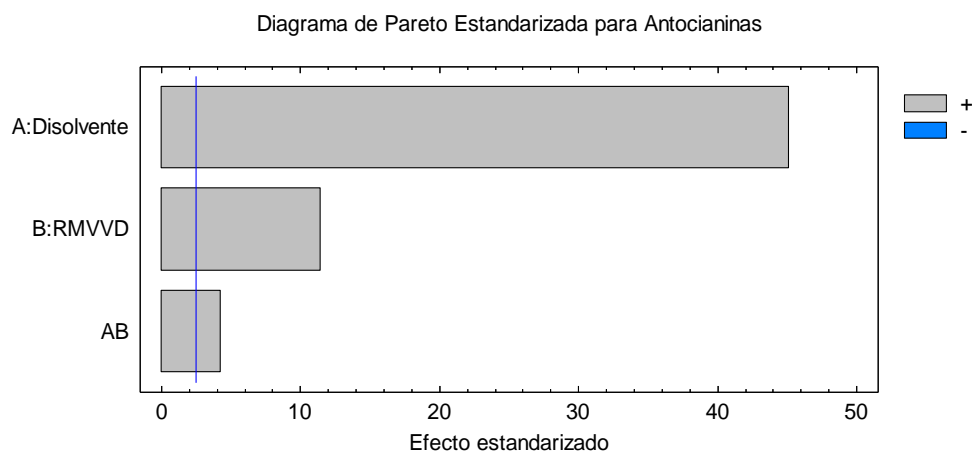


Figura 2. Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de antocianinas

El coeficiente de determinación (R^2) se lo utiliza para medir la variabilidad de los datos obtenidos, los valores cercanos al 100 % son considerados óptimos, aunque también se acepta valores de por lo menos 70 % para fines predictivos (Gutiérrez & Salazar, 2008). Durante el análisis de varianza ANOVA de la extracción de antocianinas, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9973, esto indica que el modelo obtenido es capaz de explicar el 99,73 % de las variaciones en los contenidos de antocianinas, por lo tanto, este porcentaje sugiere que R^2 presenta un valor óptimo y que los factores estudiados junto con su interacción

presentan un alto grado de correlación con los valores que pronostica el modelo y los valores obtenidos. Los valores logrados son superiores a los obtenidos en estudios similares desarrollados por (Anuar et al., 2013) donde alcanzaron un coeficiente de determinación de 0,895 en un estudio realizado para la optimización de los parámetros de extracción mediante metodología de superficie de respuesta.

El modelo ajustado al contenido de antocianinas presento la siguiente ecuación con la cual se podrá predecir la concentración de antocianinas que se logrará extraer en base al disolvente y con RMVVD = relación material vegetal / volumen de disolvente.

$$\text{Concentración de antocianinas} = 9,27833 + 0,825 * \text{Disolvente} + 0,56 * \text{RMVVD} + 0,208 * \text{Disolvente} * \text{RMVVD}$$

Fórmula 3. Determinación de la concentración de antocianinas.

En la figura 3 se muestra el gráfico de los efectos principales para las antocianinas además de la gráfica de interacción.

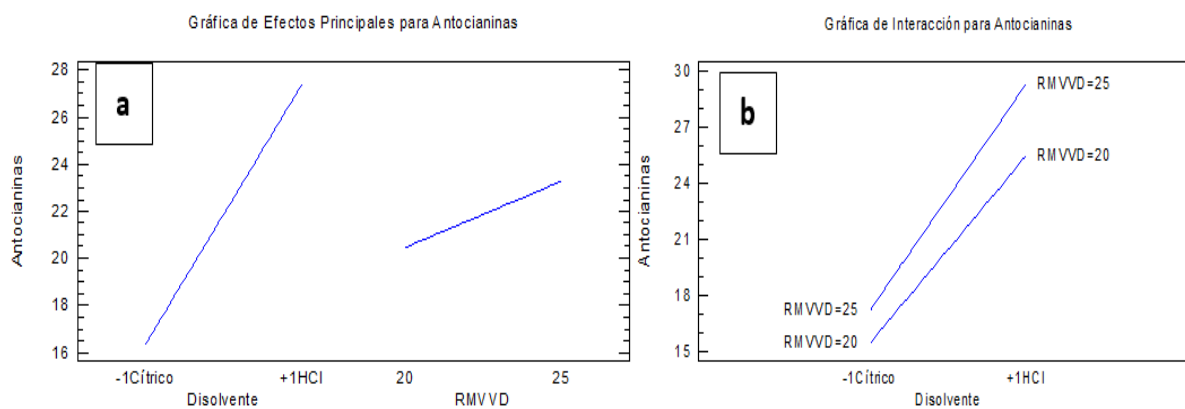


Figura 3. a. Gráfico de efectos principales para antocianinas. b. Gráfico de interacción para la extracción de antocianinas.

