



**Facultad de Ciencias Naturales Y Matemática**

**“OBTENCIÓN DE UN INDICADOR NATURAL ÁCIDO-BASE A  
PARTIR DEL FRUTO *PUNICA GRANATUM L.*: UN APORTE  
PARA LA SUSTITUCIÓN DE LOS INDICADORES SINTÉTICOS”**

**Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Química**

**AUTOR**

**Huarote Garcia, Emily Guissel**

**ASESOR**

**Q.F. Herrera Hernández, Nora Gabriela**

**JURADO**

**Dra. Salvador Salazar, Martha**

**Mg. Lezama Vigo, Helmer**

**Q.F. Fernández Arroyo, Carmen**

**Qco. Pumachagua Huertas, Rodolfo**

**LIMA – PERU**

**2018**

## DEDICATORIA

A mi familia, conformada por mi madre, mi madrina, mi tío, mi primo y mi  
abuela.

A la Químico Farmacéutica Nora Herrera, quién me apoyo, me tuvo paciencia y  
confianza, lo cual me permitió crecer personal y profesionalmente.

A la señora Hilda Rojas, técnica de laboratorio, amiga, madre, vecina, maestra  
y esposa, a quien gracias a todo su apoyo concluí con este trabajo, y le  
agradezco por cada consejo y gran disposición. Gracias.

A todos los profesores y compañeros que tuve la oportunidad de conocer  
durante el trayecto de mi presente trabajo.

A mi compañero y colega Nelson V., por cada apoyo durante el transcurso de  
este proyecto, desde un inicio hasta el final.

A mis tres amigas (Elizabeth H., Camila M. y Mayra R.) por cada apoyo,  
paciencia y sobre todo por la motivación permanente para continuar.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Federico Villarreal, por el apoyo en el “Concurso de proyectos de investigación formativa” como parte del curso de Seminario de Tesis y permitirme alcanzar este importante logro en mi vida estudiantil.

A mi asesora interna Q.F. Nora Herrera por su apoyo, comprensión y orientación, durante la realización del presente trabajo.

A mi asesor externo, Dr. Jorge Borquez, por su colaboración, orientación, apoyo y gran hospitalidad durante la pasantía que realicé en la Universidad Antofagasta, Chile para culminar la investigación.

A mi maestra de la vida, compañera para algunos, madre para pocos, pero gran persona para todos, Sra. Hilda; esté es uno de los muchos trabajos, finalizados por su gran apoyo. Gracias por sus comentarios, su dedicación y por el gran ejemplo que nos dio, cada día al ingresar por la puerta del Laboratorio de Analítica, el cual no volverá a ser nunca como antes.

A las personas que tuve la oportunidad de conocer, durante el proceso del desarrollo de mi Tesis y mi pasantía en Chile, por mostrarme una nueva visión del área de Productos Naturales.

A mi familia, que siempre creyó en mí en todo momento, anhelo no solo una dedicatoria, sino un agradecimiento eterno.

# INDICE

Índice de tablas

Índice de figuras

Resumen

Abstracts

## Introducción

Capítulo I: Planteamiento del problema .....	1
<b>1.1 Descripción del problema .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Formulación del Problema .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Objetivos .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3.1 Objetivo General .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Justificación e importancia de la investigación .....</b>	<b>3</b>
Capítulo II: Marco Teórico .....	5
<b>2.1 Estado del arte y antecedentes .....</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Bases Teóricas .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Formulación de hipótesis y variables .....</b>	<b>27</b>
Capítulo III: Método.....	28
<b>3.1 Materiales – Reactivos .....</b>	<b>28</b>
<b>Equipos .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Desarrollo Experimental .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Material Biológico .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.1 Obtención del extracto crudo del fruto <i>Punica Granatum L.</i> .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Identificación preliminar de antocianinas .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.6 Elaboración de Escala de pH.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6.1 Análisis por espectrofotometría UV- Vis de las soluciones en el rango de 3.5 a 10 unidades de pH.....</b>	<b>34</b>

