

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



“Obtención y caracterización de colorante natural a partir de
Amaranthus sp Colorquehua”

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

AUTORES:

Br. ALEJANDRA NATASHA DÍAZ LIZARZABURU

Br. SILVIA LISSET MALCA LEÓN

ASESOR:

MSc. Ing. JOSÉ FÉLIX RIVERO MÉNDEZ

TRUJILLO - PERÚ

2004

*A Dios Padre y a María Madre Nuestra
y eterna amiga, que con sus sagradas
bendiciones me acompañan y guían día
a día.*

*A esa persona especial de infinita
nobleza, que desde el cielo cuida e
ilumina mis pasos con eterno amor y es
mi ejemplo de vida por su legado de
valores y enseñanzas.*

*A mis padres y hermanos por su amor,
paciencia, comprensión y constante
apoyo en la realización de todos mis
sueños, metas y objetivos.*

*A todas las personas que comparten mi
vida de una manera especial, por
acompañarme en todo momento.*

Alejandra

*Al Amor de los Amores, Dios del Cielo,
porque Él construye el camino con mis
propios pasos y está presente en cada
momento de mi vida para brindarme su
amor incondicional.*

*A la Virgen María, Madre de bondad y
ejemplo de mujer que desde el cielo me
cuida y protege.*

*A mis queridos padres Jaime y
Esperanza por su amor, apoyo,
confianza y ser siempre mi ejemplo e
inspiración para seguir adelante.*

*A mis hermanos Jaime y Javier,
compañeros de mi vida, porque me
llenan de amor y alegría.*

*A todas las personas que guardo en mi
corazón con cariño y estimación por
compartir siempre conmigo mis éxitos y
fracasos.*

Silvia

PRESENTACION

Sres. Miembros del Jurado:

Cumpliendo con las normas establecidas en el reglamento de grados y títulos de la escuela profesional de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, presentamos a vuestra consideración el presente trabajo de tesis denominado: **Obtención y Caracterización de colorante natural a partir de *Amaranthus sp* “Colorquehua”**, elaborado con la finalidad de obtener el TITULO PROFESIONAL DE INGENIERO QUIMICO.

Esperamos que el presente cumpla con todas las exigencias propias de un trabajo de tesis, ya que ha sido elaborado con suma dedicación por los autores y pedimos sepan disculpar los errores involuntarios que se hayan cometido.

Alejandra Natasha Díaz Lizarzaburu

Silvia Lisset Malca León

AGRADECIMIENTO

Nuestro más profundo agradecimiento a nuestro asesor el MSc. Ing. José Félix Rivero Méndez de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo, por todo su apoyo, colaboración e interés mostrado a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Expresamos también nuestro más sincero agradecimiento al Dr. Félix Fernández Clavijo por su atenta colaboración y enseñanza de sus experiencias para la realización de este trabajo de investigación.

Por último un agradecimiento muy especial a todos los profesores y técnicos que laboran en la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Trujillo en especial al Dr. Mario Alva Astudillo y al MSc. Ing. Anselmo Castillo Valdivieso. Asimismo al Ing. Dante Rengifo, Jefe del Departamento de Agroindustrias de la Universidad Nacional del Santa - Chimbote.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| OBJETIVOS | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| CAPÍTULO I | |
| FUNDAMENTO TEÓRICO | 5 |
| 1.1. ESTUDIO BOTÁNICO | 5 |
| 1.1.1. Ubicación Sistemática | 5 |
| 1.1.2. Sinonimia Vulgar | 5 |
| 1.1.3. Estudio Morfológico | 5 |
| 1.1.3.1. Descripción del Género | 5 |
| 1.1.3.2. Descripción de la Especie | 6 |
| 1.1.4. Fitogeografía | 6 |
| 1.1.5. Usos | 7 |
| 1.1.6. Cultivo de la Colorquehua (<i>Amaranthus sp</i>) | 7 |
| 1.2. COLORANTES | 8 |
| 1.2.1. Teoría del Color | 8 |
| 1.2.2. Clasificación de Colorantes | 11 |
| 1.2.2.1. Por su Estructura Química | 11 |
| 1.2.2.2. Por el Método de Aplicación | 11 |
| 1.2.2.3. Por su Uso | 12 |
| 1.2.2.4. Colorantes Naturales | 13 |
| 1.2.2.5. Clasificación de Colorantes Naturales | 14 |
| 1.2.2.6. Antocianinas | 17 |
| 1.2.2.6.1. Generalidades | 17 |
| 1.2.2.6.2. Estructura y Comportamiento Químico | 17 |
| 1.2.2.6.3. Estabilidad de las Antocianinas | 19 |
| 1.2.2.6.4. Usos y Aplicaciones | 26 |
| 1.2.2.7. Extracción de las Antocianinas | 26 |

| | |
|---|----|
| 1.3. IDENTIFICACIÓN | 27 |
| 1.3.1. Cromatografía | 27 |
| 1.3.2. Espectroscopía | 28 |
| 1.3.2.1. Espectroscopía de Absorción en el Infrarrojo | 29 |
| 1.3.2.2. Espectroscopía de Absorción en el UV-Visible | 30 |
| CAPÍTULO II | |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 31 |
| 2.1. Material | 31 |
| 2.1.1. Material Fitoquímico | 31 |
| 2.1.2. Material de Laboratorio | 31 |
| 2.1.2.1. Material de Vidrio | 31 |
| 2.1.2.2. Material de Porcelana | 32 |
| 2.1.2.3. Equipos | 32 |
| 2.1.2.4. Otros | 32 |
| 2.1.3. Material Químico | 33 |
| 2.2. MÉTODOS | 34 |
| 2.2.1. Métodos de Control | 34 |
| 2.2.1.1. Determinación de Agua (Humedad) | 34 |
| 2.2.1.2. Cenizas | 35 |
| 2.2.1.3. Proteínas | 35 |
| 2.2.1.4. Grasas | 36 |
| 2.2.1.5. Fibra | 36 |
| 2.2.2. Método de Análisis fotoquímico | 37 |
| 2.2.2.1. Preparación de la Muestra | 37 |
| 2.2.2.2. Reacciones Características | 38 |
| 2.2.3. Métodos de Procesamiento | 41 |
| 2.2.3.1. Recolección de la Materia Prima | 41 |
| 2.2.3.2. Acondicionamiento de la Materia Prima | 41 |
| 2.2.3.3. Selección del Solvente | 42 |
| 2.2.3.4. Extracción con Solventes | 42 |
| 2.2.3.4.1. Extracción por Maceración | 42 |
| 2.2.3.4.2. Extracción Continua en Soxhlet | 42 |
| 2.2.3.4.3. Extracción por Ebullición de Materia Prima | 43 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.2.3.5. Secado por Liofilización | 43 |
| 2.2.3.6. Separación | 44 |
| 2.2.3.6.1. Cromatografía | 44 |
| 2.2.3.7. Identificación | 49 |
| 2.2.3.7.1. Espectroscopía UV-Visible | 49 |
| 2.2.3.7.2. Espectroscopía Infrarroja | 49 |
| CAPÍTULO III | |
| RESULTADOS | 52 |
| CAPÍTULO IV | |
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 65 |
| CAPÍTULO V | |
| CONCLUSIONES | 68 |
| CAPÍTULO VI | |
| RECOMENDACIONES | 70 |
| CAPÍTULO VII | |
| BIBLIOGRAFÍA | 71 |
| APÉNDICE | 74 |
| ANEXOS | 79 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1: Propiedades Bromatológicas de la Materia Prima | 52 |
| TABLA 2: Propiedades Bromatológicas de la Semilla de Colorquehua | 52 |
| TABLA 3: Determinación de Alcaloides | 53 |
| TABLA 4: Determinación de Flavonoides | 53 |
| TABLA 5: Determinación de Antocianinas | 53 |
| TABLA 6: Determinación de Taninos | 53 |
| TABLA 7: Determinación de Saponinas | 53 |
| TABLA 8: Determinación de Esteroides | 54 |
| TABLA 9: Densidad y Temperatura de Solventes Puros usados para las Pruebas de Extracción | 54 |
| TABLA 10: Balance de Materiales de las Pruebas de Extracción por Maceración | 54 |
| TABLA 11: Balance de Materiales de las Pruebas de Extracción en Soxhlet | 55 |
| TABLA 12: Balance de Materiales de las Pruebas de Extracción por Ebullición de Materia Prima | 55 |
| TABLA 13: Resultados de Extracción por Ebullición de Materia Prima | 55 |
| TABLA 14: Secado por Liofilización | 56 |
| TABLA 15: Resultados de Secado por Liofilización | 56 |
| TABLA 16: Propiedades observadas del Colorante Liofilizado | 56 |
| TABLA 17: Pruebas de Cromatografía de Capa Fina | 57 |
| TABLA 18: Elección del solvente óptimo para la Cromatografía de Columna | 57 |
| TABLA 19: Solubilidad del Colorante en diferentes sustancias | 58 |
| TABLA 20: Medición de pH del Colorante usando como solvente agua | 58 |
| TABLA 21: Características de las Fracciones de Colorante separadas por Cromatografía de Columna | 59 |
| TABLA 22: Prueba de Punto de Fusión de la Fracción 1 obtenida en la Cromatografía de Columna | 59 |

| | |
|--|----|
| TABLA 23: Bandas de Absorción en la región Ultravioleta características de los grupos funcionales del colorante extraído a partir de Colorquehua | 59 |
| TABLA 24: Bandas de Absorción en la región Infrarroja características de los grupos funcionales del colorante extraído a partir de Colorquehua | 62 |

Biblioteca de Ingeniería Química

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA N° 1: Anaranjado de Metilo | 10 |
| FIGURA N° 2: Clasificación de Colorantes Naturales | 14 |
| FIGURA N° 3: Estructura de una Antocianina | 18 |
| FIGURA N° 4: Tipos de Antocianina | 22 |
| FIGURA N° 5: Hidrólisis de la Cianidina-3-glucósido | 23 |
| FIGURA N° 6: La Antocianina y sus cambios de coloración | 24 |
| FIGURA N° 7: Grado de Oxidación de la Antocianina | 25 |
| FIGURA N° 8: Polaridad de los solventes | 47 |
| FIGURA N° 9: Cromatografía de Capa Fina | 48 |
| FIGURA N° 10: Esquema de Métodos de Procesamiento | 51 |

ÍNDICE DE FOTOS

| | |
|---|----|
| FOTO 1: Planta de Colorquehua | 79 |
| FOTO 2: Panoja Fresca de Colorquehua (Materia Prima) | 79 |
| FOTO 3: Siembra de Colorquehua | 80 |
| FOTO 4: Panoja utilizada para los análisis | 80 |
| FOTO 5: Pruebas positivas de Marcha Fitoquímica | 81 |
| FOTO 6: Pruebas positivas de Marcha Fitoquímica | 81 |
| FOTO 7: Extracción por Maceración | 82 |
| FOTO 8: Extracción por Ebullición de Materia Prima | 82 |
| FOTO 9: Extracción en Soxhlet | 82 |
| FOTO 10: Equipo de Liofilización | 83 |
| FOTO 11: Extracto Liofilizado | 83 |
| FOTO 12: Pruebas de Cromatografía de Capa Fina | 84 |
| FOTO 13: Cromatografía de Capa Fina con el sistema seleccionado | 84 |
| FOTO 14: Espectrofotómetro UV – VISIBLE | 85 |
| FOTO 15: Espectrofotómetro INFRARROJO | 85 |

RESÚMEN

El presente trabajo de investigación se centra en: Obtención y caracterización de colorante natural a partir de *Amaranthus sp* “Colorquehua”.

El métodos utilizado fue extracción hídrica por ebullición de materia prima, es decir se extrae el colorante usando como solvente el agua, con un rendimiento de 10.71%.

La concentración del colorante se realizó por medio del método de liofilización, obteniéndose un rendimiento de 8.36%.

Para la caracterización se utilizó la espectroscopía de infrarrojo y ultravioleta. Previamente se realizó una cromatografía de capa fina para seleccionar el solvente indicado, utilizado para la purificación de dicho colorante, en la cromatografía de columna.

Para la caracterización del colorante se toma muestras pequeñas de dicho colorante concentrado, en el caso de la espectroscopía infrarroja se utiliza como solvente alcohol etílico de grado absoluto, dando como resultado los grupos funcionales: OH, C-H, C=O, CH₂, C=C, C-O.

Para la espectroscopía ultravioleta se utiliza como solvente agua bidestilada, dando como resultado los grupos funcionales: C=C, C-H y el cromóforo.

ABSTRACT

The present research work focuses on: Obtaining and characterizing natural colorant from *Amaranthus* sp "Colorquehua".

The methods used were water extraction by boiling raw material, ie the dye is extracted using water as solvent, with a yield of 10.71%.

The concentration of the dye was carried out by means of the lyophilization method, obtaining a yield of 8.36%.

For the characterization infrared and ultraviolet spectroscopy was used. Previously, thin-layer chromatography was performed to select the indicated solvent, used for the purification of said dye, in column chromatography.

For the characterization of the dye, small samples of said concentrated dye are taken. In the case of infrared spectroscopy, absolute grade ethyl alcohol is used as a solvent, resulting in the functional groups: OH, CH, C = O, CH₂, C = C, CO.

For ultraviolet spectroscopy, double-distilled water is used as a solvent, resulting in the functional groups: C = C, C-H and the chromophore.

OBJETIVOS

El Trabajo de investigación que presentamos, **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COLORANTE NATURAL A PARTIR DE *Amaranthus sp* “COLORQUEHUA”**, tiene los siguientes objetivos:

1. Obtener el colorante natural.
2. Caracterizar el colorante natural obtenido.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la preocupación por la seguridad de los alimentos y la presión al público, a llevado a muchas empresas a revisar la formulación de sus productos y sustituir cuando es tecnológicamente factible los colorantes naturales por otros artificiales o sintéticos, ya que estos son más económicos. Precisamente por este incremento en el uso de los colorantes artificiales, la preocupación por su seguridad a hecho que los colorantes artificiales hayan sido estudiados en forma exhaustiva por lo que respecta a su efecto en la salud, esto a llevado a reducir cada vez más el número de colorantes utilizables.

La distinción entre natural y artificial, términos muy utilizados en las polémicas de salubridad de los alimentos, es de difícil aplicación cuando se quiere hablar con propiedad de los colorantes alimentarios. Los colorantes naturales son considerados en general como inocuos y consecuentemente las limitaciones específicas en su utilización son menores que las de los colorantes artificiales.

El Perú es considerado uno de los centros de origen de diversas plantas alimenticias, industriales, medicinales así como fuentes de colorantes, una de ellas es la Colorquehua, que es una planta silvestre que contiene colorante natural extraíble con características que son una alternativa para la industria de los colorantes no solo por el agente colorante de la familia de las antocianinas que contiene sino también por el residuo que deja el cual es rico en proteínas.

En la Universidad Nacional de Cajamarca expertos ingenieros agrónomos y otros colaboradores realizaron estudios de la utilidad de esta planta con el fin de fomentar y rescatar su cultivo con miras a mejorar y beneficiar a los pobladores de la zona, los resultados que obtuvieron fueron los indicios para la investigación de esta fuente de colorante natural, importante por su valor alimenticio e industrial.

Frente a lo anterior desarrollamos pruebas a nivel de laboratorio en las cuales se demuestra mediante una marcha fitoquímica la naturaleza del colorante, el cual es una

Antocianina, y además que está libre de toxinas y otras sustancias dañinas para el organismo humano.

Asimismo se sientan las bases que servirían para una futura industrialización del colorante, lo cual beneficiaría a los agricultores de la zona andina del Perú, quienes cultivan esta amarantácea llamada colorquehua.

Biblioteca de Ingeniería Química

CAPÍTULO I

FUNDAMENTO TEÓRICO

1.1. ESTUDIO BOTÁNICO

1.1.1. UBICACIÓN SISTEMÁTICA¹⁵

Para la clasificación botánica se toma como base el sistema Engler utilizado para la sistemática vegetal.

| | |
|-----------|----------------------|
| Reino | Vegetal |
| División | Angiospermas |
| Clase | Monocotiledóneas |
| Sub Clase | Criptospernales |
| Orden | Lileaceas |
| Familia | Amaranthaceae |
| Genero | Amaranthus |
| Especie | sp (no identificada) |

1.1.2. SINONIMIA VULGAR

Colorquehua, colorquewa, colorquegua, kiwicha morada, etc.

1.1.3. ESTUDIO MORFOLÓGICO⁷

1.1.3.1. DESCRIPCION DEL GÉNERO

Los miembros del género *amaranthus* (familia *amaranthaceae*) están ampliamente distribuidos a través de las regiones tropical, subtropical y templadas del mundo. El género contiene cerca de 60 especies.

Los hábitos de crecimiento varían desde plantas postradas a erectas ramificadas; los colores del tallo y de las hojas van desde verde a rojo con una multitud de intermedios y las semillas van del color blanco al negro.

1.1.3.2. DESCRIPCION DE LA ESPECIE

La especie del amaranthus en estudio, es no identificada (sp), cuyas características son:

Planta hermosa con hojas y tallos de colores brillantes y flores púrpuras, rojas y rojo violáceo.

Las panojas son hasta de 50 cm. de largo, semejando aquellas del sorgo. Las semillas aunque algo mas grandes que la semilla de mostaza (0.9 – 1.7 mm. de diámetro) se presentan en números masivos. Algunas veces mas de 50 000 por planta y son de color de púrpura a negro.

Con un contenido proteico de cerca de 16%, la semilla de amaranto se compara bien con las variedades convencionales del trigo (12 - 14%), arroz (7 – 10%), maíz (9 – 10%) y otros cereales de amplio consumo humano.

1.1.4. FITO GEOGRAFIA⁷

Se ha cultivado amaranthus en medio ambiente que van desde los trópicos hasta tierras semiáridas y desde el nivel del mar hasta algunas de las tierras agrícolas más altas del mundo. Los ecotipos de amaranthus han evolucionado de modo tal, que toleran suelos arenosos alcalinos con pH tan alto como 8.5, también en las arcillas ácidas de las laderas de los campos tasajeados y quemados de los trópicos.

El mayor cultivo de amaranthus para granos se ha concentrado en los valles de las tierras altas, tales como aquellos de la sierra madre, los Andes y los Himalayas. En Sudamérica esta especie es un cultivo de las sierras andinas de Argentina, Perú y Bolivia.

La altura no es una limitación severa, los amaranthus crecen satisfactoriamente desde el nivel del mar hasta más arriba de los 3200 m.s.n.m.

El amaranthus crece mejor cuando la temperatura diaria alta es por lo menos 21°C.

Varios especímenes ingresados han mostrado germinación óptima a temperatura que varían entre 16 y 35°C.