La grafica de efectos principales permite al investigador inspeccionar las variaciones entre las medias de nivel para uno o más factores, cuanto más inclinada sea la pendiente de la línea mayor será la magnitud del efecto principal (Catarina, 2019; Minitab, 2019). Para el efecto del disolvente se observa en la figura 3a, que mediante el etanol – HCl se consigue una mayor concentración de antocianinas, en cambio con el disolvente etanol – ácido cítrico se obtiene

una concentración de antocianinas mucho menor, la diferencia entre las concentraciones de antocianinas obtenidas con los dos disolventes es comparativamente grande.

En el caso de la RMVVD se muestra que se obtiene una mayor concentración con la relación 1:25, la diferencia es relativamente pequeña respecto a la relación 1:20, pero demuestra que al aumentar la RMVVD aumenta la concentración de antocianinas. Los resultados del presente estudio concuerdan con (Moreno, 2020), quien encontró que existe una relación directamente proporcional, es decir, el aumento de relación material vegetal / volumen de disolvente, aumenta la concentración de antocianinas extraídas.

Mediante la gráfica de interacción se puede interpretar la interacción existente entre factores (Catarina, 2019), así se puede evidenciar claramente en la figura 3b que no existe un cruce de las líneas por lo tanto no hay interacción entre estos dos factores, pero también se observa que tanto con la RMVVD 1:20 y 1:25 utilizando el disolvente etanol – HCl se obtiene mayores concentraciones a diferencia del disolvente etanol – ácido cítrico, es decir el factor disolvente tiene un efecto mucho más significativo que la RMVVD.

En la figura 4 se muestra el gráfico de superficie de respuesta que esta expresada en mg/100 g, donde se refleja de manera más clara los parámetros que afectan de manera efectiva a la variable de respuesta.

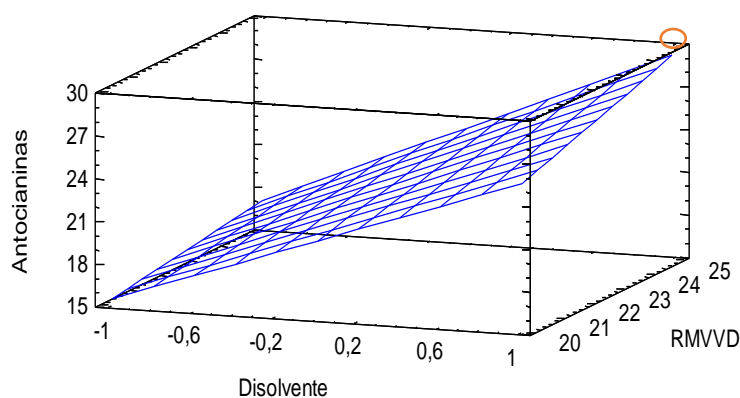


Figura 4. Superficie de respuesta estimada expresada en mg/100 g.

Mediante el análisis del gráfico de superficie de respuesta se determinó la concentración de antocianinas. Así tenemos con el disolvente etanol – ácido cítrico en RMVVD 1:25 se obtuvo

una concentración de antocianinas de 17,69 mg de antocianinas /100 g sólidos extraídos, en cambio en las extracciones realizadas con etanol - ácido clorhídrico, en una relación material vegetal / volumen de disolvente 1:25 se alcanzó 29,39 mg de antocianinas / 100 g de sólidos extraídos. Esta última concentración fue la más alta, resultando ser el mejor disolvente y la mejor RMVVD para la extracción de antocianinas de la colca, esto implica que al establecer y controlar de manera eficiente estos parámetros para realizar la extracción se alcanzara las condiciones óptimas y las concentraciones de antocianinas más altas.

Por otro lado, el contenido de antocianinas obtenido en este estudio fue inferior al reportado por Adaku et al., (2020), ya que en su estudio referente al perfil de antocianinas y actividad antioxidante de las hojas de *Dissotis brazzae* Cogn (Melastomataceae) fue de 317 mg de antocianinas / 100 g de peso fresco. Otro estudio realizado por Gordon et al., (2011) acerca de la caracterización química y capacidad antioxidante de las bayas de *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart (Melastomataceae) reporto $11,68 \pm 0,56$ mg / 100 g de peso fresco, estos valores pueden atribuirse a la eficiencia de los métodos utilizados para la extracción, así como el material vegetal que a pesar de pertenecer a la misma familia de la colca (Melastomataceae) presentan diferentes concentraciones de antocianinas en gran parte debido a las condiciones ambientales en las que crecen (Bonilla, 2002).