<b>3.6.2 Estabilidad del extracto <i>Punica granatum L.</i> como indicador en presencia de luz</b> .....	34
<b>3.7 Valoraciones potenciométricas utilizando el extracto <i>Punica granatum L.</i> como indicador de pH</b> .....	35
Capítulo 4: Resultados .....	37
<b>4.1 Identificación preliminar de antocianinas</b> .....	37
<b>4.2. Análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS</b> .....	37
<b>4.3 Elaboración de escala de pH</b> .....	38
<b>4.3.1 Análisis por Espectrofotometría UV-Vis de las soluciones del indicador de <i>Punica granatum L.</i> en el rango 3.5 a 10 unidades de pH</b> .....	39
<b>4.3.2 Estabilidad del extracto <i>Punica granatum L.</i> en presencia de la luz</b> ....	41
<b>4.4 Uso del extracto <i>Punica granatum L.</i> como indicador de pH en valoraciones potenciométricas</b> .....	51
<b>4.4.1. Ácido fuerte monoprotico (HCl) – base fuerte (NaOH)</b> .....	51
<b>4.4.2. Ácido débil (CH<sub>3</sub>COOH) – base fuerte (NaOH)</b> .....	55
<b>4.4.3. Ácido fuerte diprotico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) – base fuerte (NaOH)</b> .....	61
<b>4.4.4. Ácido fuerte triprotico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) – base fuerte (NaOH)</b> .....	66
<b>4.5 Determinación del pK<sub>Indicador</sub><sup>-</sup></b> .....	71
<b>4.6 Estabilidad en presencia de oxígeno y luz del extracto <i>Punica granatum L.</i></b> .....	71
<b>4.6.1. Estadístico T-Student para muestras independientes</b> .....	73
Discusión de resultados .....	77
Conclusiones .....	79
Recomendaciones .....	80
Fuentes de Información .....	81
Anexos .....	89

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Principales compuestos funcionales en las diferentes partes de la granada	20
Tabla 2	Fase móvil para el análisis del extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i> en el UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS	33
Tabla 3	Preparación de la escala de pH con soluciones amortiguadoras	34
Tabla 4	Compuestos antocianidínicos, obtenidos del análisis en el equipo UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS	38
Tabla 5	pH Experimental – pH Teórico para el análisis colorimétrico del extracto <i>Punica granatum L.</i>	38
Tabla 6	Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10), con el extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i>	41
Tabla 7	Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10), después de 5 minutos de haber añadido el extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i>	42
Tabla 8	Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 8.0), después de 10 minutos de haber añadido el extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i>	42
Tabla 9	Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 8.0), después de 15 minutos de haber añadido el extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i>	43
Tabla 10	Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido fuerte monoprótico (HCl) vs base fuerte (NaOH) utilizando como indicador extracto de <i>Punica granatum L.</i>	51
Tabla 11	Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido débil (CH <sub>3</sub> COOH) vs base fuerte (NaOH) utilizando como indicador extracto de <i>Punica granatum L.</i>	56
Tabla 12	Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada Ácido fuerte diprótico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) vs hidróxido de sodio (NaOH) utilizando como indicador extracto de <i>Punica granatum L.</i>	61

Tabla 13	Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido fuerte triprótico $H_3PO_4$ vs hidróxido de sodio (NaOH) utilizando como indicador extracto de <i>Punica granatum L</i>	66
Tabla 14	Valores de $pK_1$ en función del pH	70
Tabla 15	Datos de $pK_{Ind}$ a diferentes pH	70
Tabla 16	Estabilidad en presencia de oxígeno y luz en función de la absorbancia de los dos frascos de vidrio (Transparente y ámbar)	71
Tabla 17	Media, varianza (S) desviación estándar ( $S^2$ ) de los tipos de frascos (ámbar y transparente), para determinar la homogeneidad de las varianzas	72
Tabla 18	Media, desviación estándar y error de la desviación estándar de los tipos de frascos de vidrio (ámbar y transparente), para determinar la diferencia significativa entre ambos.	75