1.1.5. USOS⁷

El Amaranthus se utiliza en los alimentos de diferentes maneras como:

- Amaranthus chancado o en harina: es apropiado para panes con o sin levadura mezclados con harina de trigo debido a que carecen de gluten funcional mejorando la calidad proteica (América Latina e Himalayas).
- Puede ser usado como cereal en grano o también puede ser combinado con leche y avena para desayuno.
- Otro de sus usos es como refrescos similares a la chicha morada e incluso mazamoras (andes peruanos).
- Las hojas del amaranthus son secadas y molidas para preparar “Ocopa”.
- El tallo y las hojas son aprovechados como comida para animales por su alto contenido proteico.

1.1.6. CULTIVO DE LA COLORQUEHUA (*Amaranthus sp.*)¹¹

- **Método de Riego**

Se emplea generalmente tecnología media, mediante riego por gravedad.

- **Preparación del Terreno**

Se realiza con yuntas, desde la aradura hasta la cruz, a fin de dejar el terreno en condiciones óptimas de mulliendo, aireación y libre de malezas, para de esta manera permitir la normal germinación de semillas.

- **Siembra**

- **Época de siembra**

En nuestro medio (andes peruanos) la encontramos sembrada generalmente asociada al maíz, quinua, kiwicha blanca u otros cultivos, por lo tanto la época de siembra coincide con la de estos (setiembre-noviembre).

➤ **Densidad de Siembra**

Está entre 40 000 y 60 000 hectáreas, con un distanciamiento entre plantas de 25 a 35 cm. Y entre surcos de 75 cm. Se consiguen rendimientos satisfactorios, con un sembrío cuidadoso, vale decir que usar mayor población de plantas se refleja en el incremento de la producción.

En la siembra directa con surcos longitudinales se emplea de 5 a 7 Kg. / Ha de semilla, cuando las plantas hayan alcanzado de 8 a 12 cm. De altura, se procede al raleo de la densidad de las plantas jóvenes, dejando un distanciamiento recomendado (35 cm.).

• **Fertilización**

La mejor fertilización orgánica será con 10 TM/Ha de estiércol aplicado a la siembra, más un nivel de 40-40-40, aplicados al raleo.

• **Cosecha**

La siembra esta en condiciones de ser cosechada cuando la base de la panoja está seca, uno de los síntomas de la maduración es el amarillamiento y caída de las hojas, es necesario cortar las plantas con la hoz por su base.

La producción puede variar entre 2000 y 2500 Kg. / Ha, en amaranto granífero. En cuanto a la producción de amaranto para verdura varia de 5 a 15vTM / Ha. (peso verde) dependiendo de la fertilidad del suelo.

1.2. COLORANTES

1.2.1. TEORÍA DEL COLOR¹⁸

Un compuesto orgánico se ve de color cuando absorbe luz de una o más frecuencias en la región visible de 4000 a 7500 Å de longitud de onda.

Cualquier compuesto químico aparece incoloro si se deja pasar por igual todas las radiaciones luminosas (espectro visible), pero si ejerce una acción

selectiva, aparece con el color complementario a las radiaciones absorbidas, si estas lo son en la zona visible del Espectro. Las sustancias orgánicas coloreadas son siempre compuestos insaturados.

Según la teoría clásica de Witt, propuesta en 1876, los grupos que producen color en los compuestos orgánicos, se llaman cromóforos, la sustancia que los contiene se llama cromógeno, y es una sustancia coloreada, pero no un colorante, otros grupos que modifican el color producidos por estos cromóforos y que en muchos casos dan a la molécula afinidad se denominan auxócromos.

Los grupos cromóforos más comunes son:



nitroso



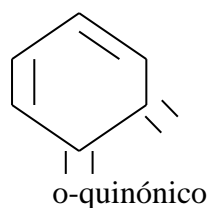
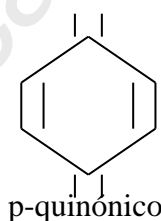
nitro



azo



tio



Los auxócromos más comunes:

| | | | |
|------------|------------------------|------------------|------------------------|
| -OH | -NH₂ | -NHR | -NR₂ |
| hidroxilo | amino | aminosustituidos | |

Además de los grupos considerados, existen otros que convierten el colorante, generalmente insoluble en agua, en soluble, y son los grupos salificables:

| | |
|-------------------------|--------------|
| -SO₃H | -COOH |
| sulfónico | carboxilo |

La siguiente estructura molecular del compuesto Anaranjado de Metilo, ilustra con claridad lo citado anteriormente:

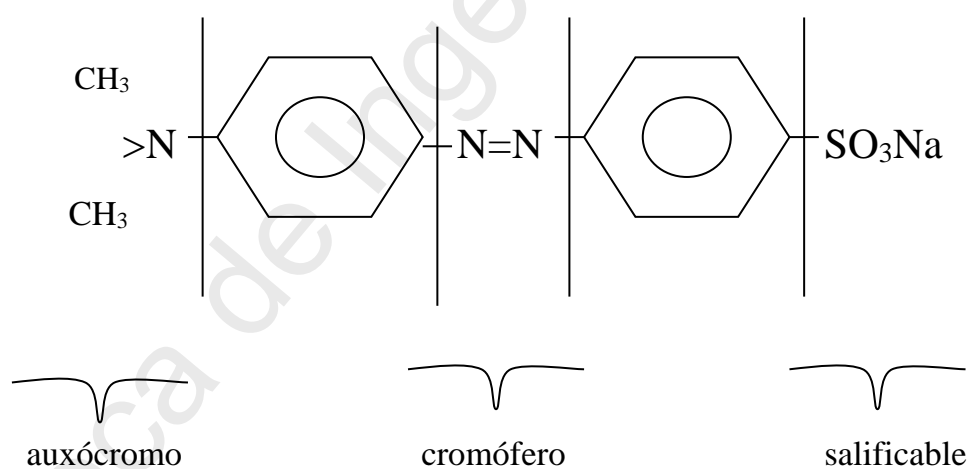


FIGURA N° 1: Anaranjado de Metilo

1.2.2. CLASIFICACION DE LOS COLORANTES

Actualmente se mencionan por lo general como colorantes naturales y sintéticos, pero estos se pueden clasificar por su estructura química, método de aplicación y por su uso.

1.2.2.1. POR SU ESTRUCTURA QUÍMICA^{18, 21}

Esta clasificación se basa en las teorías clásicas del color y en el concepto de grupos cromóforos, modificados en algunos casos por el tipo de sistemas de anillos orgánicos, existentes en la molécula, entre los cuales tenemos los más importantes:

- **Colorantes nitrosados:** cuyo grupo característico es un N=O orto con OH (de poca importancia comercial).
- **Colorantes nitrados:** cuyo cromóforo característico es un -NO₂ orto o para con -OH (de poca importancia comercial)
- **Colorante azoicos:** con el grupo -N=N- de gran importancia comercial, en cantidad y diversidad.
- **Colorante de azometino:** con grupos -CH=N ó C=N, importantes en la fotografía.
- **Colorantes sulfurados:** se usan como colorantes de tina resistentes al lavado.
- **Colorantes de hidroxiketona:** con grupos C=O y -OH, se usan como colorantes para mordientes.
- **Colorantes de antraquinona y afines:** derivados de la antraquinona, importantes colorantes fijos.

1.2.2.2. POR EL MÉTODO DE APLICACIÓN¹⁸

En esta clasificación se encuentran los colorantes para uso textil y son:

- **Colorantes directos:** son sustancias hidrosolubles, que se depositan sobre las fibras celulósicas (algodón, lino, rayón), en un baño de sal sin mordentar la fibra. En virtud de esta propiedad se le califica de sustantivos. Casi todos los colorantes directos son

químicamente productos azoicos que contienen uno o más radicales sulfónicos que les dan la hidrosolubilidad.

- **Colorantes para mordientes¹²:** son aquellos compuestos coloreados que son insolubles en agua, entonces requieren un proceso especial para que pueda ser aplicado a la fibra con un mordiente (del latín mordere, morder), sustancia que se adhiere a la fibra y que a su vez es capaz de fijar el colorante quedando unido indirectamente a la fibra, ejemplo de estos colorantes son la alizarina e índigo (naturales).
- **Colorante a la tina⁴:** Son compuestos colorados insolubles que dan productos solubles por reducción. Los productos reducidos pueden ser coloreados o incoloros y tienen acentuada afinidad por las fibras textiles. Para aplicar un colorante de tina a una tela, debe ser reducido con hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) u otro agente reductor adecuado en un recipiente fuera del contacto con el aire. Luego se impregna la tela con la forma soluble del colorante. Por exposición al aire u otro agente oxidante, el colorante pasa a la forma insoluble coloreada y queda firmemente fijado a la fibra.

1.2.2.3. POR SU USO¹⁸

Teniendo en cuenta el uso que se le da a los colorantes, estos pueden ser:

- **Colorantes para Alimentos, Medicamentos y Cosméticos:**

Estos pueden ser:

- 1) Materias colorantes orgánicos sintéticas.
- 2) Materias colorantes naturales, que pueden ser de origen vegetal y animal.
- 3) Colorantes inorgánicos que pueden ser de origen mineral o sintético.

- **Colorantes para Textiles y Fibras en general:**

Entre éstos se encuentran los colorantes naturales y sintéticos, directos, a la tina, para mordiente, etc.

- **Colorantes para Cerámica y Vidrio:**

Una de sus propiedades más importantes debe ser que resistan elevadas temperaturas que intervienen en la fabricación del vidrio y objetos de cerámica, solo existen algunos que cumplen con estos requerimientos y además que son lo suficientemente estables, baratos y no volátiles para poder usarlos como colorantes, de ellos algunos óxidos, sulfuros, silicatos, fosfatos y aluminatos cumple las exigencias.

1.2.2.4. COLORANTES NATURALES²⁶

Desde los tiempos prehistóricos hasta la mitad del siglo XIX, el teñido fue hecho con colorantes naturales. La importancia de estos colorantes naturales disminuyó cuando en 1856 el inglés William Henry Perkin en su intento de sintetizar quinina, oxidó sulfato de anilina con dicromato potásico y produjo el primer colorante sintético: la mauveína, de color púrpura.

Sin embargo, en años recientes se ha renovado el interés en colorantes naturales por recientes limitaciones en el uso de algunos sintéticos en alimentos, medicamentos y en productos cosméticos debido a su toxicidad. Son frecuentes las denuncias por el uso de colorantes no adecuados en estos productos de uso humano, como por ejemplo la presencia de colorantes sintéticos nocivos como Rhodamina B y Naranja permanente en lápices de labios o de otros colorantes no permitidos en caramelos, refrescos y gelatinas.

Los Colorantes naturales son todas aquellas materias colorantes que se extraen directamente de la naturaleza, ya sea de minerales, animales o vegetales, estos últimos en mayor cantidad.

1.2.2.5. CLASIFICACION DE COLORANTES NATURALES²⁷

Los colorantes naturales se pueden clasificar en diferentes formas: por tipo de teñido, por su composición química, por sus características físicas, etc.

A continuación se muestra una clasificación de colorantes naturales de acuerdo a su composición química.

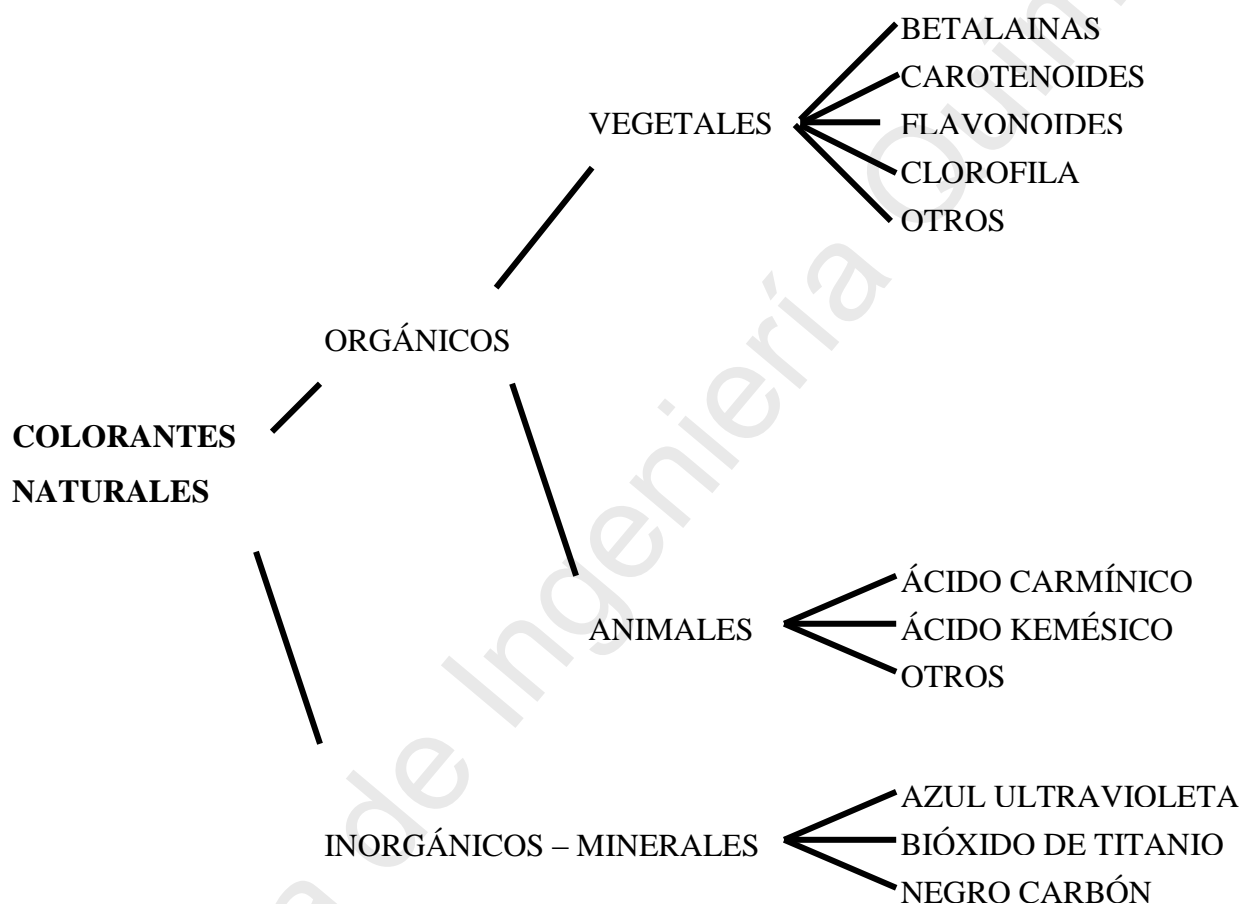


FIGURA N° 2: Clasificación de Colorantes Naturales

- **CAROTENOIDES¹⁹**: Los carotenoides son un grupo de compuestos solubles en lípidos.

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal cumpliendo dos funciones principalmente: en la fotosíntesis, y como materia colorante en las flores y los frutos, en los que aparecen mayormente como colores amarillos en los primeros, y naranja o rojizo en los segundos; los animales no los biosintetizan pero

puede encontrarse presente por - ser ingeridos en la dieta - en algunos peces, pájaros y organismos marinos invertebrados.

Los carotenoides pueden clasificarse como carotenos, si sólo están formados por átomos de carbono e hidrógeno (hidrocarburos); y como xantofilas, si contienen alguna función oxigenada.

| GRUPO | COLOR | PROCEDENCIA |
|------------|------------|-------------|
| Caroteno | Anaranjado | Zanahoria |
| Xantofilas | Amarillo | Achiote |

- **BETALAÍNAS**¹⁹: El término betalaína describe a dos grupo de pigmentos muy solubles en agua, relacionados química y biogénicamente, éstos son, las betacianinas de color rojo violeta (longitud de onda máxima de 480 nm) y las betaxantinas de color amarillo (longitud de onda máximo de 480 nm).

Una observación muy importante en estas plantas es la presencia de betacianinas y antocianinas no coexisten en la misma planta, ni aún dentro de la misma familia. Sin embargo, pueden coexistir en otras clases de pigmentos flavonoides.

Las betalaínas también se encuentran en algunos hongos, por ejemplo: del hongo venenoso *Amanita muscaria* se han aislado una betacianina, la muscapurpurina y siete betaxantinas, miscaxantina.

A la fecha se conocen alrededor de cincuenta betacianinas y de veinticinco betaxantinas.

- **FLAVONOIDES**^{8, 19}: Los flavonoides, uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antoxantinas, aparecen frecuentemente revisados bajo diferentes aspectos en la literatura científica especialmente en los últimos treinta años.

Ocurren virtualmente en todas las partes de la planta: hojas, raíces, flores, maderas, cortezas, frutos y semillas. Pueden encontrarse

como agliconas y glicócidos con restos de glucosa, galactosa, ramnosa o arabanosa principalmente.

Como características generales de estos compuestos debemos señalar su solubilidad en agua y en etanol, su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados¹⁸.

Una clasificación preliminar del tipo de flavonoide en un extracto de planta, puede hacerse basada inicialmente en un estudio de sus propiedades de solubilidad y de comportamiento ante reacciones de color; esto, seguido por un examen cromatográfico directamente del extracto y/o del extracto hidrolizado. La separación puede hacerse por procedimientos cromatográficos, y la identificación de los componentes individuales por comparaciones cromatográficas y espectroscópicas con compuestos estándar o con la literatura, compuestos nuevos requieren exámenes químicos y espectroscópicos más detallados²⁸.

Los flavonoides se emplearon durante mucho tiempo como colorantes de lana, y actualmente se usan en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas. Entre otras aplicaciones, mencionaremos la de los glucósidos de dihidrochalconas como edulcorantes, de la rotenona como insecticida, etc.

Hemos considerado dentro de los flavonoides a cuatro grupos principales:

| GRUPO | COLOR | PROCEDENCIA |
|--------------|-----------------|--------------------|
| Flavonol | Amarillo | Bidens |
| Flavonona | Crema-amarillo | Perejil |
| Calcona | Rojo y amarillo | Cártamo |
| Antocianina | Rojo y violeta | Tinantía |

1.2.2.6. ANTOCIANINAS

1.2.2.6.1. GENERALIDADES^{18, 21}

Fue Marquat, en 1835, quien utilizó el término antocianina para designar a los pigmentos azules de las flores. Más tarde se descubrió que no sólo el color azul, sino que también el púrpura, violeta, magenta, y que todos los tonos de rojo, rosado, escarlata, que aparecen en muchas flores, frutos y en algunas hojas y raíces de planta, se deben a pigmentos químicamente similares a las antocianinas de Marquat.

Fueron Willstätter y Everest quienes en 1913, propusieron que el término antocianina se aplicara para el glicósido y el de antocianidina para la aglicona.