Es importante mencionar que la cantidad de antocianinas extraídas a partir de los frutos de la colca es superior o igual a varios frutos existentes en el mercado, tenemos así los arándanos que tienen una concentración en la cascara de 7 a 35,69 mg / 100 g (Ramirez Arroyo, 2020), capulí (*Prunus serotina*) tiene una concentración de 32,749 mg /100 g de material vegetal seco (Mejía, 2019), las moras y fresas presentan concentraciones de 1,0 mg/g y 0,8 mg/g respectivamente (Rimpapa et al., 2007), sangorache (*Amaranthus quitensis*) con 7,89 mg/100 g de material seco (Riera, 2020), en el frejol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) presenta 7,3 mg de antocianinas /100 g de material seco, con estos datos se puede apreciar el gran potencial que tiene la colca como fuente de antocianinas que es equiparable a frutas muy conocidas como el arándano y el capulí.

4.3 Análisis de la eficiencia de la extracción.

La eficiencia de la extracción además de las ya mencionadas anteriormente depende en gran medida del contenido de antocianinas que tenga la colca. La tabla 5 contiene los valores óptimos para los factores A y B.

Tabla 5. Valores óptimos para los factores A y B

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Disolvente	-1,0	1,0	1,0
RMVVD	20,0	25,0	25,0

Los parámetros óptimos que determinan la mayor concentración de antocianinas de los frutos de la colca corresponden a la elección del disolvente, esto es crucial debido a la alta reactividad de la molécula de antocianina (Ongkowijoyo et al., 2018) además la mezcla isotrópica (etanol - HCl) y la relación 1:25, esto se debe a la característica propia que posee cada mezcla isotrópica, la que presenta el mayor rendimiento está compuesta por un compuesto inorgánico como el HCl, que gracias a su característica ácida (CisProQuim, 2005) puede mantener un pH favorable para la estabilidad del extracto de antocianinas. En estudios realizados por (Limaymanta & Ramos, 2016; Moreno, 2020; Ramos, 2019; Sangoluisa-Tipan et al., 2019) demuestran que se obtiene altas concentraciones de antocianinas con el uso de etanol – HCl.

El pH alcanzado por las dos mezclas isotrópicas es similar (pH = 1,37), es decir las dos soluciones si alcanzan en pH necesario para poder mantener el extracto de antocianina estable y protegido de factores degradativos, por lo tanto principal diferencia de extracción se debe básicamente a las características del solvente utilizado, esto concuerda con (Sangoluisa-Tipan et al., 2019) que concluye que el solvente acidificado con HCl es el más eficiente en el proceso de extracción de antocianinas seguido del solvente acidificado con ácido cítrico.

VERIFICACIÓN DE LA HIPOTESIS

Se analizo los datos obtenidos en la extracción de antocianinas y se determinó las condiciones adecuadas para dicho proceso.

- La hipótesis nula se rechaza.
- La hipótesis alternativa se acepta, por lo tanto, se determinó las condiciones adecuadas para el proceso de extracción de antocianinas a partir de los frutos de la colca.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logró la extracción de antocianinas de los frutos de la colca procedentes del cerro Teligote, donde se alcanzó a extraer la máxima concentración de antocianinas al controlar los escenarios estratégicos de extracción: disolvente y relación material vegetal / volumen de disolvente.
- Se determinó la concentración de antocianinas presentes en los frutos de la colca, en estudios experimentales a temperatura de 70 °C, en un tiempo de 60 min empleando como disolvente etanol – ácido clorhídrico se logró la concentración más alta 29,39 mg de antocianinas / 100 g de sólidos extraídos, por otro lado, se alcanzó la concentración más baja al emplear como disolvente etanol – ácido cítrico teniendo una concentración de antocianinas de 17,69 mg de antocianinas /100 g sólidos extraídos, en RMVVD 1:25 para las dos disolventes.
- Se logró establecer las condiciones que intervienen en el proceso de extracción de antocianinas de la colca, la mayor eficiencia se obtuvo con la relación 1 gramo de material vegetal por cada 25 ml de disolvente y con etanol acidificado con ácido clorhídrico en relación (85:15), donde el modelo estadístico mejoró el valor óptimo de concentración de antocianinas en 29,30 mg de antocianinas / 100 g de sólidos extraídos.