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura química de los antocianos	3
Figura 2	Clasificación de los Colorantes	6
Figura 3	Rango de color visible de las antocianinas	7
Figura 4	Estructura de los monosacáridos más comunes encontrados en las estructuras de antocianinas	8
Figura 5	Biosíntesis de Flavonona	9
Figura 6	Biosíntesis de Flavonona	10
Figura 7	Interacciones $\pi$ - $\pi$ de apilamiento en antocianinas y sus complejos	11
Figura 8	Tipos de Copigmentación	12
Figura 9	Comportamiento cinético del proceso de degradación del EC, en diferentes condiciones de almacenamiento (PA; presencia de aire, PL; presencia de luz, AL; ausencia de luz, AA; ausencia de aire)	13
Figura 10	Cinética de primer orden de degradación 45°C, 60°C y 75°C, lineación de la concentración de antocianinas en función del tiempo.	14
Figura 11	Transformaciones estructurales de las antocianinas en solución ácida a neutra.	15
Figura 12	Equilibrio de las antocianinas, durante la variación de pH	16
Figura 13	Centro de Origen y diversidad de las plantas cultivadas	18
Figura 14	Partes del granado, a) Hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes	19

	longitudinal y transversal del arilo.	
Figura 15	Porción comestible: Arilo y Semilla.	20
Figura 16	Espectros UV-Vis de las antocianinas aciladas y 3,5 –diglucósido (línea continua); no aciladas y 3-glucosiladas (línea discontinua)	23
Figura 17	a) Esquema que incluye los componentes básicos de un sistema de HPLC b) Esquema de un espectrófotometro de masas ESI-IT.	25
Figura 18	Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electrospray ionization- Quadrupole-Orbitrap-Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS)	25
Figura 19	Fruto <i>Punica granatum L</i>	30
Figura 20	Obtención de los arilos del Fruto <i>Punica granatum L</i> .	30
Figura 21	a) Proceso de filtración de los arilos del fruto <i>Punica granatum L</i> . (granada) b) Extracto crudo del fruto <i>Punica granatum L</i>	31
Figura 22	a) Columna de Amberlita XAD -7 b) Extracto de <i>Punica granatum L</i> ., recogido de la columna Amberlita XAD-7	31
Figura 23	Multi-Step de la fase móvil del UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS para el fruto <i>Punica granatum L</i> . .	33
Figura 24	Ácido Clorhídrico 0.1N (Izquierda) e Hidróxido de Sodio 0.1N (Derecha) con el extracto del fruto <i>Punica granatum L</i>	37
Figura 25	Escala de pH, con el extracto del fruto <i>Punica granatum L</i> .	39
Figura 26	Variación de la longitud de onda en función de la variación de pH.	40
Figura 27	Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto <i>Punica granatum L</i> ., después de 5 minutos.	40
Figura 28	Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto <i>Punica granatum L</i> ., después de 10 minutos	41

Figura 29	Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto <i>Punica granatum L.</i> , después de quince minutos.	42
Figura 30	Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 3.5	43
Figura 31	Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 4.0.	44
Figura 32	Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 4.5.	44
Figura 33	Aumento absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 5.0	45
Figura 34	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 5.5	45
Figura 35	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 6.0	46
Figura 36	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 6.5	46
Figura 37	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 7.0	47
Figura 38	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 7.5	47
Figura 39	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 8.0	48
Figura 40	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 9	48
Figura 41	Aumento de absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 10	49
Figura 42	Absorbancia de diferentes valores de la escala	49

	de pH, en diferentes fracciones de tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos)	
Figura 43	Titulación de Ácido Clorhídrico vs. Hidróxido de Sodio indicador fenolftaleína. Antes de la titulación (a) – Punto final (b).	50
Figura 44	Variación de color en la titulación de ácido clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH) con el extracto <i>Punica granatum L.</i> como indicador., pH = 6,43 (a); 7,12 (b) y 8,27 (c).	50
Figura 45	Curva de titulación ácido fuerte monoprótico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum L.</i> Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde).	52
Figura 46	Curva de la primera derivada de ácido fuerte monoprótico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum L.</i> Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde).	53
Figura 47	Curva de la segunda derivada de ácido fuerte monoprótico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum L.</i> , Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	54
Figura 48	Titulación de Ácido Acético (CH <sub>3</sub> COOH) con Hidróxido de sodio (NaOH) indicador el extracto <i>Punica granatum L.</i> , pH = 8.36(a), 9.70 (b) y 10.29(c)	56
Figura 49	Curva de titulación ácido débil (CH <sub>3</sub> COOH) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum L.</i> Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	57
Figura 50	Curva de la primera derivada de ácido débil (CH <sub>3</sub> COOH) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum L.</i> Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	58
Figura 51	Curva de la segunda derivada de ácido débil	59