Las antocianinas son intensamente coloreadas y solubles en agua, no son estables especialmente en soluciones neutras y alcalinas, ocurriendo fácilmente cambios durante el procesamiento del material crudo y el almacenaje, los que se manifiestan en pérdida de color, oscurecimiento del producto y formación de los precipitados en los extractos.

Las antocianinas están basadas químicamente en una única estructura aromática, aquella de la cianidina, y todas se consideran derivadas de ella por adición o sustracción de grupos hidroxilo por mutilación o por glicosidación.

Las antocianinas como pigmento natural inocuo, tienen considerable potencial en la industria de alimentos y en la producción de vinos.

1.2.2.6.2. ESTRUCTURA Y COMPORTAMIENTO QUÍMICO

Las antocianinas están consideradas dentro del grupo de los Flavonoides, ya que poseen el esqueleto característico C₆-C₃-C₆ y el mismo origen biosintético, pero difieren en que absorben fuertemente en la región visible del espectro.

El núcleo fundamental de las antocianinas es el cloruro de benzopirilio, pero el compuesto fundamental es el cloruro de 2-fenil-benzopirilio o cloruro de flavilio y con excepción de algunos aminocompuestos son todos hidroderivados, que existen en las plantas, generalmente como glucósidos¹⁸.

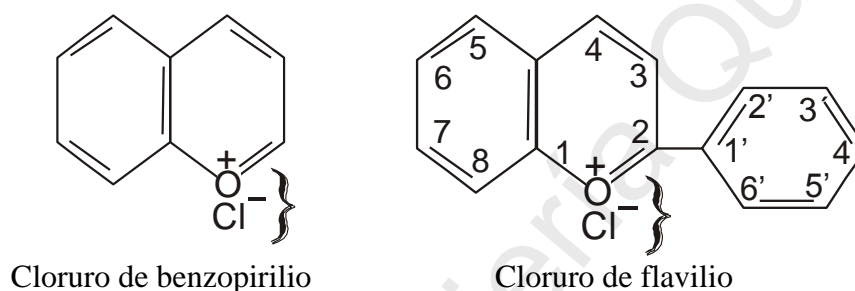


FIGURA N° 3: Estructura de una Antocianina

Por hidrólisis de estas se produce el compuesto glucídico y la aglicona, que es la correspondiente antocianidina.

Se conocen muchas antocianidinas (agliconas de las antocianina), pero sólo seis tienen interés en los alimentos, siendo la cianidina la más común, también están la pelargonidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Cada una de las seis antocianidinas ocurre con unidades de azúcar, la variación está en el tipo del azúcar, del número y de la posición en los que están unidos. Entre los monosacáridos más comunes podemos mencionar a la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, y como disacáridos a la rutinosa, sambuliosa, soforosa, gentiobosa y latirosa. (FIGURA N° 4)

Basadas en su glicosidación, pueden clasificarse como 3-monoglicósidos; 3-biósidios; 3,5-diglicósidos y 3,7-diglicósidos, siendo estos últimos menos comunes.

También existen antocianinas aciladas con sustituyentes alifáticos, aromáticos y azúcares; siendo los principales grupos acilantes los ácidos fenólicos y algunas veces los ácidos acético, malónico, y p-hidroxibenzoico; ellos se encuentran preferentemente en el azúcar del C-3.

Las antocianinas tienen un parentesco muy cercano con las catequizas y con los flavones¹⁸.

Las catequinas son combinaciones cristalinas incoloras que Freudenberg las considera como “*Antocianinas Hidrogenadas*” o “*Leucoantocianinas*”. y los flavones son principios de los colores amarillos que presentan las plantas¹⁴.

Las antocianinas son sustancias de grado de oxidación intermedia entre los flavones y las catequinas.

(FIGURA N° 5)

1.2.2.6.3. ESTABILIDAD DE LAS ANTOCIANINAS^{18,21,9}

Como se ha mencionado, las antocianinas sufren de una “inestabilidad inherente”, por lo que debe tenerse muchas precauciones durante su manipuleo o su procesamiento.

Un conocimiento de los factores involucrados en su “inestabilidad” así como de los mecanismos de degradación es sumamente vital para una eficiente extracción y purificación de las antocianinas y su uso como colorante de alimento.

Entre los factores más importantes que afectan las estabilidades de estos compuestos tenemos:

- **pH.-** Este factor es bastante importante, pues como sabemos las antocianinas son bastante sensibles a las variaciones de pH, a pH 3 el pigmento está presente como sales de flavilio de color rojo, a pH 8 es de color

violeta y a pH 11 de color azul. Debido a estos cambios de color, las antocianinas fueron llamadas “camaleones vegetales” por Tswett. Como las antocianinas varían de color conforme varía el pH del medio, se ha aprovechado esta propiedad para su determinación cuantitativa. Entre los pH 2,0-3,5 la absorción de la luz a 500 mμ es muy fuerte, por lo que un análisis espectrofotométrico bajo tales condiciones es bastante satisfactorio.

Durante el proceso de extracción del colorante es muy importante tener el pH en el rango adecuado para que la degradación del colorante sea mínima, teniendo en cuenta además que muchos alimentos tienen un rango de pH entre 3,0 y 7,0.

Últimos estudios reportan que el color de las antocianinas se hace resistente a las variaciones de pH cuando se encuentran como productos de condensación con catequinas en presencia de aldehídos, siendo en estos casos de mayor valor como agente decoloración de alimentos. (FIGURA N° 6)

- **Temperatura.-** Una prolongada exposición del pigmento antociánico en el medio ambiente trae como consecuencia la degradación de la antocianina, la que es mostrada por la pérdida de color la formación de un pigmento marrón.

La velocidad de estos cambios se acelera con la elevación de la temperatura.

El incremento de la temperatura favorece el rendimiento y velocidad de la extracción, pero puede ser un factor negativo cuando las sustancias son susceptibles a estos cambios.

Generalmente las sustancias orgánicas se descomponen sobre los 100 °C.

- **Cationes Metálicos.-** Los cationes metálicos producen una decoloración progresiva en los pigmentos de los vegetales, especialmente los iones Fe^{+++} y Cu^{+++} . Estos iones se encuentran comúnmente en cualquier alimento, y también en todos los equipos de procesamiento. En su acción catalítica, es muy posible, que los iones metálicos dependiendo de su estado de oxidación, puedan actuar como donantes y receptores de electrones desestabilizando el centro electrofílico, como resultado se obtendría un reordenamiento de las cadenas con degradación y pérdida del color.
- **Oxígeno.-** Los mecanismos de oxidación de las antocianinas se reconocen como reacciones en cadena. El efecto deteriorante del oxígeno en las antocianinas se manifiesta como un pardeamiento del producto con una pérdida de color. Uno de los reactivos antioxidantes y estabilizantes más usados para favorecer la estabilidad del color en pigmentos vegetales es el ácido ascórbico en concentraciones que varían entre 0,01 - 0.05 %.
- Las antocianinas son estables al estado de sales y únicamente conviene trabajarlas en medio ácido y aislarlas como cloruros. Por ebullición con ácidos inorgánicos se hidrolizan produciendo antocianinas y azúcares. (FIGURA N° 7)