5.2 Recomendaciones

- Microencapsular el extracto de antocianinas y realizar el estudio de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria de las antocianinas que presenta la colca.
- Evaluar la estabilidad de las antocianinas a diferentes temperaturas, tiempos y diferentes pH.
- Desarrollar ensayos que permitan evaluar la eficiencia de extracción de antocianinas de diferentes métodos de extracción convencional y no convencional.
- Continuar evaluando el contenido de compuestos bioactivos de la gran variedad de plantas y frutos existentes en el cerro Teligote.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Aal, E. S. M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal Chemistry*, 76(3), 350–354. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.1999.76.3.350>
- Adaku, C., Skaar, I., Byamukama, R., Gumisiriza, H., Jordheim, M., Andersen, O. M., ... Anthocyanin, A. (2020). Profile and Antioxidant Activity of Edible Leaves of *Dissotis brazzae* Cogn (Melastomataceae). *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 8(6), 139–145. <https://doi.org/10.11648/j.jfns.20200806.11>
- Alcaide Molina, A. J. (2015). *Caracterización de polifenoles y su acción sobre sirtuínas en modelos de inflamación intestinal y cáncer*. Retrieved from <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/68135/2015alcaicarac.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Anuar, N., Mohd Adnan, A. F., Saat, N., Aziz, N., & Mat Taha, R. (2013). Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, purification, and identification of anthocyanin pigments in melastoma malabathricum fruit. *The Scientific World Journal*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/810547>
- Aranda Núñez, C. I. (2018). “*Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de papas nativas (Solanum spp.), variedades Puca-shungo y Yana-shungo*” (UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO). Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27504/4/BQ_145.pdf
- Balslev, H., Navarrete, H., de la Torre, L., Macía, M. J., Macía, M. J., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*.
- Bonilla Osma, A. F. (2002). *Caracterización de los pigmentos en los primordios foliares de Miconia Biappendiculata y Clusia multiflora de un bosque andino*. (Pontificia Universidad Javeriana.). Retrieved from <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8538/tesis49.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Burgos Aguilar, M. P., & Ibañez Ahuanari, E. A. (2016). *Optimización para la extraacción de antocianinas en Vaccinium corymbosum L. (Arándano)* (UNIVERSIDAD

- NACIONAL DE TRUJILLO.). Retrieved from http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3476/Burgos_Aguilar_Martha_Paola.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cabezas Dipaz, M. (2019). *Efecto de los parámetros de extracción acuosa de antocianinas de tres procedencias de la coronta de maíz morado (Zea Mays L.)* (UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN). Retrieved from https://repositorio.upeu.edu.pe/bitstream/handle/UPEU/1727/Monica_Tesis_Licenciatura_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Catarina. (2019). *ANÁLISIS Y RESULTADOS*. Retrieved from http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lmnf/de_d_ac/capitulo5.pdf
- Celotto, A. C., Nazario, D. Z., De Almeida Spessoto, M., Gomes Martins, C. H., & Cunha, W. R. (2003). Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(4), 339–340. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400010>
- Cerón, C. E. (2002). La etnobotánica en el Ecuador. *Cinchonia*, 3(2 SRC-BaiduScholar FG-0), 1–16.
- ChemicalSafetyFacts. (2020). Propiedades y usos de los disolventes | Información sobre la Seguridad Química. Retrieved November 19, 2020, from <https://www.chemicalsafetyfacts.org/es/disolventes/>
- CisProQuim. (2005). *HOJA DE DATOS DE SEGURIDAD ACIDO CLORHIDRICO LIQUIDO*.
- Collado González, J. (2011). *Identificación de los polifenoles en zumos de frutas rojas*.
- Conti, E., Graham, S. A., Litt, A., Wilson, P. G., Briggs, B. G., Johnson, L. A. S., & Conti, E. (1997). Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. *Systematic Botany*, 22. <https://doi.org/10.2307/2419432>
- Cunha, W. R., Silva, M. L. A., Santos, F. M. D., Montenegro, Í. M., Oliveira, A. R. A., Tavares, H. R., ... Bizário, J. C. D. S. (2008). In vitro inhibition of tumor cell growth by *miconia fallax*. *Pharmaceutical Biology*, 46(4), 292–294.