	(CH <sub>3</sub> COOH) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	
Figura 52	Titulación de Ácido Sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) con Hidróxido de sodio (NaOH), indicador el extracto <i>Punica granatum</i> L., pH = 6.48 (a), 7.20 (b) y 8.91 (c)	56
Figura 53	Curva de titulación ácido fuerte diprótico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	62
Figura 54	Curva de la primera derivada de ácido fuerte (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	63
Figura 55	Curva de la segunda derivada de ácido fuerte (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	64
Figura 56	Titulación de Ácido fuerte triprótico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) con Hidróxido de sodio (NaOH), indicador el extracto <i>Punica granatum</i> L., pH = 6.40 (a), 7.18 (b) y 8.39 (c)	59
Figura 57	Curva de titulación ácido fuerte triprótico (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	67
Figura 58	Curva de la primera derivada de ácido fuerte (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica granatum</i> L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)	68
Figura 59	Curva de la segunda derivada de ácido fuerte (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de <i>Punica</i>	69

*granatum L* Punto de equivalencia (Punto rojo) –  
Punto final (Punto verde)

Figura 60	Comparación de Absorbancia entre dos frascos de almacenamiento vidrio incoloro (Serie 1) y ámbar (Serie 2), durante un lapso de 7 días, pH 2.	71
Figura 61	Función de distribución acumulada inversa	73
Figura 62	Función de la distribución de T de Student	74

## ABREVIATURAS

BGG	Verde de Bromo-cresol
FDA	Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos
ANS	Antocianidina sintasa
UHPLC - ESI - Q - Orbitrap – MS - MS n.d	Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electrospray ionization – Quadrupole -Orbitrap - Mass Spectrometry No determinado

## Resumen

La investigación propone obtener un indicador natural ácido-base a partir del extracto de los arilos del fruto *Punica granatum L.* (granada) como opción de reemplazo a los indicadores sintéticos (Fenolftaleína). La acción indicadora del extracto del fruto *Punica granatum L.* se debe a la presencia de sustancias fitoquímicas, entre ellas las antocianinas, debido a su inestabilidad a diferentes valores de pH, temperatura y luz solar. La identificación de algunas de las antocianinas presentes se realizó por un análisis en el equipo UHPLC-ESI-MS/MS, de Fase Reversa C-18. Las pruebas preliminares para la evidencia de antocianinas, fueron medir el viraje de color del extracto frente a una solución ácida (HCl 0,1M) y una solución básica (NaOH 0,1M), así mismo se realizó una curva de escala de pH y se midió su estabilidad a la luz solar en diferentes lapsos de tiempo (5, 10 y 15 min), que a su vez fueron analizadas en el Espectrofotómetro UV-Vis, las valoraciones potenciométricas ácido-base (ácido fuerte – base fuerte, ácido débil – base fuerte), determinaron los valores de la primera y segunda derivada, obteniendo el intervalo de pH y el  $pK_{Ind}$  del extracto del fruto *Punica granatum L.* Finalmente, se confirmó que la variación del pH es uno de los factores que afectó de forma significativa el color del extracto del fruto *Punica granatum L.* (Granada), mientras que el efecto de la luz y el oxígeno a diferentes lapsos de tiempo oxidó el extracto, observándose una decoloración.

Esta investigación promueve el uso de indicadores naturales en la realización de titulaciones ácido-base.

Palabras clave: Antocianina, Indicadores Ácido-Base, pH, Flavonoides

## Abstracts

The research proposes to obtain a natural acid-base indicator from the extract of the arils of the fruit *Punica granatum L.* (granada) as a replacement option for synthetic indicators (Phenolphthalein). The indicative action of the extract of the fruit *Punica granatum L.*, is due to the presence of phytochemical substances, among them anthocyanins, due to their instability at different values of pH, temperature and sunlight. The identification of some of the anthocyanins present in the extract was performed by the UHPLC-ESI-MS / MS, Reverse Phase C-18 team. Preliminary tests for anthocyanin evidence were to measure the color change of the extract against an acidic solution (0.1M HCl) and a basic solution (0.1M NaOH), and a pH and (5, 10 and 15 min), which in turn were analyzed in the UV-Vis Spectrophotometer, acid-base potentiometric titrations (strong acid - strong base, weak acid - strong base), determined the values of the first and second derivatives, obtaining the pH range and the  $pK_{ind}$  of the extract of the fruit *Punica granatum L.* Finally, it was confirmed that the pH variation is one of the factors that significantly affected the color of the extract of the fruit *Punica granatum L.* (granada), while the effect of light at different time periods oxidized the extract, observing a discoloration.