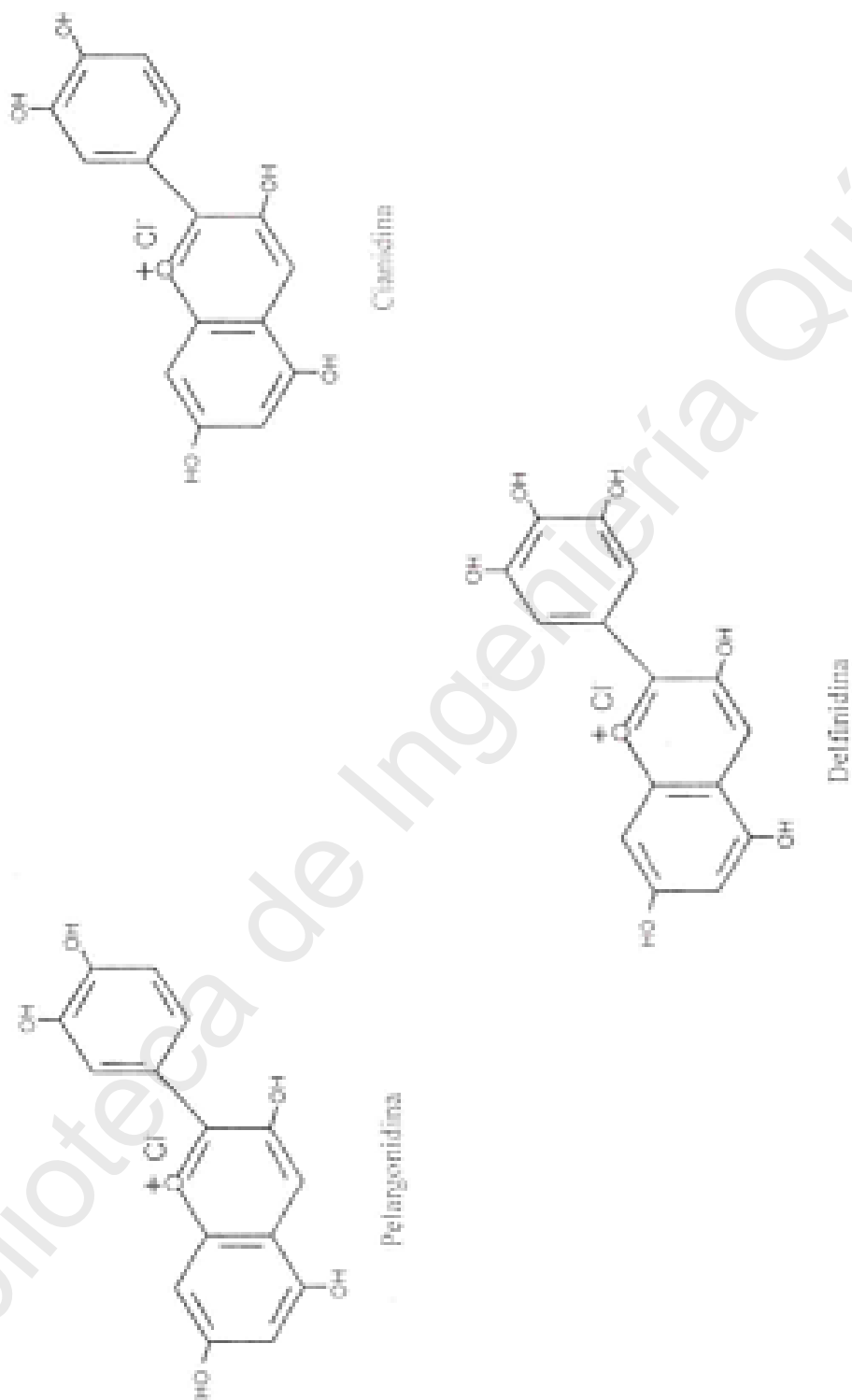


FIGURA N° 4: Tipos de Antocianinas

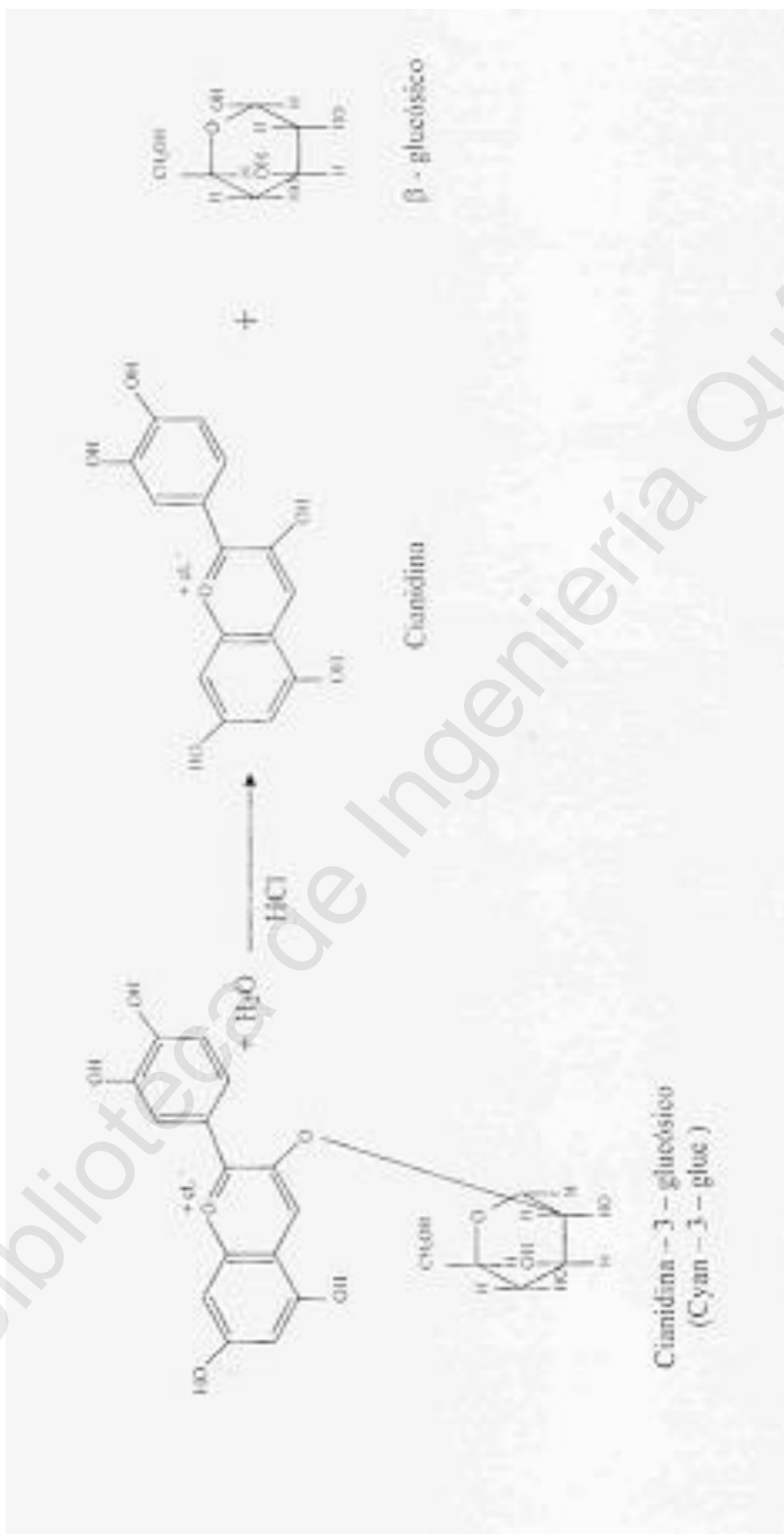


FIGURA N° 5: Hidrólisis de la Cianidina – 3 - glucósido

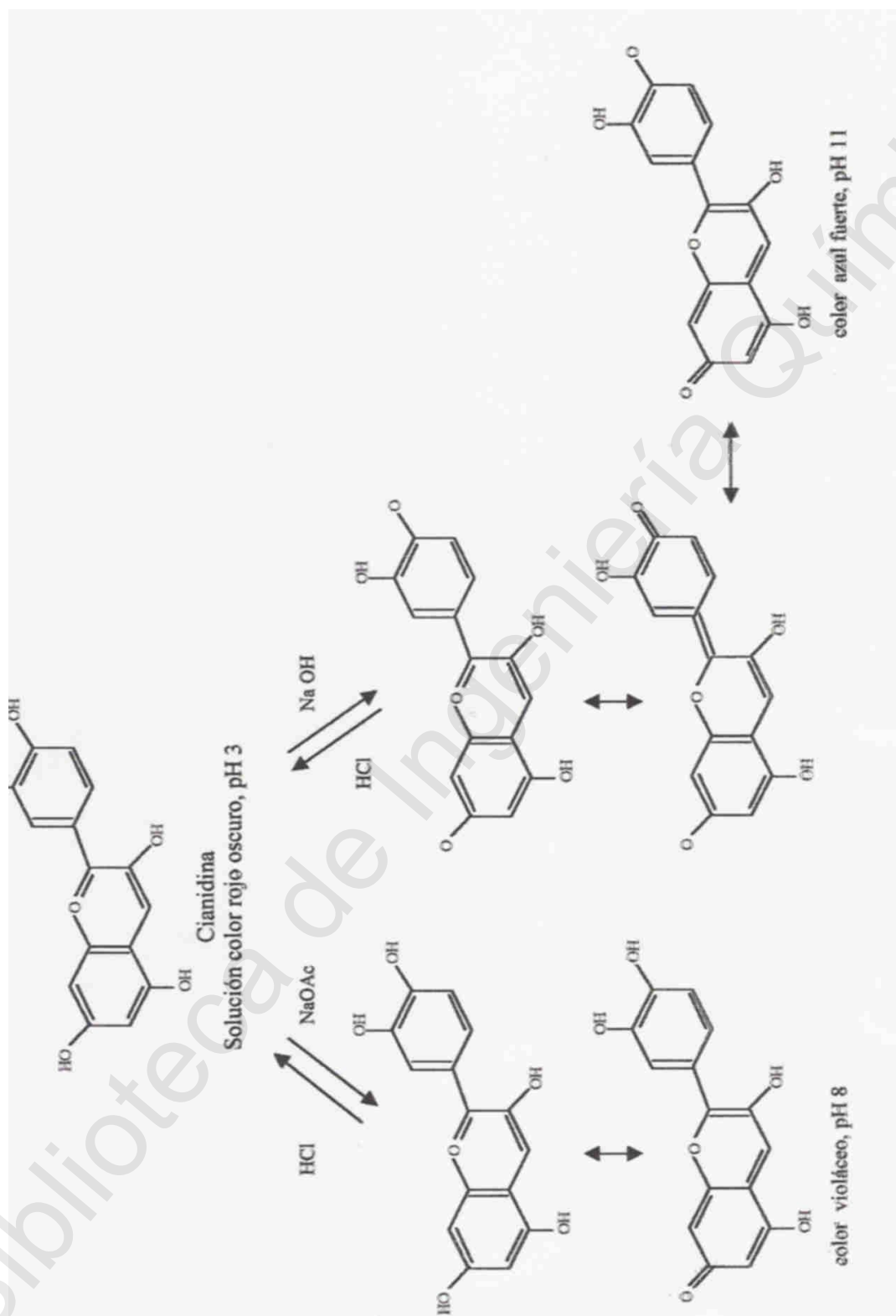


FIGURA N° 6: La antocianina y sus cambios de coloración

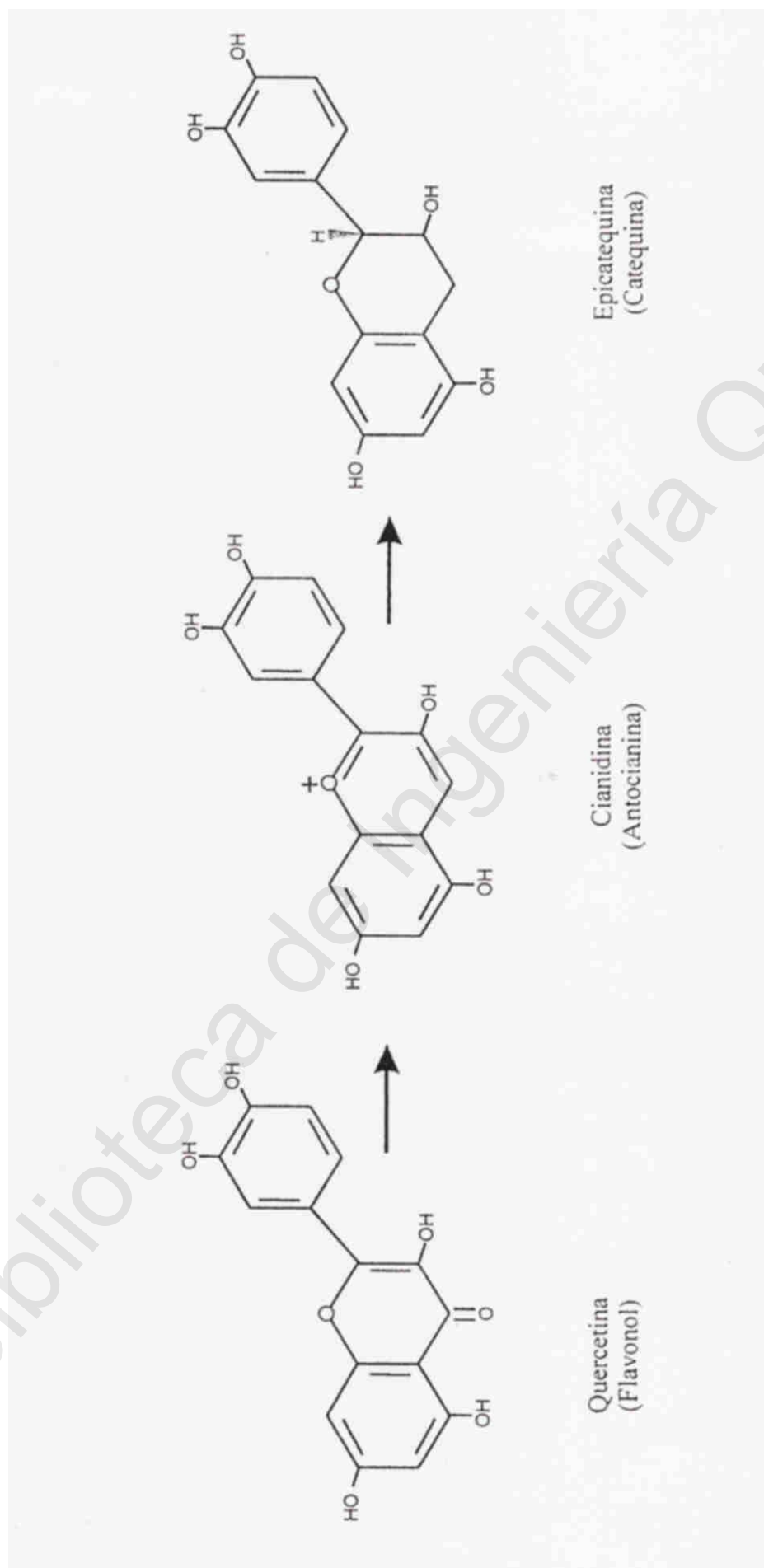


FIGURA N° 7: Grado de Oxidación de Antocianina

1.2.2.6.4. USOS Y APLICACIONES^{21, 9}

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria, por ello es imprescindible obtenerlo de vegetales comestibles.

Este colorante se utiliza relativamente poco, sólo en algunos derivados lácteos (yogur), helados, dulces, caramelos, productos de pastelería y conservas vegetales (hasta 300 mg/kg), aunque están también autorizados en conservas de pescado (200 mg/kg), productos cárnicos, licores, sopas y bebidas refrescantes inclusive en productos farmacéuticos y cosméticos.

Los colorantes naturales, en muchos casos no tienen limitación legal a su uso que la buena práctica de la fabricación; cuando se ingieren los antocianos son destruidos en parte por la flora intestinal, los absorbidos se eliminan en la orina, muy poco en la bilis, previa ciertas transformaciones. La ingestión diaria de estas sustancias puede estimarse en unos 200 mg por persona.

Debido a que las antocianinas experimentan cambios de color conforme varía el pH, se pueden utilizar en la industria química para la fabricación de indicadores.

Por hidrogenación de la cianidina se forma catequina, que por hidrólisis da rojo de tanino y este es un valioso material curtiente.

1.2.2.7. EXTRACCIÓN DE LAS ANTOCIANINAS^{19, 21}

La extracción puede realizarse en frío con solventes no acidificados, como metanol 60%, n-butanol, etilenglicol, propilenglicol, acetona, mezcla de acetona/metanol/agua, o simplemente con agua a ebullición; en estos casos se espera que las antocianinas sean extraídas en el estado más natural posible, ya que en medio ácido, como HCl, podría alterar su estado original, además que puede producirse pérdida de grupos ácidos lábiles y de azúcares.

Como medio ácido puede utilizarse además de HCl, ácidos orgánicos como el ácido fórmico y ácido tartárico.

Otro método de extracción es por maceración de la muestra con una solución de HCl 1% en metanol (el etanol en caso de utilizarlos para alimentos), dejándolo toda la noche en la refrigeradora (recipiente cerrado).

1.3. IDENTIFICACIÓN

1.3.1. CROMATOGRAFÍA²⁵

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite a los científicos separar componente estrechamente relacionados en mezclas complejas. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria inmisible, la cual se mantiene fija en una columna o sobre una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas discriminadas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente.

- **CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS²⁵**

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar en dos modos distintos.

El primero de ellos se basa en la forma como las fases estacionaria y móvil se ponen en contacto. Cabe resaltar que sólo la Cromatografía de líquidos es la que puede realizarse en columnas o superficies planas; por otra parte, la cromatografía de gases y la de fluidos supercríticos están restringidas a los procedimientos en columna.

La segunda clasificación de los métodos cromatográficos se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases.

En la **cromatografía en columna**, la fase estacionaria se mantiene dentro de un tubo estrecho a través del cual se hace pasar la fase móvil por presión o por gravedad.

En la **cromatografía plana**, la fase estacionaria se mantiene sobre una placa lisa o en los intersticios de un papel; en este caso la fase móvil se desplaza a través de la fase estacionaria por capilaridad o por gravedad.

Los métodos de cromatografía plana incluyen la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía en papel (PC) y la electrocromatografía (EC).

La cromatografía plana se basa en la técnica de la capa fina, que es rápida, tiene una mejor resolución y es más sensible que su alternativa en papel.

De hecho, una importante aplicación de la cromatografía en capa fina, es la de servir como una guía para el desarrollo de las condiciones óptimas para realizar separaciones por cromatografía de líquidos en columna.

1.3.2. ESPECTROSCOPIA²⁹

Es la disciplina que se encarga del estudio de la radiación electromagnética emitida o absorbida por las sustancias.

La esencia de toda espectroscopia óptica consiste en hacer interactuar un haz de radiación electromagnética con un sistema cuyas características se quieren determinar. En términos generales el haz saliente difiere del entrante por efecto de esta interacción. A partir de las modificaciones sufridas por el haz entrante se puede, en principio obtener información sobre la estructura del sistema bajo estudio.

La importancia de la espectroscopia es indiscutible, pues se ha convertido en una herramienta insustituible para la identificación y caracterización de sustancias.

1.3.2.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO²⁵

La región infrarroja del espectro incluye la radiación con números de onda comprendidos entre los 12 800 y los 10 cm^{-1} , lo que corresponde a longitudes de onda de 0.78 a 1000 μm^1 .

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los instrumentos, es conveniente subdividir el espectro infrarrojo en 3 regiones denominadas infrarrojo cercano, medio y lejano.

| REGIÓN | INTERVALO DE LONGITUD DE ONDA μm^1 | INTERVALO DE NÚMEROS DE ONDA cm^{-1} | INTERVALO DE FRECUENCIA Hz |
|------------------|---|---|---|
| Cercano | 0.78 a 2.5 | 12 800 a 4000 | 3.8×10^{14} a 1.2×10^{14} |
| Medio | 2.5 a 50 | 4000 a 200 | 1.2×10^{14} a 6.0×10^{12} |
| Lejano | 50 a 1000 | 200 a 10 | 6.0×10^{12} a 3.0×10^{11} |
| La más utilizada | 2.5 a 670 | 4000 a 670 | 3.0×10^{11} a 1.2×10^{14} |

La espectroscopia infrarroja tiene una gran aplicación en el análisis cualitativo y cuantitativo. Su principal utilización ha sido la identificación de compuestos orgánicos, que por lo general presentan espectros complejos en el infrarrojo medio, con numerosos máximos y mínimos que resultan útiles al efectuar comparaciones.

En efecto, en muchos casos, el espectro infrarrojo medio de un compuesto orgánico proporciona una huella única, con unas características que se distinguen fácilmente de los modelos de absorción del resto e compuestos; sólo los isómeros ópticos absorben exactamente de la misma forma.

Además de su aplicación como herramienta para el análisis cualitativo, las medidas en el infrarrojo también están encontrando un uso cada vez mayor en el análisis cuantitativo. En este caso, su

elevada selectividad a menudo hace posible la cuantificación de una sustancia en una mezcla compleja, no siendo necesario una separación previa.

En resumen este tipo de análisis, nos va a indicar los grupos funcionales que pueda contener el colorante, a una longitud de onda y un porcentaje de transmitancia determinada.

1.3.2.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN EN EL UV VISIBLE^{6, 30}

La absorción de radiación ultravioleta visible se produce generalmente a consecuencia de la excitación de electrones de enlace. Debido a esto, las longitudes de onda de picos de absorción pueden relacionarse con los tipos de enlace existente es la especie que se estudia.

Este tipo de espectroscopia nos indicará los tipos de transición electrónica que pueda experimentar los elementos químicos, de lo cual se puede deducir los grupos funcionales ya que cada grupo funcional, presenta un determinado tipo de transición electrónica. El espectrómetro ultravioleta visible, representará la absorbancia vs. la longitud de onda.

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1 MATERIAL FITOQUÍMICO:

Para la realización de esta tesis se utilizó panojas de Colorquehua, "*Amaranthus sp*" de cinco sembríos diferentes de localidades del departamento de Cajamarca, a las cuales se realizó análisis bromatológicos, fitoquímicos y luego, se seleccionó una de las muestras para la realización del secado por liofilización y posteriormente los análisis correspondientes a la caracterización.

2.1.2. MATERIAL DE LABORATORIO:

2.1.2.1. MATERIAL DE VIDRIO:

- Capilares de 0.5 mL de diámetro.
- Embudos de decantación.
- Embudo para filtración.
- Embudos de vidrio.
- Fiolas de 1000, 100, 50, 10 mL.
- Luna de reloj.
- Matraces de 250, 500 y 1000 mL.
- Pipetas de 1, 5, 10 mL.
- Picnómetro de 25 mL
- Probetas de 100 mL.
- Termómetros.
- Tubos de ensayo.

- Varillas de agitación.
- Vasos de precipitación 100,500 ml.

2.1.2.2. MATERIAL DE PORCELANA:

- Crisoles.
- Morteros.

2.1.2.3. EQUIPOS:

- Agitador magnético.
- Balanza analítica Sartorius.
- Campana extractora de gases.
- Cocina eléctrica.
- Columna para cromatografía.
- Equipo de destilación al vacío.
- Equipo de destilación simple.
- Equipo de extracción Soxhlet.
- Equipo de Liofilización Labconco-Lyph-Look 18.
- Equipo para analizar proteínas.
- Espectrofotómetro Infrarrojo Perkin-Elmer.
- Espectrofotómetro UV -Visible Diode Array
8452A Hewett-Packard.
- Estufas.
- Medidor de pH.
- Rotavapor Heidolph.

2.1.2.4. Otros:

- Cromatofolio.
- Goteros.
- Papel Whatman 1 para cromatografía en papel
- Papel de filtro.
- Papel indicador de pH.
- Gradilla.

2.1.3. MATERIAL QUÍMICO:

- Acetona (G.R.).
- Acetato de Plomo: 5%.
- Ácido Acético (G.R.).
- Ácido Clorhídrico (G.R.)
- Ácido Pírico.
- Ácido Sulfúrico (G.R.)
- Alcohol amílico.
- Agua bidestilada
- Agua destilada.
- Cinta de Magnesio.
- Cloroformo (G.R.).
- Cloruro de Mercurio.
- Etanol grado absoluto.
- Éter de petróleo.
- Granallas de Zinc.
- Hexano.
- Hidróxido de sodio en pellet.
- Indicador Rojo de Metilo.
- Metanol (G.R.).
- Nitrato de Bismuto.
- Sílica gel Aldrech para cromatografía.
- Sulfato de Cobre pentahidratado.
- Yodo.
- Yoduro de Potasio.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. MÉTODOS DE CONTROL¹⁶:

Son análisis bromatológicos para los alimentos, los cuales pueden llevarse a cabo por determinaciones físicas y químicas. Para este trabajo de investigación se determinaron los métodos de control de la panoja de la colorquehua, y también de las semillas de la planta con la finalidad de realizar un mejor estudio.

Determinaciones Físicas: Varían según los cambios ambientales, y son de gran importancia pues influyen en el valor alimentario del producto. Una de ellas es: humedad.

Determinaciones Químicas: Nos permiten conocer la composición íntima del producto y saber así el aporte de los principios alimentarios del organismo. Son: proteínas, carbohidratos, fibra, ceniza y grasas.

2.2.1.1. DETERMINACIÓN DE AGUA (HUMEDAD)^{16, 24}:

Existen muchísimos métodos para determinar la humedad en los alimentos, y casi todos se basan en la pérdida de peso por calentamiento. Los métodos oficiales recomiendan emplear generalmente una temperatura de 70°C a 110°C durante una o dos horas. De igual manera la técnica ha puesto en manos del químico diversos equipos para conseguir estos propósitos, según sea la clase del producto que se analiza y según sea la cantidad del agua que contenga.

En el procedimiento se coloca la cápsula de porcelana en la estufa a una temperatura de 30°C para eliminar el agua de la porcelana, se enfría en un desecador y se tara la cápsula de porcelana, luego se coloca los 5 g de muestra y se lleva a la estufa a 100°C por espacio de dos o tres horas, posteriormente se deja enfriar en un desecador y se pesa en balanza analítica.

Si asumimos que el peso de la muestra equivale al 100% de humedad se saca la relación con el peso obtenido después de secar la

muestra y obtenemos el % de humedad de la muestra de panoja de colorquehua.

2.2.1.2. CENIZA²⁴:

La presencia de sales minerales en un alimento se demuestra por la obtención de las cenizas por calcinación. Estas sales se hallan en estado de sulfatos, cloruros, fosfatos, carbonatos, nitratos y sales orgánicas.

Se utiliza el método de incineración directa, con lo cual se destruye la materia orgánica completamente, quedando al final sólo cenizas.

2.2.1.3. PROTEÍNAS¹⁶:

Para la determinación de proteína se emplea el método de Kjeldhal que se basa en la transformación de nitrógeno orgánico en nitrógeno amoniacal, por acción del ácido sulfúrico en caliente y ayudado por la presencia de sustancias catalizadoras.

El amoniaco obtenido, previa alcalinización, es destilado para ser recibido en una solución de ácido sulfúrico 0.1N con la formación por lo tanto de sulfatos de amonio, el cual se valora con una solución de NaOH valorado.

En el procedimiento se pesa 1 g de muestra y se coloca en un balón de kjeldhal, agregar 1.5 g de sulfato de potasio (K_2SO_4), 1 gramo de sulfato de cobre pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), y 25 mL de ácido sulfúrico H_2SO_4 concentrado. Se calienta.

Una vez enfriado se agregan 300 mL de agua destilada.

Posteriormente se mide 100 mL de ácido sulfúrico 0.1 N (con una pipeta volumétrica), en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, luego agregar de 2 a 3 gotas del indicador rojo de metilo y colocarla en el terminal del condensador. Agregar al balón 6 granallas de zinc y 80 ml de solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 50%, e inmediatamente conectarlo al aparato de destilación, realizando la destilación hasta el volumen de 350 ml en el matraz colector.

Se titula el exceso de ácido con una solución valorada de hidróxido de sodio (NaOH) de 0.1N y se debe correr un blanco paralelamente.

2.2.1.4. GRASAS¹⁶:

Las grasas y los aceites esenciales constituyen una clase bien definidas de sustancias neutras, solubles en disolventes orgánicos, pero no en agua, y son producidos en alguna cantidad por las plantas y los animales.

Universalmente existe un método oficial que es el método de extracción de Soxhlet. Este ingenioso aparato de vidrio, es provisto de un sifón que actúa intermitentemente y automáticamente se adapta para obtener en forma cuantitativa una cantidad considerable del material, que está contenido en un cartucho de papel que permite hacer un examen posterior del extracto.

Para nuestro trabajo pesamos 10 g de la panoja de colorquehua sobre un papel de filtro en forma de cartucho, se tapa ligeramente con algodón en rama desengrasado y se introduce en un extractor tipo Soxhlet. En el balón se coloca el solvente, y se coloca todo en calor, efectuándose la extracción aproximadamente durante 4 horas, en las que se produce la extracción 10 veces.

El extracto etéreo que contiene la materia grasa, se pasa a un matraz Erlenmeyer debidamente tarado, se destila el solvente, el matraz con el residuo se lo lleva a completa sequedad a bajas temperaturas, se deja enfriar y se pesa por deferencia se encuentra la cantidad de grasa que existe en la muestra. El resultado se relaciona con el 100% para obtener el porcentaje de grasas.

2.2.1.5. FIBRA¹⁶:

La fibra bruta es el residuo orgánico lavado y seco que queda después de hervir sucesivamente el material desengrasado con ácido sulfúrico e hidróxido de sódico diluido. Aunque la fibra consta esencialmente de celulosa, la cantidad obtenida depende del procedimiento analítico empleado y de allí la importancia de utilizar siempre el mismo método.