<https://doi.org/10.1080/13880200701741245>

- De la Torre, L., Muriel, P., & Balslev, H. (2006). Etnobotánica en los Andes del Ecuador. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*. Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, 246–267. Retrieved from c:%5CUsers%5CUusuario%5CDocuments%5CBibliografia Etnobotanica%5CTorre de la et a.2006.Etnobotanica en los Andes del Ecuador.pdf
- De Las Heras, B., Slowing, K., Benedí, J., Carretero, E., Ortega, T., Toledo, C., ... Chiriboga, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. In *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 61). Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198000294>
- Fittema. (2020). *Antena de transferencia de tecnología-Disolventes*.
- Flores, E. (2017). Extracción de Antioxidantes de las Bayas del Sauco (*Sambucus nigra* L. subsp. peruviana) con Ultrasonido, Microondas, Enzimas y Maceración para la Obtención de Zumos Funcionales. *Informacion Tecnologica*, 28(1), 121–132. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000100012>
- Freire, Al., & Fernández, D. (2002). *Usos de Melastomataceae en el Ecuador*. (July 2002). Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/303289507>
- Gadea, R., Romano, D., & Santos, T. (2007). *Sustitución de sustancias disolventes peligrosas - GUÍA PARA DELEGADOS Y DELEGADAS DE PREVENCIÓN*.
- Garzón, G. A. (2010). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión. *Acta Biologica Colombiana*, 13(3), 27–36.
- Gatis-Carrazzoni, A. S. S. G., Mota, F. V. B., Leite, T. C. C., de Oliveira, T. B., da Silva, S. C., Bastos, I. V. A., ... da Silva, T. G. (2019). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaf methanol extract of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. and characterization of compounds by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(1), 55–68. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1561-x>
- GIDOLQUIM. (2014). Aspectos generales | Técnicas y operaciones avanzadas en el

- laboratorio químico (TALQ). Retrieved November 18, 2020, from <http://www.ub.edu/talq/es/node/194>
- Goldenberg, R., Almeda, F., Caddah, M. K., Martins, A. B., Meirelles, J., Michelangeli, F. A., & Weiss, M. (2013). Nomenclator botanicus for the neotropical genus *Miconia* (Melastomataceae: Miconieae). *Phytotaxa*, *106*(1), 1–171. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.106.1.1>
- Goldenberg, R., Almeda, F., Michelangeli, F., Sosa, K., & Ribeiro, R. C. (2015). *Rupestrea*: A New Brazilian Genus of Melastomataceae, with Anomalous Seeds and Dry Indehiscent Fruits. *Ingentaconnect.Com*. <https://doi.org/10.1600/036364415X688862>
- Goldenberg, R., Reginato, M., & Michelangeli, F. A. (2018). Disentangling the infrageneric classification of megadiverse taxa from Mata Atlantica: Phylogeny of *Miconia* section *Chaenantha* (Melastomataceae: Miconieae). *Taxon*, *67*(3), 537–551. <https://doi.org/10.12705/673.15>
- Gontijo, D. C., Gontijo, P. C., Brandão, G. C., Diaz, M. A. N., de Oliveira, A. B., Fietto, L. G., & Leite, J. P. V. (2019). Antioxidant study indicative of antibacterial and antimutagenic activities of an ellagitannin-rich aqueous extract from the leaves of *Miconia latecrenata*. *Journal of Ethnopharmacology*, *236*(March), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.03.007>
- Gordon, A., Schadow, B., Quijano, C. E., & Marx, F. (2011). Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from *Clidemia rubra* (Aubl.) Mart. (Melastomataceae). *FRIN*, *44*, 2120–2127. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.015>
- Granda, E. (2005). La fitoterapia contraataca. Camino a la ortodoxia. *Farmacia Profesional*, *19*(5), 8–15.
- Guerra, M., & Ortega, G. (2006). *Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químico-físico. Parte I*. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664005>
- Guerrero, A. (2019). COLCA: *Miconia crocea* – Repositorio Digital: Flora de la Mitad del Mundo, UETMM. Retrieved December 5, 2019, from

<https://floradelamitadeldmundo.wordpress.com/2019/03/05/colca-miconia-crocea/>

Gutiérrez, H., & Salazar, R. (2008). Elementos de inferencia estadística: experimentos con uno y dos tratamientos. In *Análisis y Diseño de Experimentos*.