This research promotes the use of natural indicators in the realization of acid-base titrations.

Key words: Anthocyanin, Acid-Base Indicators, pH, Flavonoids

## Introducción

Los indicadores son sustancias que cambian de color en diferentes rangos de pH, por lo general son ácidos o bases débiles, que presentan diferentes colores por sus espectros de absorción (Pokharna et al., 2010).

En 1664, Robert Boyle, realizó el primer reporte del uso de colorantes naturales como indicadores de pH en la colección de sus ensayos "Experimental History of Colors" (Suva., 2014).

Existen muchas flores, frutas y verduras que contienen sustancias químicas (antocianinas) que cambian de color en presencia del pH, actuando así, como indicadores naturales ácidos – base (Vankas et., 2015).

Algunos de los residuos líquidos generados por los laboratorios de análisis son muchas veces descartados sin ningún tratamiento previo, lo cual fue motivo de la búsqueda de un nuevo indicador amigable con el medio ambiente. La presente investigación está basada en los diferentes estudios de escala de pH, titulación potenciométrica y estabilidad a la luz solar en el extracto crudo del fruto *Punica granatum L.* caracterizados por el espectrofotómetro UV-Vis.

La descripción problemática del estudio se desarrolla en el primer capítulo, detallando los objetivos, justificación e importancia de la investigación.

El segundo capítulo describe el marco teórico, dando a conocer el estado del arte de los indicadores naturales, mencionando los trabajos realizados con este fruto y sus características, se describe además las bases teóricas que incluyen los temas de: Indicador ácido – base, determinación de  $pK_{ind}$  y el fundamento de las técnicas espectroscópicas (UV-Vis y UHPLC Ms/Ms) para la caracterización.

La descripción de la metodología utilizada, indicando los reactivos, materiales y equipos se detalla en el tercer capítulo, describiendo los ensayos preliminares

de identificación, el método de extracción y caracterización del fruto *Punica granatum L.*

En el cuarto, quinto y sexto capítulo se detallan los resultados, discusiones y conclusiones, respectivamente obtenidos en los análisis preliminares, titulación potencio métrica, estabilidad a la luz solar.

## **Capítulo I: Planteamiento del problema**

### **1.1 Descripción del problema**

La contaminación del agua aumenta considerablemente debido al desarrollo de las industrias en el mundo (Kun L. et al., 2016). Pavan et al., (2007) hace mención que la liberación de las aguas de colores en el ecosistema es una fuente de contaminación estética, causando la perturbación en la vida acuática.

Debido a su estructura química, los tintes resisten el desvanecimiento de la exposición al agua, el calor y reactivos químicos, originando riesgo a la salud entre ellos dificultad para respirar, vómitos, diarreas y náuseas (Mokhtari et al., 2016), asimismo causan problemas en el ecosistema marino, dependiendo de la concentración del colorante y del tiempo de exposición (El Qada E. et al, 2006).

Los indicadores sintéticos de pH más usados son la fenolftaleína y el anaranjado de metilo. La toxicidad de la fenolftaleína no evidencia actividad cancerígena, pero si proporciona variedad de enfermedades en ratones machos y hembras. Mientras que los colorantes azoicos con el componente arilamínica (Ejemplo.-Anaranjado de metilo), se clasifican como potencialmente cancerígenos (Mera, 2008), debido a que se descompone en aminas aromáticas (Baeissa, 2016), además retrasa el proceso de fotosíntesis inhibiendo así, el crecimiento de los organismos acuáticos (Kun L et al., 2016).

El verde de bromocresol (BGG), es otro indicador de pH que proviene de la familia del tri-fenil metano, esta familia es una de las principales fuentes donde derivan los colorantes, y la solución acuosa de cristal violeta; al 5% es útil en infecciones de la piel y las mucosas; sin embargo, posee actividad cancerígena (Negroni, 2009). La síntesis de algunos indicadores de pH (por ejemplo: fenolftaleína y anaranjado de metilo) requieren un sistema de bajas temperaturas o el uso de reactivos de alta toxicidad entre ellos el fenol (Calvo-Flores y Dobado, 2007), la cual está relacionada con la formación de radicales libres y su hidrofobicidad, afectando la solubilidad del fenol en la fracción

celular y, por tanto, la posibilidad de interacción del compuesto con las células (Pardo-Díaz et al., 2017).