Para determinar la cantidad de fibra en una muestra se debe pesar la muestra, con aproximación del mg alrededor de 2,7 - 3.0 g de

muestra y se traslada a un aparato de extracción, donde se extrae éter de petróleo. Alternativamente, se extrae con éter de petróleo por agitación, sedimentación y decantación por tres veces. La muestra extraída se saca al aire y se pasa a un matraz Erlenmeyer de 1000 mL seco. Se añaden 200 mL de H₂SO₄ 0,255 N, medidos a temperatura ambiente y calentados hasta ebullición, los 30 - 40 mL primeros sirven para dispersar la muestra, la mezcla se calienta a ebullición en un minuto. Si fuera necesario, se agrega una cantidad apropiada de antiespumante. Se hierve la mezcla suavemente durante 30 minutos exactos manteniendo un volumen constante y girando el matraz para uniformizar el contenido y arrastrar las partículas de las paredes. Mientras tanto se prepara un embudo Buchner provista de placa perforada y se le ajusta una tela de algodón o un papel de filtro que cubran los orificios de la placa y que servirán de soporte del adecuado papel de filtro.

2.2.2. MÉTODO DE ANALISIS FITOQUÍMICO^{8, 20}:

Se realiza una prueba para determinar la naturaleza del colorante y al mismo tiempo la determinación fitoquímica de los compuestos que contiene. Para ello se realiza por el método de análisis fitoquímico o marcha fitoquímica. Cabe resaltar que estos análisis son cualitativos para lo cual los pesos y demás valores fueron tomados de acuerdo a la preferencia del analista.

2.2.2.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA:

A 50g de la muestra (parte empleada de la planta) se la pulveriza en un mortero, y se agrega 160 ml de etanol, se macera durante unos días (10), posteriormente, se filtra y se concentra a rotavapor a temperaturas de aproximadamente 40 °C hasta obtener aproximadamente 30 ml.

Se separa en fracciones para realizar las pruebas de alcaloides, flavonoides, antocianinas, taninos, esteroides y quinonas respectivamente.

2.2.2.2. REACCIONES CARACTERÍSTICAS²⁰:

Se ha desarrollado una serie de métodos para la detección preliminar de los diferentes constituyentes químicos en las plantas, basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración.

- **ALCALOIDES:**

Se trata de la primera fracción del preparado anterior, al cual en un vaso colocamos 10 mL de la solución alcohólica, se le agrega 5mL de ácido clorhídrico al 1.5% v/v (en agua) y se agita y se procede a la identificación de alcaloides; cuando se sospecha la presencia de grasas y otras impurezas se realiza la siguiente operación:

A los alcaloides de la fase hidroalcohólica que se hallan bajo la forma de clorhidratos se le añade 5mL de cloroformo y 5mL de NaOH al 5% con lo cual los alcaloides básicos pasan a la fase clorofórmica, luego se añade 5 a 10 mL de HU y se agita utilizando un embudo de separación, se recoge la fase acuosa que contiene los alcaloides y se desecha la fase clorofórmica.

Con la fase acuosa se realizan las siguientes pruebas:

Prueba de Dragendorf²⁰:

3mL de muestra + 1mL de reactivo de Dragendorf, previamente preparado, la formación de un precipitado rojo ladrillo indica la presencia de alcaloides.

Prueba de Mayer²⁰:

3mL de muestra + 1mL de reactivo de Mayer, la presencia de alcaloides es positiva cuando se forma un precipitado blanco.

Prueba de Hager²⁰:

3mL de la muestra + 1mL de ácido pícrico (solución saturada), la presencia de alcaloides se mostraría con un precipitado amarillo.

*Prueba de Wagner*²⁰:

3mL de la muestra + 1mL de reactivo de Wagner, la presencia de alcaloides mostraría un precipitado rojo.

- **FLAVONOIDES**^{8, 20}:

Con la segunda fracción, se toma 10 mL de la muestra se tratan con 10 mL de éter de petróleo, se agitan y se obtiene una mezcla hidroalcohólica (agregar un medio separador en este caso agua). Esta mezcla se coloca en un embudo de separación recogiendo primero la fase etérea que nos servirá posteriormente y luego la fase hidroalcohólica.

Con la fase hidroalcohólica se procede a realizar diferentes pruebas:

*Prueba de Shinoda*²⁰:

3mL de solución, se le inserta un trocito de cinta de magnesio y unas gotas de HCl cc. Aparecerá una gama de colores como anaranjada, roja, roja azulosa, o violeta si se encontraran presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavonoles, o santonas.

*Prueba de Zinc*²⁰:

También se usa 3 mL de solución + 1 granalla de zinc, y ac. clorhídrico solo los flavonoles dan colores intensos.

- **ANTOCIANINAS**^{8, 20}:

*Prueba de Ácido Sulfúrico*²⁰:

1 mL de solución + 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Si aparece un color negro nos indica la presencia de antocianinas; si son anaranjadas o guindas son las flavonas. Las chalconas y auronas dan coloración rojo guinda o rojo azuloso.

*Prueba de Hidróxido de Amonio*²⁰:

Con gotas de hidróxido de amonio, coloración azul, indica antocianinas.

*Prueba con solvente Forestal*²⁰:

Se puede determinar antocianinas realizando una cromatografía de papel, se prepara una solución forestal, la que se usa como eluyente y se desarrolla sobre un papel Whatman 1, y se revela con vapor de amoniaco. El revelado muestra manchas de color marrón que corresponden a las antocianinas.

- **TANINOS**²⁰:

Prueba de Feel:

2mL de muestra + 1mL de solución de FeCl₃ al 1% apareció un color no identificable y muy ligero; de haber sido un color azul indicaría la presencia de grupos fenólicos, o taninos.

- **SAPONINAS**²⁰:

Prueba de la Espuma:

2mL de solución + 2mL agua, se agita y no hubo formación de espuma, lo que indica que no contiene saponinas.

- **ESTEROIDES**²⁰:

A la fase etérea se agrega sobre un filtro que contiene carbonato de sodio anhidro para detener la posible humedad.

Se miden 2mL de la solución etérea. Se le agrega por las paredes 1mL de anhídrido acético y luego 1mL de ácido sulfúrico evitando la mezcla.

La presencia de esteroides depende de las coloraciones formadas.

Un anillo rojo violáceo: colesterol

Un anillo azul: estigmasterol

Un anillo verde: fitosterol

2.2.3. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO:

El proceso usado para la realización de los objetivos del presente trabajo es una combinación de operaciones y reacciones químicas; con lo que respecta a la extracción del colorante de la panoja de Colorquehua, se realizaron varias pruebas, método de extracción mediante reflujo con Soxhlet, por maceración y por ebullición de materia prima, para determinar el mejor extractor tomando de ellos el más natural posible y además tomando en cuenta el solvente con el que se obtiene mayor rendimiento. Referente a la identificación de la antocianina se efectuó el aislamiento por vía cromatográfica, luego se identificó por métodos espectroscópicos. Los métodos señalados han sido obtenidos de referencias teóricas, siendo elegidos por ser los más adecuados, posibles y a la vez confiables.

(FIGURA N° 10)

2.2.3.1. RECOLECCIÓN DE LA MATERIA PRIMA:

La recolección de las plantas de Colorquehua se realizó en el Departamento de Cajamarca, en la provincia del mismo nombre y además en la provincia de Celendín.

Las muestras fueron recolectadas de cultivos diferentes:

Fundo la Victoria - UNC (Cajamarca), Fundo Santa Dorotea (Cajamarca), Fundo Santa Rosa (Celendín), Fundo de la UNC (Celendín), Sucre (Celendín).

Para la recolección se cortó con una hoz las plantas de Colorquehua de la parte inferior del tallo cuidando de no maltratar las panojas que son la materia prima para la extracción del colorante.

Se separan las panojas de la Colorquehua, de los tallos y las hojas de estas las cuales se pueden usar como alimento de animales.

2.2.3.2. ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA:

Las panojas de las plantas de Colorquehua que han sido recogidas son sometidas a una limpieza, es decir se retira el polvo u otras impurezas que adquirió durante su cultivo; posteriormente se separa cuidadosamente los grupos de frutos de la panoja por sus pequeñas

ramas y estando frescas se realiza los correspondientes procedimientos para la realización de esta investigación.

2.2.3.3. SELECCIÓN DEL SOLVENTE:

Se probaron varios solventes para la encontrar la mejor extracción y al mismo tiempo la más natural que permita la utilización del colorante extraído en la industria de los alimentos y la de los cosméticos. Para esta etapa se utilizó como solventes: etanol, hexano, agua destilada y etanol-agua destilada.

2.2.3.4. EXTRACCION CON SOLVENTES¹⁹:

2.2.3.4.1. EXTRACCION POR MACERACION:

Se pesa 10 gramos de muestra, panoja de colorquehua, se midió 100 ml. de etanol, hexano, agua destilada y etanol-agua destilada, se coloca respectivamente cada una en un recipiente que debe ser tapado herméticamente y alejado de la luz solar directa. El contenido se agita 3 veces al día por un tiempo de 3 minutos en cada ocasión. El tiempo de maceración fue de 4 días.

Luego se filtra para separar del extracto los residuos de la panoja usada como muestra.

2.2.3.4.2. EXTRACCIÓN CONTINUA EN SOXHLET:

En esta extracción se uso también 10 g de muestra y solamente dos solventes: etanol, hexano, agua destilada y etanol - agua destilada, con un volumen de 150 mL en cada caso que son depositados en el balón que esta conectado al equipo Soxhlet. Se calienta el solvente hasta ebullición, los vapores suben por el tubo lateral del equipo y condensan al pasar por el refrigerante de bolas que se encuentran en la parte superior, cayendo hacia la cámara de extracción por goteo, la cual al llenar su capacidad empieza a ser evacuada por sifoneo. El solvente

con el colorante extraído cae al balón y nuevamente los vapores del solvente ascienden repitiendo el proceso hasta observar cristalino el solvente que cae de la cámara de extracción.

Esta experiencia se logra en su totalidad en un tiempo aproximado de 2 a 3 horas. El tiempo depende del solvente que se utiliza.

El extracto que se obtuvo se deposita en un vaso de precipitación.

2.2.3.4.3. EXTRACCIÓN POR EBULLICIÓN DE MATERIA

PRIMA:

Al igual que en las otras extracciones se toma 10 g de muestra de la materia prima, la cual se prueba con los solventes: etanol, hexano, agua destilada y etanol - agua destilada. El volumen del solvente es de 100 mL en cada caso. Se coloca la muestra respectivamente pesada en un vaso de precipitación, y se calienta hasta ebullición con una cocina eléctrica por espacio de 10 min. El tiempo es relativo al solvente que se usa. Se deja enfriar la solución y se filtra al vacío.

2.2.3.5. SECADO POR LIOFILIZACIÓN^{3, 17}:

La liofilización es una operación unitaria que consiste en la eliminación del agua de un producto por sublimación del agua libre desde la fase sólida. Normalmente este proceso de secado da un producto deshidratado de mayor calidad debido a las bajas temperaturas utilizadas.

Estas bajas temperaturas impiden el desarrollo de reacciones de deterioro provocadas por temperaturas elevadas.

Por otra parte la estructura rígida del alimento congelado previene daños mecánicos como el encogimiento durante el proceso de secado. El producto final mantiene un buen gusto, aroma, retención de nutrientes, y excelentes propiedades de rehidratación.

El proceso de liofilización consiste esencialmente en dos etapas:

- Primer el producto se congela.
- Posteriormente, el producto se seca por sublimación directa del hielo bajo una presión reducida.

La liofilización se ha mostrado como método efectivo para ampliar la vida media de los alimentos y tiene dos características importantes:

La primera es la virtual ausencia de aire durante el proceso, y la segunda es el secado a una temperatura inferior a la ambiente.

El procedimiento consiste en tomar 97 mL de extracto , el cual anteriormente fue concentrado a rota-vapor, por un pequeño espacio de tiempo.

El volumen de muestra es vaciado completamente en la bandeja del liofilizador, cuya capacidad es de hasta 400 g , a la cual al mismo tiempo se le coloca un sensor de temperatura del mismo liofilizador para medir los parámetros importantes del proceso de secado: temperatura del producto y tiempo de liofilización.

Al terminar el proceso, se toma el peso del producto liofilizado, luego es colocado en una bolsa platinada, evitando así que se filtre la humedad del ambiente y se deteriore el producto.

2.2.3.6. SEPARACIÓN:

La separación de una mezcla de colorantes se realiza por medio de la cromatografía, por ser esta una de las técnicas más usadas para los tipos de separaciones en las que interviene una fase móvil y una fase estacionaria; además de que mediante esta separación se obtienen mejores rendimientos cuantitativos.

2.2.3.6.1. CROMATOGRAFÍA:

Para obtener el solvente o mezcla de solventes más adecuado para realizar una mejor separación en la cromatografía de columna, se realiza primero la cromatografía tanto de papel como de capa fina, efectuándose diversas pruebas de mezclas y proporciones

del solvente que será el eluyente que realizará la separación dicha cromatografía de columna.

• **CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA**¹⁹:

La técnica de cromatografía en capa fina (TLC) es una de las más comunes empleadas en un laboratorio de Química Orgánica. Entre otras cosas permite: Determinar el grado de pureza de un compuesto, comparar las muestras, realizar el seguimiento de una reacción y controlar el contenido de las fracciones obtenidas en cromatografía de columna¹⁵. Las separaciones sobre capa delgada se parecen en muchos aspectos a las de papel. Usaremos como medio adsorbente unas placas llamadas cromatofolio, los solventes usados fueron muchos y se aplicaron usando la técnica ascendente, explicada a continuación³¹.

Las muestras se aplican siempre sobre el papel cromatofolio en forma de solución. Para esto los sólidos se disuelven en una pequeña cantidad de solvente.

Para realizar una cromatografía en capa fina se procede de la siguiente manera: Se prepara o corta, en su caso, un cromatofolio de tamaño adecuado una vez elegido el tamaño del cromatofolio a usar (6 cm x 1.5 cm.) se dibuja con lápiz una línea paralela al lado por el que se va a comenzar la cromatografía y se aplica la muestra en la parte central de la línea con un tubo capilar de 0.5 mm. de diámetro interior. Luego se introduce la placa en un vaso de precipitación o recipiente adecuado con el solvente. Dicho recipiente debe presentar una atmósfera saturada en el vapor del disolvente por lo que se pone un trozo de papel de filtro en la parte posterior

y se debe disponer de un sistema de cierre. Inmediatamente se cierra el recipiente y se deja que el líquido ascienda por capilaridad³¹.

Después de que el solvente adquiere la distancia requerida (normalmente 1 cm antes del final del cromatofolio), se saca el cromatofolio del vaso y se señala el frente del disolvente marcándolo con lápiz. El papel se seca sobre una luna de reloj con ayuda de un secador de cabello o una estufa a 40 °C. Una vez seco ya está el papel listo para revelar y determinar las posiciones relativas de los puntos mediante el cálculo del R_f .

Si las sustancias son coloreadas, esto no presenta dificultad, pero hay otras que son incoloras, por consiguiente, invisibles, en este caso se usan métodos físicos y uno de ellos es la fluorescencia, usando la lámpara de rayos ultravioleta.

Se ensayaron una diversidad de solventes y mezclas de estos como:

- $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$: (6.5:4.5:1.2), (6.5:5:1),
(6.5:4.5:1), (6.5:4:16.5:4:1).
- $\text{CHCl}_3:\text{HOAc}$: (25:1).
- $\text{CHCl}_3:\text{HOAc}:\text{MeOH}$: (18:1:1).
- $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCl } 10\%$: (6.5:4.5:1.2), (6.5:5:1),
(6.5:4.5:1), (6.5:4:16.5:4:1).
- $\text{H}_2\text{O}:\text{HOAc}:\text{HCl}$: (30:10:3).

• **CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA**^{31, 32}:

Se emplea para la separación de mezclas o purificación de sustancias a escala preparativa. Como fase estacionaria se usa, generalmente, gel de sílice o alúmina dentro de una columna, en este caso se usó el gel de sílice. La elección del solvente es crucial para una buena separación, en este caso el

solvente elegido es: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{HCl}$ 10% (6.5:4.5:1). Dicho solvente pasa a través de la columna por efecto de la gravedad o bien por aplicación de presión (cromatografía flash).

El orden de elución de compuestos es aproximadamente el que se indica en la FIGURA N°8, junto con la polaridad de los solventes:

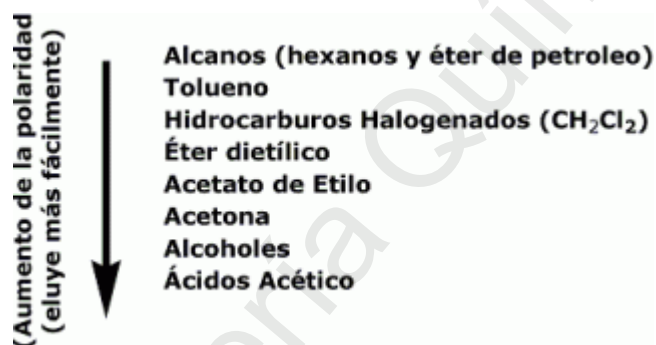


FIGURA N° 8: Polaridad de los solventes

Se le proporcionará a la columna 0.5072 g de una mezcla sólida, de la cual separará el producto principal, para empacar la columna se sujeta con el soporte y con las pinzas. Se debe mantener la llave y en posición de cerrado. Luego se introduce hasta el fondo un pequeño pedazo de algodón ayudándose con la varilla de vidrio, se presiona suavemente el algodón para que quede bien colocado y sin burbujas. Preparar una suspensión de 20 g de gel de sílice para columna en 50 ó 60 ml del solvente y agite durante 5 minutos para eliminar las burbujas. A través del embudo vierta la suspensión en la columna golpeando ligeramente con los dedos para que el empacado sea uniforme. Se debe abrir la llave para eliminar el exceso de disolvente teniendo cuidado de no dejar secar la gel de sílice. En un vaso de precipitación se disuelve la muestra en este caso

del colorante con la mínima cantidad del disolvente indicado, en este caso 5mL de HCl al 10%, y ayudándose con el agitador viértala con cuidado, para que quede colocada uniformemente por encima de la gel de sílice, abra la llave para que salga eluyente y se adsorba la muestra aplicada, en todo momento se debe tener cuidado que no se seque el gel de sílice. Luego de estos pasos se eluye en la columna con el solvente separador anteriormente determinado³³. Colecte las fracciones (eluatós) de 5 ml en tubos de ensayo y controle la separación, haciendo cromatografía en capa fina a cada una de las fracciones ante una muestra de referencia (testigo) como se indica en la FIGURA N° 9.