Gutiérrez, M. A. (2007). Los disolventes orgánicos y su exposición ocupacional. *Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo*. Retrieved from [http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10847/Los disolventes orgánicos y su exposición ocupacional.pdf?sequence=1](http://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/10847/Los%20disolventes%20orgánicos%20y%20su%20exposición%20ocupacional.pdf?sequence=1)

Herrera Aliga, M. A. (2017). *Estabilidad térmica del extracto colorante de Orujos de Uvina (Vitis aestivalis - cinérea x vitis vinífera) en una bebida modelo*. (UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA). Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2968/Q05-H47-T.pdf?sequence=4&isAllowed=y>

Horvitz, S., Chanaguano, D., & Arozarena, I. (2017). Andean blackberries (*Rubus glaucus* Benth) quality as affected by harvest maturity and storage conditions. *Scientia Horticulturae*, 226(August), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.09.002>

Isaza, J., Veloza, L. A., Guevara, C., Ávila, Y., & Omara, D. (2005). *Estimación espectrofotométrica de fenoles totales en especies de la familia melastomataceae*. 6. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/264673029_ESTIMACION_ESPECTROFOTOMETRICA_DE_FENOLES_TOTALES_EN_ESPECIES_DE_LA_FAMILIA_MELASTOMATACEAE

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food & Nutrition Research*, 61. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., García Parilla, M. C., Troncoso, A. M., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianínicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(4), 691–693. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612004000400036>

Lange, O., Mooney, H., & Remmert, H. (1995). *Tropical montane Cloud Forests* (110th ed.).

NEW YORK.

- Leyva Daniel, D. E. (2009). *Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora.*
- Li, D., Wang, P., Luo, Y., Zhao, M., & Chen, F. (2017). Health benefits of anthocyanins and molecular mechanisms: Update from recent decade. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(8), 1729–1741. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1030064>
- Limaymanta Solano, M. L., & Ramos Ibañez, I. A. (2016). *Extracción y cuantificación de antocianinas monoméricas totales del cultivo Macha Macha sp.* 152. Retrieved from [http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4743/Limaymanta Ramos Ibañez.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/4743/Limaymanta_Ramos_Ibañez.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Maurren Hernández, A., & Prieto Gonzáles, E. A. (1999). Plantas que contienen polifenoles. Antioxidantes dentro del estilo de vida. In *Rev Cubana Invest Biomed* (Vol. 18). Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/ibi/v18n1/ibi04199.pdf>
- Mejía Freire, A. K. (2019). *Extracción, microencapsulación y actividad de antocianinas del capulí (Prunus serotina).* (Universidad Técnica de Ambato). Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30001/1/BQ_194.pdf
- Minitab. (2019). Gráfica de efectos principales. Retrieved February 9, 2021, from <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/anova/supporting-topics/basics/what-is-a-main-effects-plot/>
- Moreno Villacís, L. E. (2020). Extracción y microencapsulación de antocianinas con actividad antioxidante y antiinflamatoria obtenidas a partir de fréjol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.). Universidad Técnica de Ambato.
- Mittermeier, R. A., Robles Gil, P., & Mittermeier, C. G. (1997). Megadiversity: Earth's Biologically Wealthiest Nations. *Conservation International*.
- Muñoz, W., Chavez, W., Pabón, L., Rendón, M., Chaparr, M., & Otalvaro, Á. (2015). Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 46, 38–46. Retrieved from <https://revista.cnic.edu.cu/index.php/RevQuim/article/view/138/138>

- Naudin, C. V. (1850). *Miconia crocea* (Desr.) Naudin. Retrieved June 30, 2020, from Annales des Sciences Naturelles website: <http://legacy.tropicos.org/name/20302374>
- Nóchez Hernández, J., & Ventura Hernández, A. J. (2009). *UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR* (Universidad de El Salvador). Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/12512/1/19200894.pdf>
- Oleas, N. H., Ríos Touma, B., Peña Altamirano, P., & Bustamante, M. (2016). *Plantas De Las Quebradas De Quito. Guía Práctica de identificación de Plantas de Ribera*. Retrieved from <https://en.calameo.com/read/005794096e0835f0e316b>
- Ongkowijoyo, P., Luna-Vital, D. A., & Gonzalez de Mejia, E. (2018). Extraction techniques and analysis of anthocyanins from food sources by mass spectrometry: An update. *Food Chemistry*, *250*, 113–126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.055>
- Ortíz Aguilera, M., Vargas Reza, M. del C., Madinaveitia Chew, R. G., & Velázquez Meza, J. A. (2011). Propiedades Funcionales De Las Antocianinas. *BIOtecnia*, *13*(2), 16. <https://doi.org/10.18633/bt.v13i2.81>
- Pironi, L. G., De Rezende, F. M., Ximenes, V. F., & Dokkedal, A. L. (2011). Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *miconia albicans* (Sw.) triana leaves. *Molecules*, *16*(11), 9439–9450. <https://doi.org/10.3390/molecules16119439>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, *27*(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Ramirez Arroyo, Y. (2020). *Extracción de antocianinas y fenoles en cáscara de arándano aplicando múltiples respuestas mediante el diseño Box-Behnken*. Universidad Peruana Unión.
- Ramírez, B., & Mendoza, H. (2006). *Guía ilustrada de géneros de Melastomataceae y Memecylaceae de Colombia*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/297978344_Guia_Ilustrada_de_Generos_de_Melastomataceae_y_Memecylaceae_de_Colombia
- Ramos Lalaleo, E. C. (2019). *Extracción y Microencapsulación de antocianinas a partir de*