La química analítica emplea estos indicadores sintéticos con el fin de verificar los cambios de pH según la variación de color, actualmente estos procesos de valoración no emplean indicadores naturales, generando inconvenientes en la contaminación que producen los procesos de descarte y proporcionando un impacto negativo en el medio ambiente (Alas y Salazar, 2010).

El aumento del interés y desarrollo de los indicadores naturales se debe a su solubilidad en el agua, mientras que los indicadores sintéticos representan riesgos químicos y elevados costo para su elaboración (Kavitha G. et al., 2014).

## **1.2 Formulación del Problema**

¿Los procesos de valoración analítica que utilizan indicadores sintéticos podrían ser reemplazados por indicadores naturales obteniendo así la misma eficiencia?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Obtener un indicador natural ácido-base del extracto de los arilos del fruto *Punica granatum L.*

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Obtener una variación de color en un rango de unidad de pH (3.5-10).

Evaluar el indicador natural *Punica granatum L.* en valoraciones ácido-base.

Estudiar la estabilidad del indicador natural por acción del oxígeno y la luz, en un periodo de tiempo caracterizándolo mediante la técnica de Espectroscopia UV-Vis.

## 1.4 Justificación e importancia de la investigación

Los laboratorios de análisis químico, generan residuos líquidos que contienen indicadores sintéticos (Fenolftaleína) y son descartados con residuos, muchas veces sin ningún tratamiento previo, desechando sustancias potencialmente nocivas para los seres humanos y el medio ambiente (Mera, 2008). El uso de nuevas fuentes de indicadores naturales, permitirá reducir la contaminación ambiental y toxicidad que producen los indicadores sintéticos, protegiendo el medio ambiente (Pavan, 2007).

Las antocianinas poseen un rango de escala de colores que abarca desde el azul (incrementos en la hidroxilación) hasta el rojo (incrementos en la metoxilación) (Garzón, 2008), el color de las antocianinas se hace más resistente a las variaciones de pH cuando se encuentra como productos de condensación con catequinas en presencia de aldehídos (Fuentes, 2005), presentando 4 diferentes estructuras estables: ión flavilo, chalcona, quinoidal y pseudobase.

Las estructuras más comunes de antocianidinas son: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, malvidina y petunidina (Castillo et al., 2010). Siendo la cianidina, la más común y responsable del color magenta, los colores rojo-naranja se deben a la pelargonidina (Figura 1), mientras que los colores violeta y azul a la delphinidina

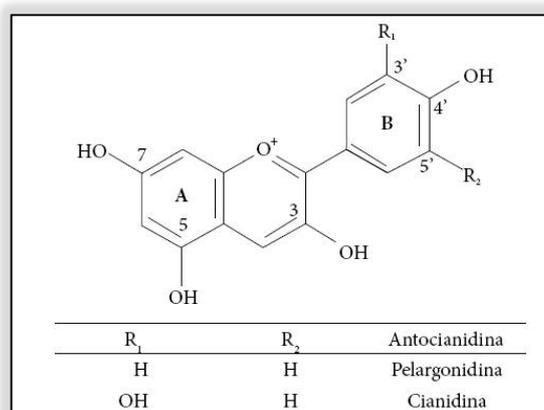


Figura 1. Estructura química de las antocianidinas más comunes.

Fuente: Salinas et al., 2013

No obstante, las frutas y hortalizas rojas tales como la uva, pitahaya, rábanos, cebolla roja y chile de árbol; comparten características en común, los flavonoides, entre los que se destacan las antocianinas, que son un grupo de pigmentos ( Castañeda-Sánchez A. & Guerrer-Beltrán J., 2015), los extractos de flores y de frijol negro fueron utilizados de forma didáctica en la Universidad Federal de São Carlos para la determinación del punto final en titulaciones de neutralización, mientras que el extracto de repollo púrpura fue aplicado en actividades educativas para la determinación de la acidez de diversas sustancias (Lopes D. & Vitorino A., 2001).