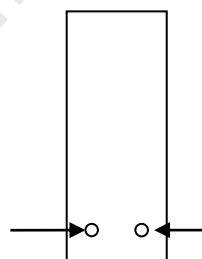


FIGURA N° 9: Cromatografía de Capa Fina

Eluya las cromatoplacas con el solvente utilizado en la cromatografía de columna, y revele con vapores de yodo o amoníaco y esponga a luz ultravioleta para mejor observación del analista. En cada cromato-placa (cromatofolio) observe el cambio de la intensidad de coloración de la mancha del producto principal. La elución y separación termina en el momento en que no aparece mancha. En un matraz se reúnen las fracciones que contengan la misma sustancia. Para recuperar la sustancia destile el exceso de disolvente, utilizando una destilación al vacío, calentando con un baño maría eléctrico.

2.2.3.7. IDENTIFICACIÓN¹⁹:

Los compuestos aislados y purificados por medio de la cromatografía de columna se identificaron por métodos espectroscópicos utilizando los equipos: espectrofotómetro ultravioleta visible (UV-VIS) y espectrofotómetro infrarrojo (IR).

2.2.3.7.1. ESPECTROSCOPIA UV-VIS¹⁰:

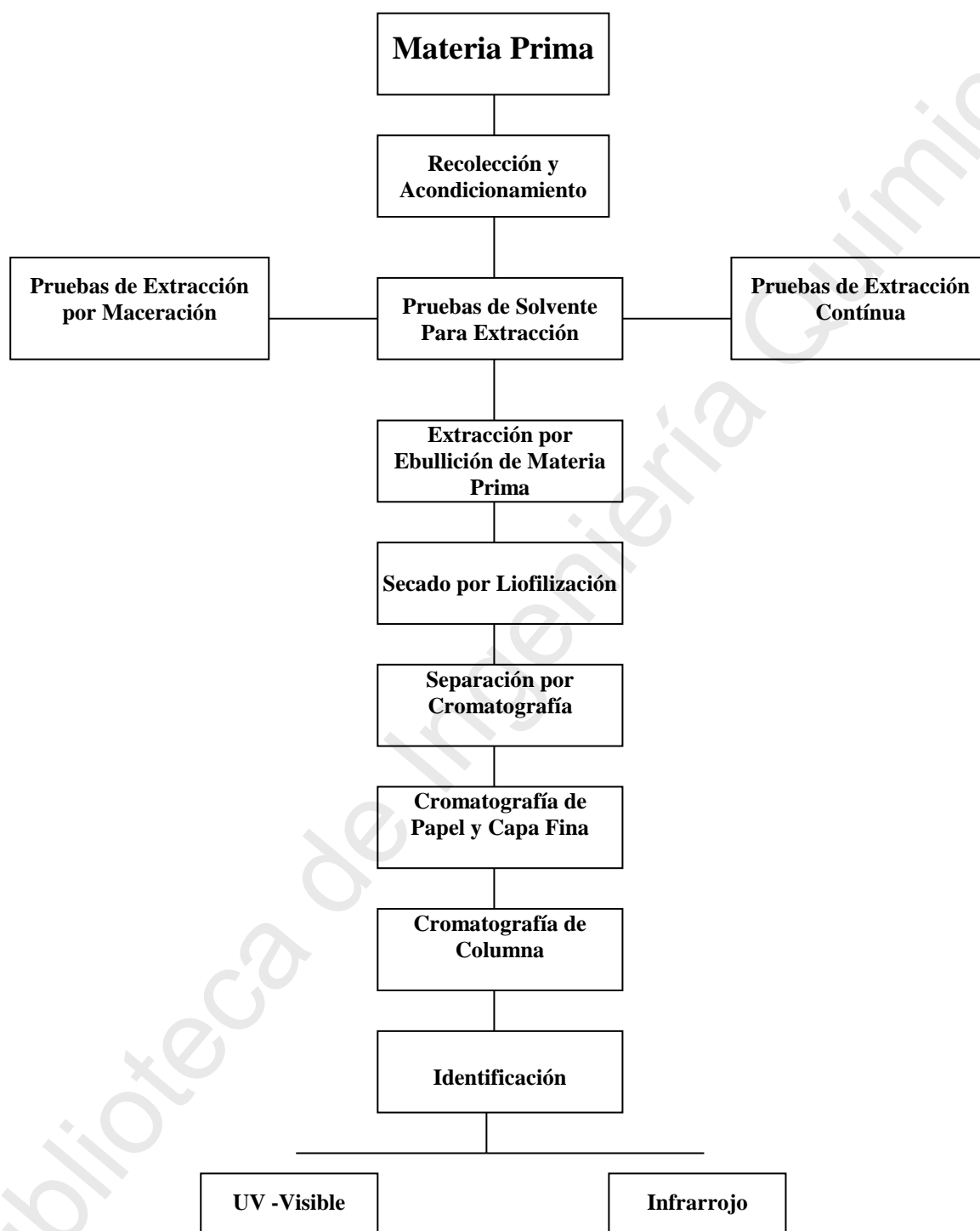
El registro UV de los compuestos mencionados se realizan en un Espectrofotómetro UV -Visible Diode Array 8452A Hewett-Packard. Para ello se disolvió una pequeña cantidad del compuesto, tanto aislado como purificado por la cromatografía de columna. El compuesto debe disolverse en el solvente apropiado, el cual no debe absorber la luz en la región que se está estudiando, para este análisis se usa como vía cromatográfica agua bidestilada. El recipiente en el cual se coloca la solución debe ser transparente a la luz en la región estudiada, para este análisis se utiliza una celda de cuarzo con un paso óptico de 1cm. Luego se obtienen las respectivas curvas de absorbancia. Los espectrofotómetros comunes de ultravioleta visible entregan espectros aceptables entre la región de 220 a 800 mμ. El software de operación que se utiliza en el análisis de esta investigación es UV-VIS HP 89531A.

2.2.3.7.2. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA¹⁰:

Para la determinación de los espectros infrarrojos de los compuestos mencionados, se utilizó El Espectrofotómetro Infrarrojo Dispersivo Perkin - Elmer modelo 700A (4000 cm^{-1} - 600 cm^{-1}). El análisis se realizó con la técnica de la película de polvo, utilizando como paso óptico una película capilar y además pastillas de cloruro de sodio, las cuales son transparentes al rayo infrarrojo. Para el análisis

se tomó el compuesto aislado y purificado por cromatografía de columna, en forma de concentrado, el cual se disuelve en alcohol etanol absoluto, para luego aplicarlo en pequeña cantidad con una varilla de agitación entre las dos pastillas de cloruro de sodio, y secándolas por medio de un secador de cabello hasta que se elimine completamente el solvente y se luego se coloca en el equipo, dándonos su respectiva curva de transferencia. Los espectros de absorción infrarroja se obtienen midiendo la intensidad relativa de la energía luminosa transmitida (o absorbida) versus la longitud de onda o número de onda.

FIGURA N° 10: Esquema de los Métodos de Procesamiento



CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. MÉTODOS DE CONTROL:

**TABLA 01: PROPIEDADES BROMATOLÓGICAS DE LA MATERIA
PRIMA**

| ANÁLISIS | MUESTRA 1 (%) | MUESTRA 2 (%) | MUESTRA 3 (%) | MUESTRA 4 (%) | MUESTRA 5 (%) | PROMEDIO (%) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| HUMEDAD | 14.33 | 14.25 | 14.03 | 14.12 | 15.02 | 14.35 |
| CENIZA | 1.47 | 1.26 | 1.20 | 1.45 | 1.36 | 1.35 |
| PROTEINA | 19.37 | 19.25 | 19.33 | 19.21 | 19.01 | 19.23 |
| GRASAS | 1.89 | 1.65 | 2.04 | 1.86 | 1.72 | 1.83 |
| FIBRA | 58.59 | 58.25 | 58.64 | 58.39 | 58.42 | 58.46 |
| CARBOHIDRATOS | 62.93 | 63.59 | 63.40 | 63.36 | 62.89 | 63.23 |

**TABLA 02: PROPIEDADES BROMATOLÓGICAS DE LA SEMILLA DE
COLORQUEHUA**

| ANÁLISIS | MUESTRA 1 (%) | MUESTRA 2 (%) | MUESTRA 3 (%) | MUESTRA 4 (%) | MUESTRA 5 (%) | PROMEDIO (%) |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| HUMEDAD | 12.78 | 12.58 | 11.00 | 12.54 | 12.50 | 12.27 |
| CENIZA | 2.36 | 2.56 | 2.50 | 2.42 | 2.49 | 2.47 |
| PROTEINA | 12.97 | 12.93 | 12.93 | 13.00 | 12.84 | 12.93 |
| GRASAS | 6.73 | 7.21 | 8.25 | 7.13 | 7.32 | 7.33 |
| FIBRA | 58.21 | 58.42 | 58.39 | 58.61 | 58.39 | 58.41 |
| CARBOHIDRATOS | 65.16 | 64.72 | 65.32 | 64.91 | 64.85 | 64.99 |

3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO:

3.2.1. RESULTADOS DE LAS REACCIONES COLORIMÉTRICAS

TABLA 03: DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES:

| PRUEBAS | RESULTADOS |
|------------|------------|
| DRAGENDORF | NEGATIVO |
| MAYER | NEGATIVO |
| HAGER | NEGATIVO |
| WAGNER | NEGATIVO |

TABLA 04: DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES

| PRUEBAS | RESULTADOS |
|---------|------------|
| SHINODA | TRAZAS |
| ZINC | TRAZAS |

TABLA 05: DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS

| PRUEBAS | RESULTADOS |
|---------------------|------------|
| HIDROXIDO DE AMONIO | POSITIVO |
| ÁCIDO SULFURICO | POSITIVO |
| SOLVENTE FORESTAL | POSITIVO |

TABLA 06: DETERMINACIÓN DE TANINOS

| PRUEBA | RESULTADOS |
|--------|------------|
| FEEL | NEGATIVO |

TABLA 07: DETERMINACIÓN DE SAPONINAS

| PRUEBA | RESULTADOS |
|--------|------------|
| ESPUMA | NEGATIVO |

TABLA 08: DETERMINACIÓN DE ESTEROIDES

| PRUEBAS | RESULTADOS |
|---------------|------------|
| COLESTEROL | NEGATIVO |
| ESTIGMASTEROL | NEGATIVO |
| FITOSTEROL | NEGATIVO |

3.3. MÉTODOS DE PROCESAMIENTO:

**TABLA 09: DENSIDAD Y TEMPERATURA DE SOLVENTES PUROS
 USADOS PARA LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN**

| SOLVENTE PURO | TEMPERATURA DEL SOLVENTE (°C) | DENSIDAD DEL SOLVENTE (g / mL) |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Agua | 26.0 | 0.99 |
| Etanol | 26.5 | 0.80 |
| Hexano | 26.5 | 0.66 |

**TABLA 10: BALANCE DE MATERIALES DE LAS PRUEBAS DE
 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN**

| MUESTRA G | Solvente Empleado | Volumen Solvente mL | Color de Solución | Colorante Extraído g | Rendimiento Extracción % |
|-----------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| 10.02 | Agua | 100 | Rojo violáceo | 0.35 | 3.53 |
| 10.00 | Etanol | 100 | Amarillo | 0.05 | 0.54 |
| 10.01 | Hexano | 100 | Incoloro | 0.00 | 0.00 |
| 9.99 | Etanol - agua | 100 | Rojo tenue | 0.05 | 0.54 |

TABLA 11: BALANCE DE MATERIALES DE LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN EN SOXHLET

| MUESTRA g | Solvente Empleado | Volumen Solvente mL | Color de Solución | Colorante Extraído g | Rendimiento Extracción % |
|-----------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| 10.01 | Agua | 150 | Rojo violáceo | 0.76 | 7.58 |
| 10.00 | Etanol | 150 | Verde tenue | 0.01 | 0.11 |
| 9.99 | Hexano | 150 | Incoloro | 0.00 | 0.00 |
| 10.03 | Etanol - agua | 150 | Rojo tenue | 0.03 | 0.29 |

TABLA 12: BALANCE DE MATERIALES DE LAS PRUEBAS DE EXTRACCIÓN POR EBULLICIÓN DE MATERIA PRIMA

| MUESTRA g | Solvente Empleado | Volumen Solvente mL | Color de Solución | Colorante Extraído g | Rendimiento Extracción % |
|-----------|-------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| 10.02 | Agua | 100 | Rojo violáceo | 1.15 | 11.51 |
| 10.01 | Etanol | 100 | Amarillo tenue | 0.02 | 0.02 |
| 10.02 | Hexano | 100 | Incoloro | 0.00 | 0.00 |
| 10.00 | Etanol - agua | 100 | Rojo tenue | 0.01 | 0.05 |

TABLA 13: RESULTADOS DE EXTRACCIÓN POR EBULLICIÓN DE MATERIA PRIMA

| MUESTRA g | Solvente Empleado | Volumen Solvente mL | Colorante Extraído g | Rendimiento Extracción % | Color de Solución | Densidad g / mL | pH |
|-----------|-------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|-------------------|-----------------|------|
| 80 | Agua | 500 | 8.56 | 10.71 | Rojo violáceo | 1.13 | 4.88 |

TABLA 14: SECADO POR LIOFILIZACIÓN: (Gráfico en Apéndice 6)

| TIEMPO Min | T° DE PRODUCTO °C | T° DE PLACA °C |
|---------------|-------------------------|-------------------|
| 00 | 18 | 18 |
| 05 | 16 | 04 |
| 10 | 04 | -19 |
| 20 | -06 | -33 |
| 30 | -15 | -37 |
| 45 | -33 | -42 |
| 60 | -38 | -44 |
| 75 | -33 | -17 |
| 190 | -20 | 21 |
| 200 | -11 | 23 |
| 210 | -01 | 24 |
| 215 | 04 | 26 |
| 225 | 14 | 27 |
| 250 | 24 | 31 |
| 270 | 28 | 33 |
| 295 | 30 | 35 |
| 320 | 32 | 36 |

TABLA 15: RESULTADOS DE SECADO POR LIOFILIZACIÓN:

| Volumen de Extracto mL | Colorante Liofilizado g | Rendimiento % |
|------------------------------|-------------------------------|------------------|
| 97 | 6.69 | 8.36 |

**TABLA 16: PROPIEDADES OBSERVADAS DEL COLORANTE
LIOFILIZADO**

| PROPIEDAD | DESCRIPCIÓN |
|-----------|---------------|
| Aspecto | Polvo |
| Color | Rojo Violáceo |
| Olor | Sui generis |
| Sabor | Ácido |

TABLA 17: PRUEBAS DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

| SOLVENTES | Rf (x 100) EN SOLVENTES CON PROPORCION: | | | | | | |
|--|---|---------|-----------|---------|------|--------|---------|
| | 6.5:4.5:1.2 | 6.5:5:1 | 6.5:4.5:1 | 6.5:4:1 | 25:1 | 18:1:1 | 30:10:3 |
| CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O | 69.2 | 58.5 | 36.7 | 21.4 | - | - | - |
| CHCl ₃ :HOAC | - | - | - | - | 10.3 | - | - |
| CHCl ₃ :HOAC:MeOH | - | - | - | - | - | 0.0 | - |
| CHCl ₃ :MeOH:HCl 10% | 62.3 | 46.1 | 32.4 | 23.1 | - | - | - |
| H ₂ O:HOAc:HCl | - | - | - | - | - | - | 72 |

TABLA 18: ELECCIÓN DEL SOLVENTE ÓPTIMO PARA LA CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

| SOLVENTES | PROPORCION | SEPARACIÓN EN EL CROMATOFOLIO | | |
|--|-------------|-------------------------------|---------|------|
| | | BUENA | REGULAR | MALA |
| CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O | 6.5:4.5:1.2 | | | X |
| | 6.5:5:1 | | X | |
| | 6.5:4.5:1 | | X | |
| | 6.5:4:1 | | | X |
| CHCl ₃ :HOAC | 25:1 | | | X |
| CHCl ₃ :HOAC:MeOH | 18:1:1 | | | X |
| H ₂ O:HOAc:HCl | 30:10:3 | | | X |
| CHCl ₃ :MeOH:HCl 10% | 6.5:4.5:1.2 | | | X |
| | 6.5:5:1 | | X | |
| | 6.5:4.5:1 | X | | |
| | 6.5:4:1 | | | X |

TABLA 19: SOLUBILIDAD DEL COLORANTE EN DIFERENTES SUSTANCIAS

| SUSTANCIA | SOLUBILIDAD |
|------------------|--------------|
| Agua | Muy soluble |
| Metanol | Poco soluble |
| Etanol | Soluble |
| Acetona | No soluble |
| Acetato de etilo | No soluble |
| Hexano | No soluble |
| Cloroformo | No soluble |

TABLA 20: MEDIDIÓN DE pH DEL COLORANTE USANDO COMO SOLVENTE AGUA: (Gráfico en Apéndice 7)

| VOLUMEN DE AGUA mL | CONCENTRACIÓN % EN PESO | pH |
|--------------------|-------------------------|------|
| 10 | 0.50 | 4.92 |
| 20 | 0.33 | 4.93 |
| 30 | 0.25 | 4.93 |
| 40 | 0.20 | 4.96 |
| 50 | 0.17 | 4.99 |
| 75 | 0.12 | 5.03 |
| 100 | 0.09 | 5.07 |
| 125 | 0.07 | 5.11 |
| 150 | 0.06 | 5.19 |
| 175 | 0.05 | 5.26 |
| 200 | 0.05 | 5.32 |
| 250 | 0.04 | 5.47 |