- col morada (Brassica oleracea L.)* (Universidad Técnica de Ambato). Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29999/1/BQ_192.pdf
- Renner, S. S. (1989). A survey of reproductive biology in Neotropical Melastomataceae and Memecylaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 76, 496–518. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/2399497>
- Riera Muñoz, A. G. (2020). *Extracción y microencapsulación de antocianinas a partir de la planta sangorache (Amaranthus quitensis)* (Universidad Técnica de Ambato). Retrieved from https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/31405/1/BQ_232.pdf
- Rimpapa, Z., Toromanovic, J., Tahirovic, I., Šapčanin, A., & Sofic, E. (2007). TOTAL CONTENT OF PHENOLS AND ANTHOCYANINS IN EDIBLE FRUITS FROM BOSNIA. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 7(2), 119. Retrieved from </pmc/articles/PMC5747280/>
- Rodrigues, J., Michelin, D. C., Rinaldo, D., Zocolo, G. J., Dos Santos, L. C., Vilegas, W., & Salgado, H. R. N. (2008). Antimicrobial activity of Miconia species (Melastomataceae). *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 120–126. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.557>
- Rodrigues, J., Rinaldo, D., Da Silva, M. A., Dos Santos, L. C., & Vilegas, W. (2011). Secondary metabolites of miconia rubiginosa. *Journal of Medicinal Food*, 14(7–8), 834–839. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0157>
- Ruales, C. (2013). *Las colecciones botánicas de Joseph de Jussieu , Quito, Ecuador. Universidad San Francisco de Quito, Plantas de Quito-La vegetación original de una ciudad siempre verde. 1*, 1736–1747.
- Ruiz, S., Malagon, O., Zaragoza, T., & Valarezo, E. (2010). Composition of the Essential Oils of Artemisia sodiroi Hieron., Siparuna eggertii Hieron., Tagetes filifolia Lag. and Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze from Loja Ecuador. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 13(6), 676–691. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2010.10643879>
- Saavedra Alarcón, L. S., & Símpalo López, W. B. (2018). *Estudio de proceso de extracción de antocianinas a partir de frambuesa (Rubus idaeus L.)*. 86–95. Retrieved from

<http://revistas.uss.edu.pe/index.php/ING/article/view/1081/922>

Sales, M. (2013). *Diagrama de Pareto*. Retrieved from <http://www.gestiopolis.com/recursos/documentos/fulldocs/eco/diagramapareto.htm>

Sánchez Cepillo, D. I. (2020). *Método de las Superficies de Respuesta*. Retrieved from <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/12512/1/19200894.pdf>

Sánchez, E. R. (2017). *Extracción y cuantificación de antocianinas de maíz morado (Zea mays L.) utilizando dos solventes a diferentes temperaturas y tiempos de extracción*. (Universidad Nacional de Cajamarca). Retrieved from [http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1726/EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE MAÍZ MORADO %28ZEA MAYZ L.%29 UTILIZANDO DOS SOLVENTES.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1726/EXTRACCIÓN_Y_CUANTIFICACIÓN_DE_ANTOCIANINAS_DE_MAIÍZ_MORADO_%28ZEA_MAYZ_L.%29_UTILIZANDO_DOS_SOLVENTES.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Sangoluisa-Tipan, M. P., Santacruz, C., & Salvador, M. (2019). Efecto del método de extracción de antocianinas de la flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en la eficiencia de celdas solares sensibilizadas. *ACI Avances En Ciencias e Ingenierías*, *11*(2), 352–369. <https://doi.org/10.18272/aci.v11i2.888>

Serna, D. M. O., & Martínez, J. H. I. (2015). Phenolics and polyphenolics from melastomataceae species. *Molecules*, *20*(10), 17818–17847. <https://doi.org/10.3390/molecules201017818>