El extracto de los arilos del fruto *Punica granatum L.* (Granada), presenta un elevado contenido de antocianinas, que son sustancias orgánicas básicas y poseen una versión protonada; entre las principales propiedades se encuentran su diversidad de colores, lo que los hace posibles indicadores de pH (Marcondes et al.,2014); a las cuales se les atribuye la alta capacidad antioxidante del jugo de granada, que es asociado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer (Díaz, 2014).

Actualmente, los indicadores naturales vienen siendo usados en forma didáctica para explicar la variación de pH observándose la variación de color, sin embargo, el impacto ambiental que producen es menor a comparación de los indicadores sintéticos (Fenolftaleína).

Es por ello que mediante la presente investigación se propone la obtención de un Indicador ácido-base de origen natural, ya que de esta manera se está proponiendo una alternativa con el fin de reducir el impacto económico y ambiental que se da en el uso excesivo de reactivos químicos sintéticos.

## **Capítulo II: Marco Teórico**

### **2.1 Estado del arte y antecedentes**

Un colorante es cualquier pigmento o cualquier otra sustancia obtenida por síntesis o artificio similar o extraída, aislada y derivada con o sin intermediarios de cambio final de identidad a partir de un vegetal, animal o mineral u otra fuente que cuando es añadida o aplicada a los alimentos, medicamentos, cosméticos, al cuerpo humano o a cualquier otra parte, por sí misma es capaz de impartir color, de acuerdo con la FDA (Administración de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos de Estados Unidos).

Existen varios criterios de clasificación de los colorantes, estos grupos se basan en su procedencia, fuente de origen o por su grupo cromóforo; de acuerdo con su procedencia, los colorantes pueden ser clasificados en dos grandes grupos: naturales y sintéticos o artificiales; como se observa en la Figura 2 (Fuentes, 2005).

Actualmente, existe una fuente importante de colorantes naturales presentes en frutas rojas tales como cerezas, ciruelas, fresas, frambuesas, zarzamoras, uvas, pasas rojas y negras (Aguilera Ortiz, Alanis Guzmán, & Carmen, 2005), esta tendencia a utilizar colorantes naturales en lugar de los sintéticos o artificiales se debe a la creciente preocupación por la toxicidad de los colorantes sintéticos (Rojo 2 y 40) usados en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos; estos son indicios suficientes para disminuir la demanda de colorantes artificiales a favor del consumo generalizado de colorantes naturales como las antocianinas (Garzón, 2008), que se cree que son inocuos y, por tanto, sin riesgo para la salud humana (Castillo, 2006).

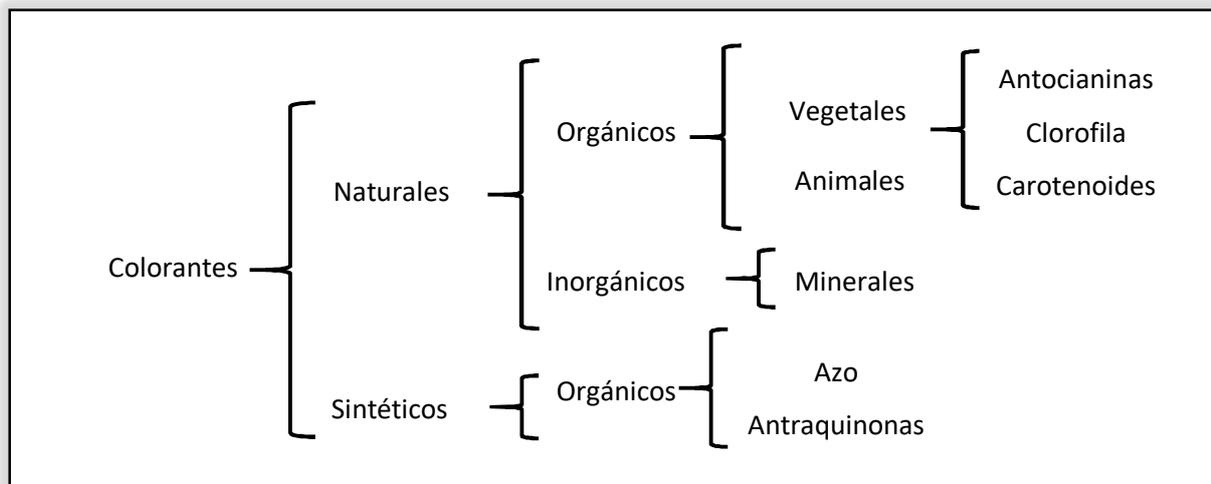


Figura 2. Clasificación de los colorantes.