TABLA 21: CARACTERÍSTICAS DE LAS FRACCIONES DE COLORANTE SEPARADAS POR CROMATOGRFÍA DE COLUMNA

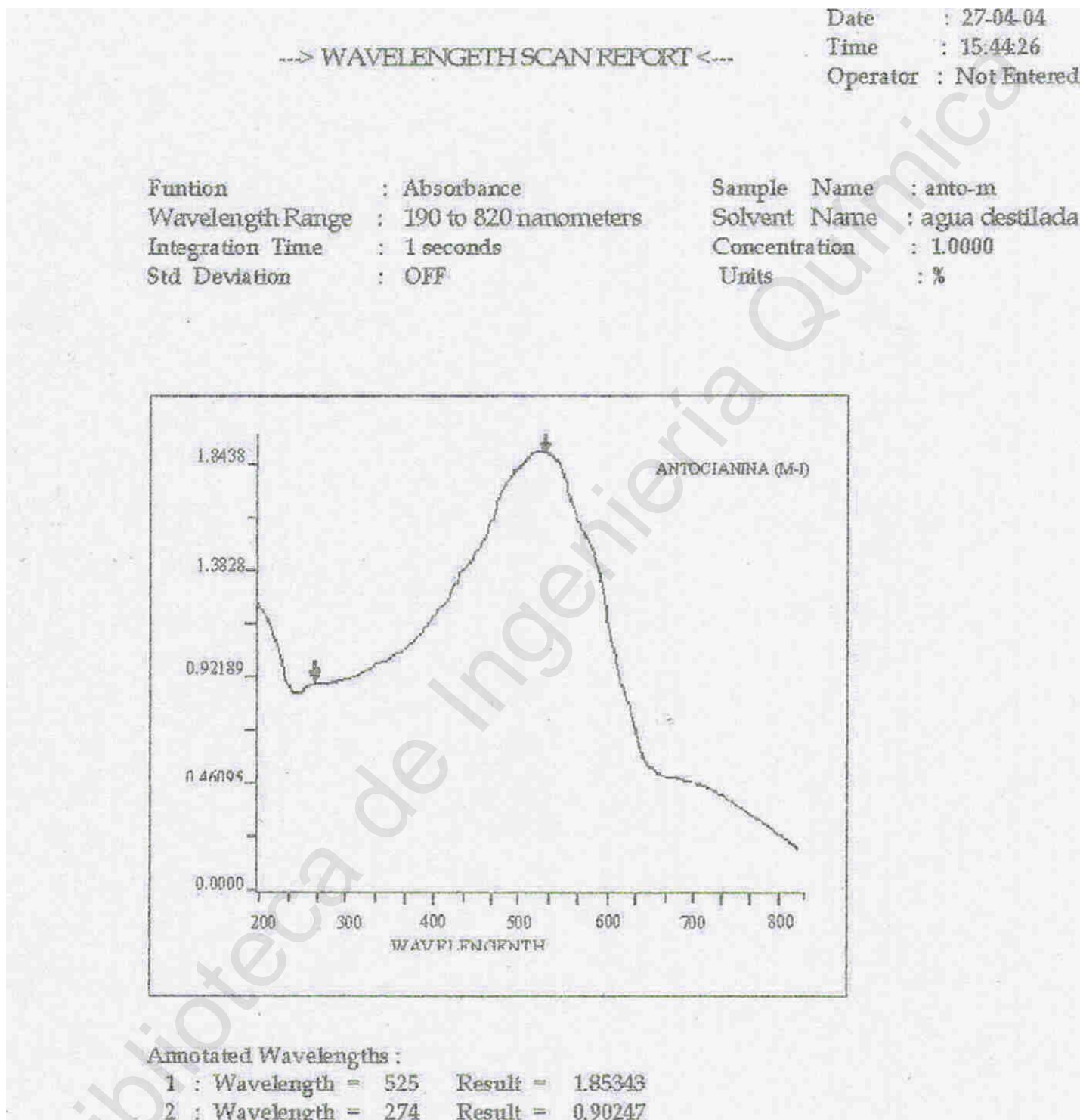
| FRACCIÓN | ELUYENTE | ASPECTO | COLOR | pH |
|----------|-------------------------------------|---------|-------------------|------|
| 1 | CHCl ₃ :MeOH:H Cl 10% | GRASOSO | VIOLETA OSCURO | 3.52 |
| 2 | | GRASOSO | AMARILLO TENUE | 4.21 |

TABLA 22: PRUEBA DE PUNTO DE FUSIÓN DE LA FRACCIÓN 1 OBTENIDA EN LA CROMATOGRFÍA DE COLUMNA

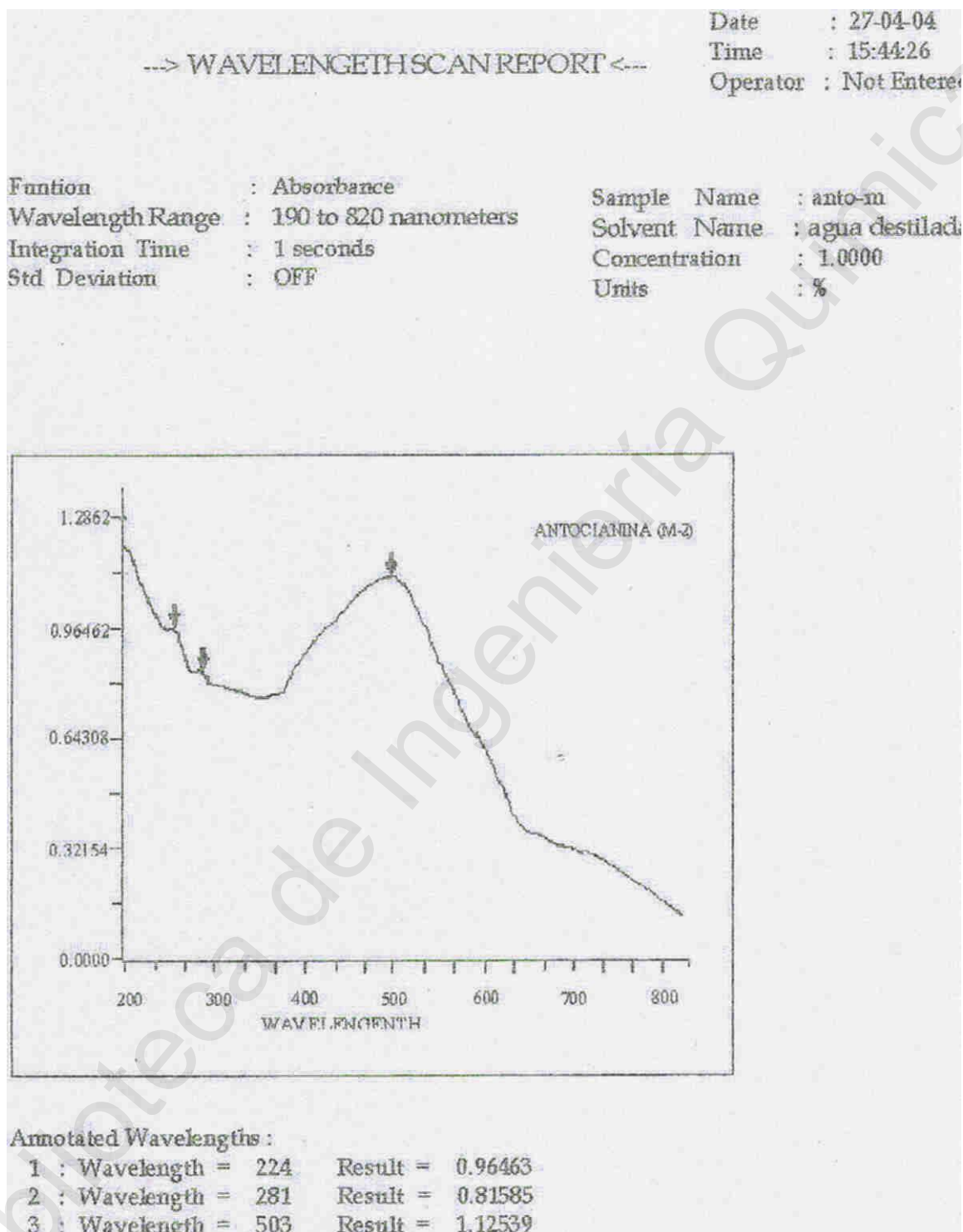
| PRUEBAS | PUNTO DE FUSIÓN DEL COLORANTE (°C) |
|---------|--|
| 1 | 330 |
| 2 | 338 |
| 3 | 342 |

TABLA 23: BANDAS DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN ULTRAVIOLETA CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS FUNCIONALES DEL COLORANTE EXTRAÍDO A PARTIR DE COLORQUEHUA *Amaranthus sp.*

| ESPECTRO | REGIÓN ULTRAVIOLETA (cm ⁻¹) | TIPO DE VARIACION DEL ENLACE | GRUPO FUNCIONAL CARACTERÍSTICO |
|---------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|
| ESPECTRO 1 | 274 | C-H | HIDROCARBUROS AROMÁTICOS |
| | 525 | | CROMOFERO |
| ESPECTRO 2 | 224 | C=C | SISTEMA INSATURADO |
| | 281 | C-H | HIDROCARBUROS AROMÁTICOS |
| | 503 | | CROMOFERO |



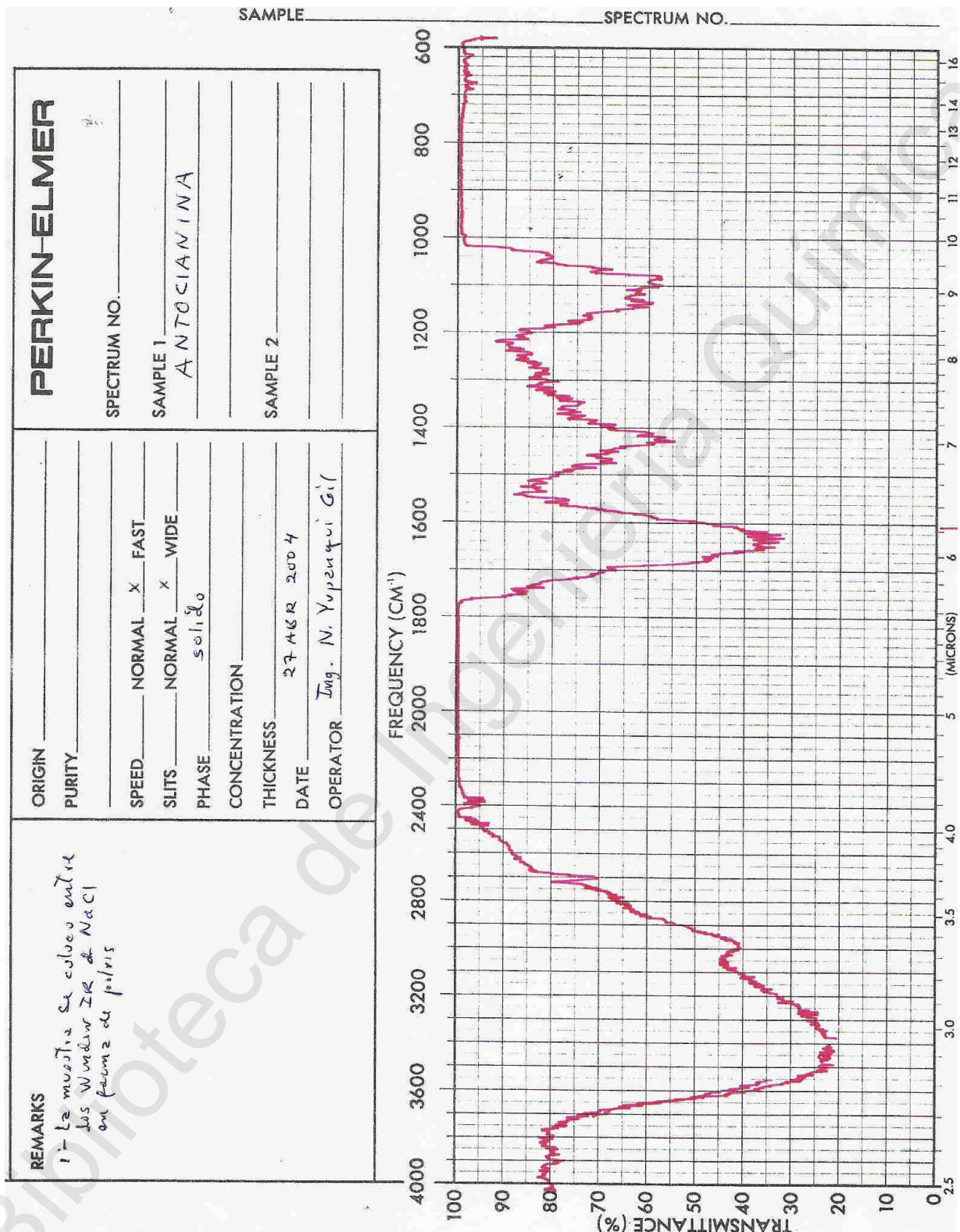
ESPECTRO 1

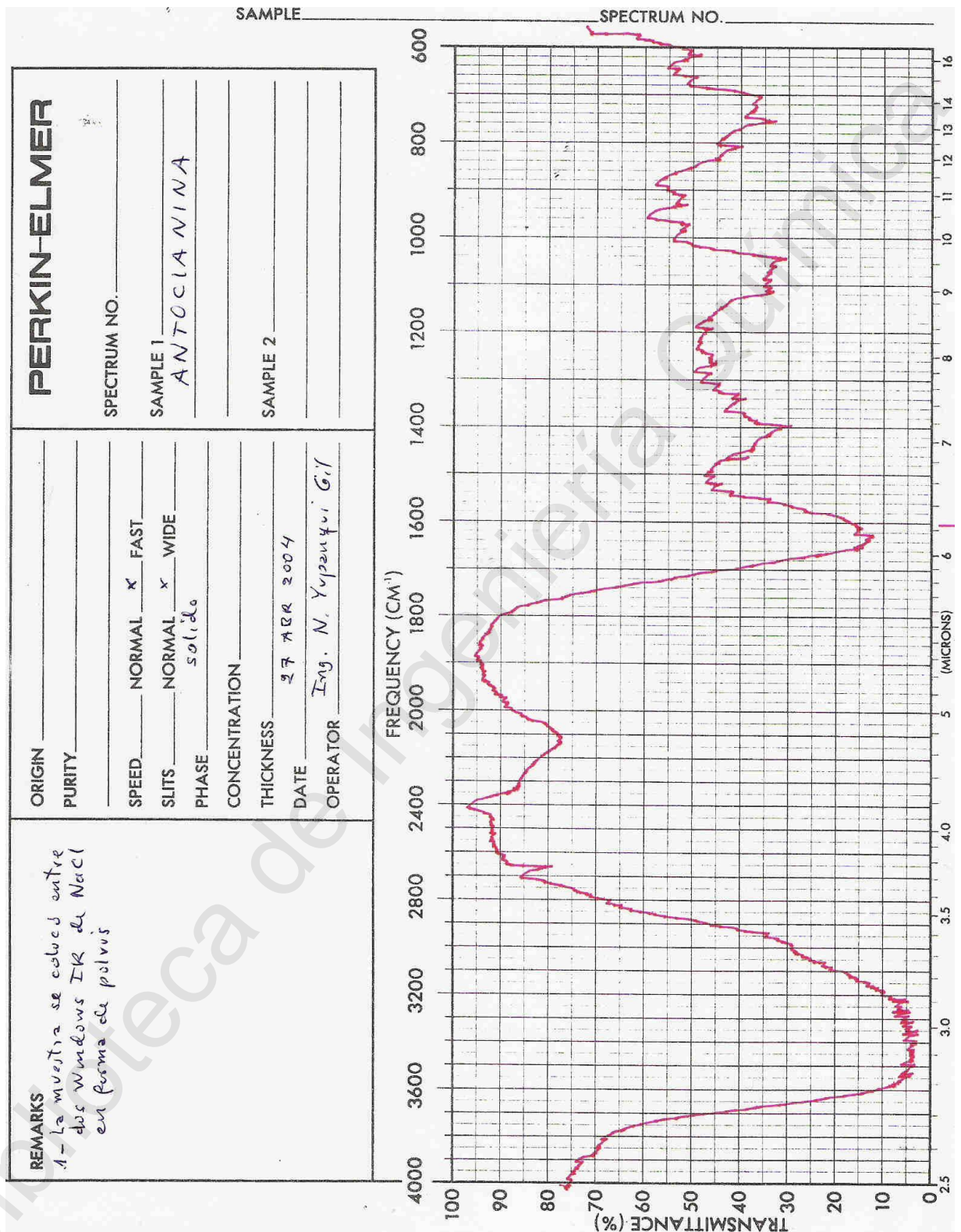


ESPECTRO 2

**TABLA 24: BANDAS DE ABSORCIÓN EN LA REGIÓN INFRARROJA
CARACTERÍSTICAS DE LOS GRUPOS FUNCIONALES
DEL COLORANTE EXTRAÍDO A PARTIR DE
COLORQUEHUA *Amaranthus sp.***

| REGIÓN INFRARROJA (cm ⁻¹) | TIPO DE VARIACION DEL ENLACE | GRUPO FUNCIONAL CARACTERÍSTICO |
|--|---------------------------------|--|
| 3500 – 3200 | OH | ALCOHOL |
| 3000 | C-H | AROMÁTICO |
| 1650 | C=O | ALDEHIDO |
| 1430 | CH ₂ | LIBRE |
| 1680 | C=C | VIBRACIONES ANILLO TETRASUSTITUIDO |
| 1200 – 1000 | C-O | FENOLES |





CAPÍTULO IV

DISCUSIONES DE RESULTADOS

1. Para la elección de un solvente apropiado, el cual fue utilizado en la extracción de materia prima, se realizaron una serie de pruebas con distintos solventes, los resultados se muestran en las Tablas N°10, 11 y 12. Al elegir este solvente, no sólo tomamos en cuenta el cual nos proporcione mayor rendimiento, sino que además según las pruebas con los solventes, notamos que alguno de ellos no extraen el colorante, tal es el caso del etanol, que en los tres métodos probados, su extracto obtiene coloraciones amarillas o verduscas; así mismo el extracto con hexano no tiene coloración, lo cual podría significar que estos solventes extraen otros tipos de compuestos de la panoja como su clorofila o grasa. Por otro lado en el extracto con etanol – agua obtiene una coloración roja muy tenue, lo cual indica que sí extrae el colorante pero con muy bajo rendimiento. En el caso del extracto con agua notamos que se obtiene el más alto rendimiento y además la coloración es rojo violáceo correspondiente a la de los colorantes de antocianinas.
2. En la Tabla N° 12 observamos que el rendimiento de las pruebas de extracción por ebullición de materia prima es mayor que el rendimiento que se observa en la Tabla N° 13 de la extracción del colorante, siendo este el mismo método; esto se debe a que en las pruebas se trabajó con cantidades pequeñas de materia prima que en la extracción, y esto permitió tener menos error y un mejor cálculo del rendimiento que el que se realizó con cantidades mayores de materia prima.
3. En las Tablas 10, 11 y 12 se muestran los resultados de las pruebas de los métodos de extracción; por maceración, en Soxhlet y por ebullición de materia prima, respectivamente, con lo cual se determinó el mejor método de extracción teniendo en cuenta el que nos proporcione un mayor rendimiento.