Serpeloni, J. M., Bisarro Dos Reis, M., Rodrigues, J., Campaner Dos Santos, L., Vilegas, W., Varanda, E. A., ... Cólus, I. M. S. (2008). In vivo assessment of DNA damage and protective effects of extracts from *Miconia* species using the comet assay and micronucleus test. *Mutagenesis*, *23*(6), 501–507. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen043>

Serpeloni, J. M., Mazzaron Barcelos, G. R., Prates Mori, M., Yanagui, K., Vilegas, W., Aparecida Varanda, E., & de Syllos Cólus, I. M. (2011). Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *63*(5), 499–504. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.03.011>

- Simbaña Ayo, W., & Vargas López, J. (2020). *Tungurahua - Plantas del Cerro Teligote / Guías de Campo*. Retrieved from <https://fieldguides.fieldmuseum.org/es/guías/guía/968>
- Spessoto, M. A., Ferreira, D. S., Crotti, A. E. M., Silva, M. L. A., & Cunha, W. R. (2003). Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). *Phytomedicine*, *10*(6–7), 606–609. <https://doi.org/10.1078/094471103322331629>
- Stone, R. D. (2006). Phylogeny of Major Lineages in Melastomataceae, Subfamily Olindebeidae: Utility of Nuclear Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GapC) Gene Sequences. *Systematic Botany*, *31*(1), 107–121. <https://doi.org/10.1600/036364406775971741>
- Ulloa, C., & Fernández, D. (2015). *Plantas de los Páramos del Distrito Metropolitano de Quito, Ecuador Chainsaw milling: supplier to local markets View project*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/303289702>
- Ulloa Ulloa, C., Acevedo-Rodríguez, P., Beck, S., Belgrano, M. J., Bernal, R., Berry, P. E., ... Jørgensen, P. M. (2017). An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*, *358*(6370), 1614–1617. <https://doi.org/10.1126/science.aao0398>
- Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M., & Morocho, V. (2013). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of Essential Oil Research*, *25*(3), 233–238. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.775679>
- Valencia Avilés, E., Figueroa, I. I., Martínez, E. S., Bartolomé Camacho, M. C., Martínez Flores, H. E., & García Pérez, M. E. (2016). *Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas Polyphenols: antioxidant and toxicological properties*. Retrieved from <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29781/1/2.1583-4794-2-PB.pdf>
- Vilcacundo, R., Barrio, D. A., Piñuel, L., Boeri, P., Tombari, A., Pinto, A., ... Carrillo, W. (2018). Inhibition of lipid peroxidation of Kiwicha (*Amaranthus caudatus*) hydrolyzed protein using Zebrafish Larvae and Embryos. *Plants*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/plants7030069>

Zapata, L. M. (2014). Obtención De Extracto De Antocianinas a Partir De Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante Y Colorante En La Industria Alimentaria. *Universitat Politècnica de Valencia*, 1–248. Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión_3_Tesis_Luz_Marina_Zapata.pdf %20%29.PDF?sequence=21](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión_3_Tesis_Luz_Marina_Zapata.pdf%20%29.PDF?sequence=21)

ANEXOS

6.1 Anexo 1. Datos de la extracción y concentración de antocianinas obtenidas por medio de Espectrofotometría UV-Vis.

Bloque	Disolvente	Relación Material vegetal - volumen de disolvente (RMVVD)	Peso (g)	Abs (535 nm)	Antocianinas (mg/100 g)	% de Humedad	Sólidos Totales
1	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:25,0	2.5014	0.8477	29,301	97.49	2.510
1	-1,0 (Ácido cítrico)	1:25,0	2.5075	0.5172	17,690	61.45	38.550
1	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:20,0	2.0028	0.6107	26,364	98.73	1.270
1	-1,0 (Ácido cítrico)	1:20,0	2.0048	0.3539	15,383	64.19	35.810
2	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:25,0	2.5014	0.8503	29,391	97.36	2.640
2	-1,0 (Ácido cítrico)	1:25,0	2.5075	0.4855	16,960	62.45	37.55
2	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:20,0	2.0028	0.5742	24,789	98.79	1.210
2	-1,0 (Ácido cítrico)	1:20,0	2.0048	0.3616	15,595	63.98	36.020
3	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:25,0	2.5014	0.8454	29,222	97.37	2.630
3	-1,0 (Ácido cítrico)	1:25,0	2.5075	0.5086	17,110	58.88	41.120
3	1,0 (Ácido clorhídrico)	1:20,0	2.0028	0.5847	25,242	98.22	1.780
3	-1,0 (Ácido cítrico)	1:20,0	2.0048	0.3595	15,514	63.83	36.170