4. La densidad del agua, como solvente puro, mostrada en la Tabla N° 9 la comparamos con la densidad del extracto mostrada en la Tabla N° 13 y notamos que la densidad del extracto ha aumentado, el solvente ya no está puro, contiene otro compuesto adquirido durante el proceso de extracción.
5. Para la concentración del colorante, se tuvo que realizar el método de liofilización, por ser este el más conveniente cuando se trata de concentrar extractos acuosos, además de conservar las propiedades del extracto. La concentración del colorante necesita un proceso al vacío porque a temperaturas elevadas se dañaría la estructura del colorante y otros métodos no llegan a eliminar el agua completamente.
6. Los sistemas que se utilizaron para la cromatografía de capa fina, Tabla N° 17, fueron tomados en sus respectivas concentraciones de bibliografía; pero al realizar las pruebas nos encontramos que algunos de ellos presentaban manchas que podrían indicar la separación del colorante, pero mostraban un R_f fuera de lo recomendado (30 – 50%), por lo que hicimos variaciones en las concentraciones de los sistemas, modificando su polaridad.
7. En la Tabla N° 18 mostramos la forma en que se realizaron las separaciones en el cromatofolio de los diferentes sistemas y sus variaciones, algunos de estos se clasificaron entre regular y buena, pero determinamos el mejor sistema de acuerdo al rango de R_f recomendado (30 – 50%).
8. En la Tabla N° 22 notamos que hay pequeñas variaciones en el punto de fusión, esto puede obedecer a la velocidad del calentamiento de la muestra, parámetro que no puede controlarse con exactitud, a pesar de ello el promedio se encuentra dentro de lo aceptable.
9. Cuando realizamos la caracterización por métodos espectroscópicos, obtenemos diversos picos a través de los cuales podemos esbozar la estructura del colorante, para lo cual nos guiamos de la bibliografía, ya que esta nos muestra los intervalos correspondientes a los diferentes grupos funcionales y así al realizar la

comparación entre estos y los obtenidos en los espectros se puede caracterizar el colorante.

Biblioteca de Ingeniería Química

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

1. El promedio de las propiedades bromatológicas de la materia prima (colorquehua), son: humedad 14.35%, ceniza 1.35%, proteínas 19.23%, grasas 1.83%, fibra 58.43% y carbohidratos 63.23%.
2. Para la investigación fitoquímica de la colorquehua se realizaron una serie de pruebas, obteniendo como resultado que existe una presencia importante de antocianinas, las cuales, son el componente principal del colorante. Así mismo, según la Prueba de Shinoda se identificaron trazas de Flavonoides. El resultado de las demás pruebas fue negativo, con lo cual descartamos la presencia de: alcaloides, taninos, saponinas y esteroides.
3. Según las pruebas realizadas para obtener el método de extracción se concluyó que el mejor método de extracción para este colorante es el Método de extracción por ebullición de materia prima, por tener el rendimiento más alto, siendo este 10.71%.
4. El secado por liofilización tiene dos parámetros importantes, temperatura del producto y el tiempo en que transcurre dicho proceso, mostrando que durante el proceso se presentaron temperaturas adecuadas no mayores de 32 °C con lo cual se conservó la estructura del colorante.
En el liofilizado se obtuvo un polvo grueso, de color rojo violáceo que tiene olor sui generis, sabor ácido y un rendimiento de 8.36%
5. En la cromatografía de columna se recogieron varias fracciones, que fueron cromatografiadas en capa fina, separándolas en dos fracciones diferentes, una de

color violeta oscuro la cual contenía la antocianina, y la otra de color amarillo tenue que probablemente contenía las impurezas del colorante.

6. De las pruebas de solubilidad que se realizaron al colorante se concluye que dicho colorante es muy soluble en agua, soluble en etanol y poco soluble en metanol.
7. En las mediciones de pH que se realizaron de acuerdo a la variación de porcentaje en peso del colorante, observamos que el pH se mantiene dentro del rango 4.92 y 5.47, demostrando así que el colorante mantiene su acidez y estabilidad.
8. Según los espectros que se obtuvieron en el espectrofotómetro de uv-visible se determina la absorción del colorante en la región ultravioleta visible, los cuales dan como resultados los siguientes grupos funcionales: C-H, C=C y el cromóforo, lo cual nos demuestra la presencia de la antocianina.
9. Según los espectros que se obtuvieron en el espectrofotómetro infrarrojo se determina la absorción del colorante entre 4000 y 600 cm^{-1} , resultando diversos picos correspondientes a los compuestos que conforman la estructura del colorante: OH, C-H, C=O, C=C, CH₂, C-O, notándose la presencia de la antocianina.

CAPÍTULO V

RECOMENDACIONES

1. Cuando se quiere extraer compuestos aptos para el consumo humano es recomendable que el solvente indicado no sea tóxico.
2. Para continuar con el trabajo de investigación de este colorante natural y obtener un mejor detalle de los grupos funcionales que conforman esta antocianina se recomienda realizar la caracterización en RMN.
3. Para la extracción del colorante se recomienda probar con otros solventes, considerando sistemas binarios y / o terciarios con la finalidad de obtener un mejor rendimiento.
4. Se recomienda hacer la extracción a otras condiciones, variando el pH de ácido a básico para profundizar en el estudio de este colorante.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

1. Alva. M, (2000) Manual de Espectroscopía Molecular, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
2. Araujo. A, (1995) Tesis: Extracción, identificación y Aplicación de Pigmentos del Schinus Molle (Molle), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
3. Barbosa. G, Mercado. H, (1991) Deshidratación de Alimentos, Editorial Acribia S.A., Zaragoza España.
4. Brewster & McEWEN, (1969) Química Orgánica, Editorial Médico Quirúrgica, Primera Edición, Argentina.
5. Castillo. J, Ruíz. I, (1998) Tesis: Obtención de Enocianina a partir de la Vitis Vinífera (VID), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
6. De La Cruz. E, Ruíz. J, (2000) Tesis: Extracción y Caracterización de Aceite proveniente de la Semilla de Papaya, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
7. Dieguez. J, (1986) Amaranto o Kiwicha: Modernas Perspectivas para un Cultivo Antiguo, Washington D.C, U.S.A.
8. Domínguez. X, (1979) Métodos de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, Primera Edición, España.
9. Falla. H, Guillén. C, (1995) Tesis: Determinación de Antocianinas en el Maíz Morado, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
10. Dyer. J, (1973) Aplicaciones de Espectroscopía de Absorción en Compuestos Orgánicos, Editorial Prentice / Hall Internacional, New Jersey, U.S.A.
11. Fernández. F, Díaz. S, (1996) Trabajo de Investigación: Perfil de la Colorquehua (*Amaranthus sp.*), Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
12. Fieser & Fieser, (1976) Química Orgánica Fundamental, Editorial Reverté S.A., Primera Edición, España.

13. Fleming. I, Williams. D, (1974) Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica, Urmo S.A. de Ediciones Epartero, España.
14. Fonemma, (1992) Ciencia de los Alimentos, Editorial Reverté, España.
15. Herrera. G, (1943), Departamento de Botánica, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
16. Herrera. P, (1951) Bromatología-Tomo I, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Perú..
17. Ibarz. A, Barbosa. C, (1991) Métodos Experimentales en la Ingeniería Alimentaria , Editorial Acribia S.A., Saragoza-España.
18. Kirk & Othmer, (1998) Enciclopedia de Tecnología Química-Tomo V, Editorial Limusa S.A. de C.V., Grupo Noriega de Editores, Primera Edición, España.
19. Lock. O, (1997) Colorantes Naturales, Pontificia universidad Católica del Perú, Primera Edición, Lima, Perú.
20. Lock. O, (1988) Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de Productos Naturales, Pontificia Universidad Católica del Perú, Primera Edición, Lima, Perú.
21. Mayer. F, (1950) La Química de las Materias Colorantes Naturales, Ediciones Aguilar S.A., Madrid, España.
22. Morrison. R, (1990) Química Orgánica, Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, U.S.A.
23. Perry. R, (1993) Manual del ingeniero Químico, Editoriasl McGraw Hill / Interamericana S.A. de C.V., Sexta Edición, México.
24. Rivero. J, (1999) Manual de Prácticas de Laboratorio: Química Analítica Instrumental, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
25. Skoog. D, Leary. J, (1990) Análisis Instrumental, Editorial McGraw Hill, Cuarta Edición, U.S.A.
26. Ullman, (1976) Enciclopedia de la Industria Química-Tomo XII, Editorial Uthea, Segunda Edición, México.
27. <http://www.geocities.com/cueba/asignaturas/colorg.html>.
28. <http://www.medicinanaturista.com.ar/articulos/alimentacion/flavonoides.html>.
29. <http://164.73.160.1/~inorgani/estat/espectr.html>.

-
30. <http://webs.uvigo.es/cactiweb/index.html>
 31. http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper_bas/crom.html
 32. <http://www.132.248.56.130/organica/1345/8.html>
 33. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cromatografía.html>

Biblioteca de Ingeniería Química

APÉNDICE

1. FÓRMULAS PARA CALCULAR LOS PARÁMETROS FÍSICOS

- **Humedad:**

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

Donde:

W_i = Peso de muestra fresca

W_f = Peso de muestra seca

2. FÓRMULAS CALCULAR LOS PARÁMETROS QUÍMICOS

- **Proteínas:**

$$\% \text{ Proteína} = (G_B - G_M) \times f_s \times N_s \times 0.014 \times 6.25 \times 100$$

Donde:

G_b = Gasto de NaOH en el blanco (mL)

G_H = Gasto de NaOH en la muestra (mL)

f_s = Factor de la soda (0,991)

N_s = Normalidad de la soda (0,1)

W_M = Peso de la muestra (g)

6,25= Resulta que en 100% de proteína hay 16% de nitrógeno

• **Fibra:**

$$\% \text{ Fibra} = P_s - P_c \times 100$$

Donde:

P_s = Peso seco

P_c = Peso calcinado

W_{MO} = Peso de muestra original

• **Carbohidratos:**

$$\% \text{ Carbohidratos} = 100 - (\%H + \%G + \%C + \%P)$$

Donde:

$\%H$ = Por ciento de humedad

$\%G$ = Por ciento de grasa

$\%C$ = Por ciento de ceniza

$\%P$ = Por ciento de proteína

• **Cenizas:**

$$\% \text{ de Cenizas} = W_{m\text{cenizas}} \times 100$$

Donde:

W_m = peso de muestra

• **Grasa:**

$$\% \text{ Grasa} = \frac{W_f}{W_i} \times 100$$

Donde:

W_i = Peso de muestra inicial

W_f = Peso de muestra final

3. FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN

$$\%R = \frac{\text{Peso del colorante extraído}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

4. FÓRMULAS PARA EL CÁLCULO DEL RENDIMIENTO DEL COLORANTE SECADO POR LIOFILIZACION

$$\% \text{ colorantes} = \frac{P_{ES}}{P_M} \times 100$$

Donde:

P_{ES} = Peso de extracto liofilizado

P_M = Peso de marlo original

5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS FITOQUÍMICO:

- **Reactivo de Dragendorf:**

8 g de nitrato de bismuto pentahidratado se disuelven en 20 mL de ácido nítrico concentrado (G.R.).

27.2 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua destilada mezclar , reposar en un embudo de separación, decantar el sobre nadante y diluir a 100 mL.

Mezclar ambos preparados para obtener yodo bismutato de potasio.

- **Reactivo de Hager:**

Solución acuosa saturada de ácido pícrico.

- **Reactivo de Mayer:**

1.36 g de cloruro de mercurio en 60 mL de agua.

5 mL de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Se mezclan y diluyen a 100 mL.

• **Reactivo de Wagner:**

1.27g de yodo molecular + 2g de yoduro de potasio disueltos en 5mL de agua se mezclan y se diluyen a 100 mL. de agua.

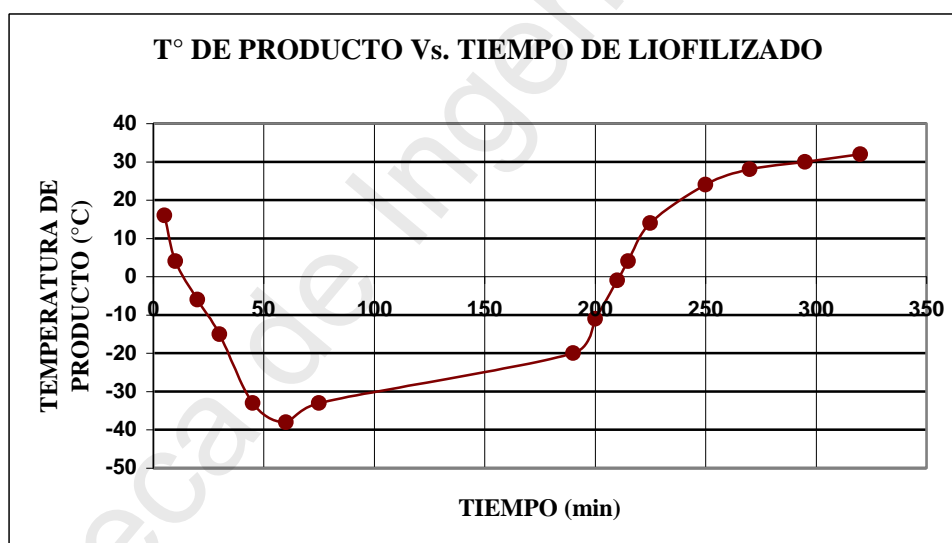
• **Reactivo de Feel:**

1g de cloruro férrico en 100 mL de agua.

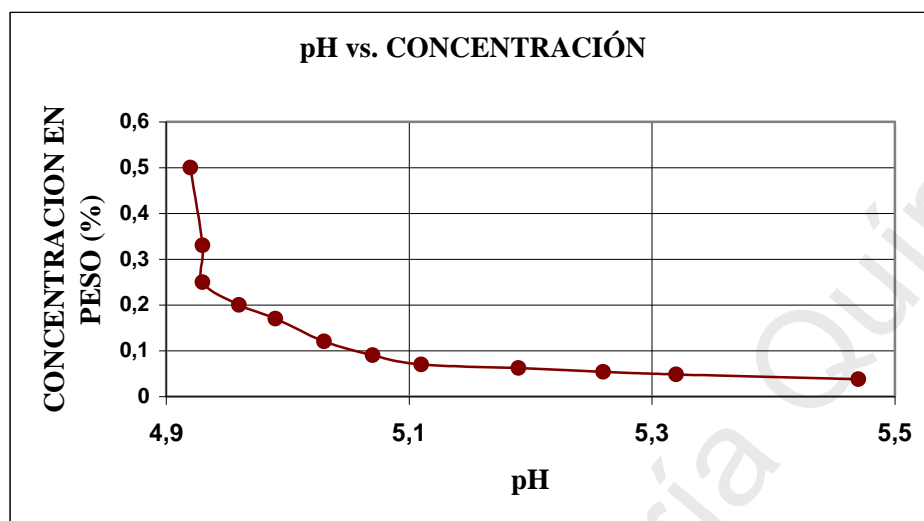
• **Mezcla Forestal:**

30 mL de agua + 10 mL ácido acético + 3 mL de ácido clorhídrico

6. GRÁFICO DE PARÁMTROS DE LIOFILIZACIÓN



7. GRÁFICO DE LA MEDICIÓN DEL pH



ANEXOS



FOTO 1: PLANTA DE COLORQUEHUA



**FOTO 2: PANOJA FRESCA DE
COLORQUEHUA (MATERIA PRIMA)**



FOTO 3: SIEMBRA DE COLORQUEHUA



FOTO 4: PANOJA UTILIZADA PARA LOS ANÁLISIS

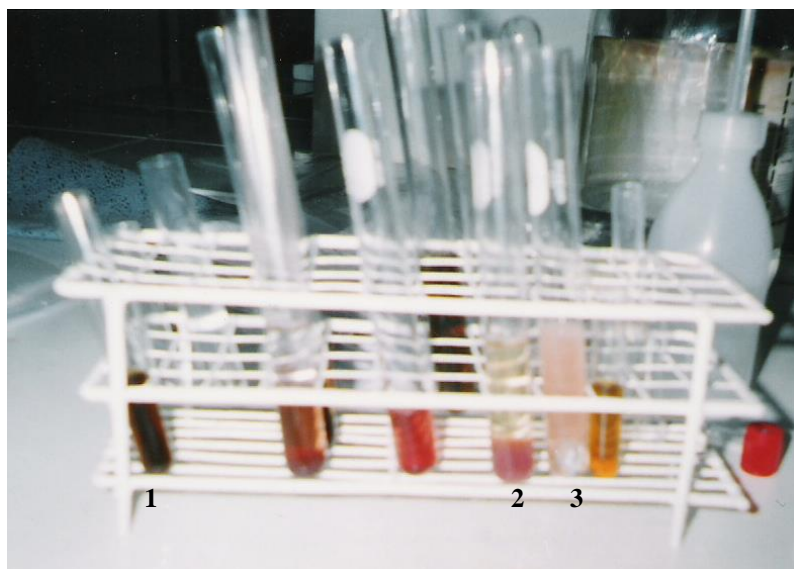


FOTO 5

- | | |
|---|-------------------------------------|
| 1 | PRUEBA DE AC. SULFURÍCO |
| 2 | PRUEBA DE SHINODA |
| 3 | PRUEBA DE ZINC |
| 4 | PRUEBA DE HIDROXIDO DE AMONIO |

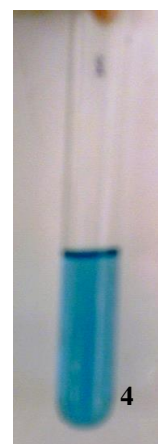


FOTO 6

FOTO 5 Y 6: PRUEBAS POSITIVAS DE MARCHA FITOQUÍMICA



**FOTO 7: EXTRACCIÓN POR
MACERACIÓN**



**FOTO 8: EXTRACCIÓN POR
EBULLICIÓN DE MATERIA
PRIMA**



FOTO 9: EXTRACCIÓN EN SOXHLET

PRUEBAS DE EXTRACCIÓN CON AGUA



FOTO 10: EQUIPO DE LIOFILIZACIÓN



FOTO 11: EXTRACTO LIOFILIZADO



FOTO 12: PRUEBAS DE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA

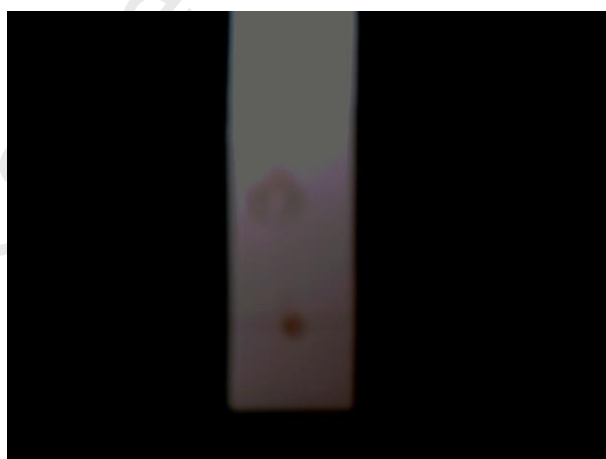


FOTO 13: CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA CON EL SISTEMA SELECCIONADO



FOTO 14: ESPECTROFOTÓMETRO UV – VISIBLE



FOTO 15: ESPECTROFOTÓMETRO INFRARROJO