Fuente: Fuentes, 2005

El color de las flores es una de las más importantes características en algunas plantas e influenciado por muchos factores internos y externos (temperatura, pH del suelo, minerales y etc.) (Zhao et al., 2016).

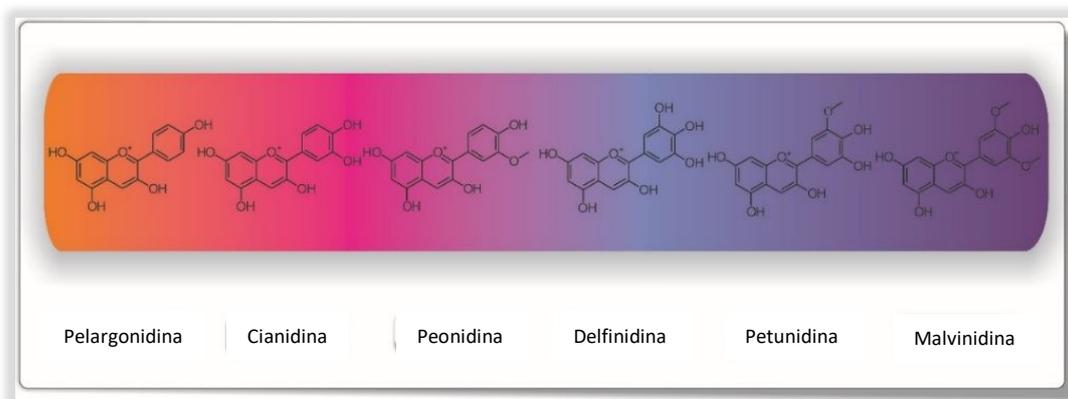
Varias especies vegetales disponibles en la naturaleza, contienen compuestos orgánicos coloridos, tales como flavonoides, taninos, carotenoides, entre otros. La reactividad de los compuestos polifenólicos (flavonoides) presentes, se debe a la acidez de sus grupos hidroxilo fenólicos, y a la resonancia entre el par de electrones libres en el oxígeno fenólico y el anillo de benceno, aumentando así la deslocalización de electrones (Andersen O. y Markham K., 2006)

Dentro de estas clases de polifenoles, las antocianinas destacan debido a sus diversas e innumerables actividades; en el vegetal, los antocianósidos (antocianinas) se acumulan en las vacuolas y el pH del medio puede determinar la coloración de los tejidos. (Barahona & Rivera Bonilla, 2006), proporcionando estabilidad y solubilidad en agua (Pascual-Teresa et al., 2010), este grupo de componentes son asociados con plantas coloridas.(Bertini, n.d.).

Se consideran además que las antocianinas tienen como función en la planta el ser atrectores de insectos para los procesos de polinización y diseminación de las semillas (Fuentes, 2005).

Este grupo está presente en diferentes partes de la planta entre ellos: la fruta, el tallo, la hoja, la flor, el tubérculo y los colores de la raíz (naranja, rojo, púrpura y azul). Entre algunas propiedades se incluyen principalmente radicales libres, actividad protectora contra irradiación UV Vis (He et al., 2012), y actividad anticancerígena; la cual está relacionada con su capacidad antioxidante (Aza-González & Ochoa-Alejo, 2012).

Las antocianinas, al igual que otras sustancias polifenólicas, se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo conocidas sus agliconas como las antocianidinas (Figura 3), si bien existen seis antocianidinas comunes, se han identificado en la naturaleza más de 540 pigmentos antociánicos, siendo la mayor parte de la variación estructural procedente de la sustitución glicosídica en las posiciones 3 y 5 por medio de un enlace  $\beta$ -glicosídico (Andersen O. & Markham K., 2006). Su fórmula básica está compuesta por dos anillos aromáticos unidos por una estructura de tres carbonos. Cuando el residuo de azúcar es un hidrolizado de la antocianina, el resultado es la aglicona, conocida como antocianidina.



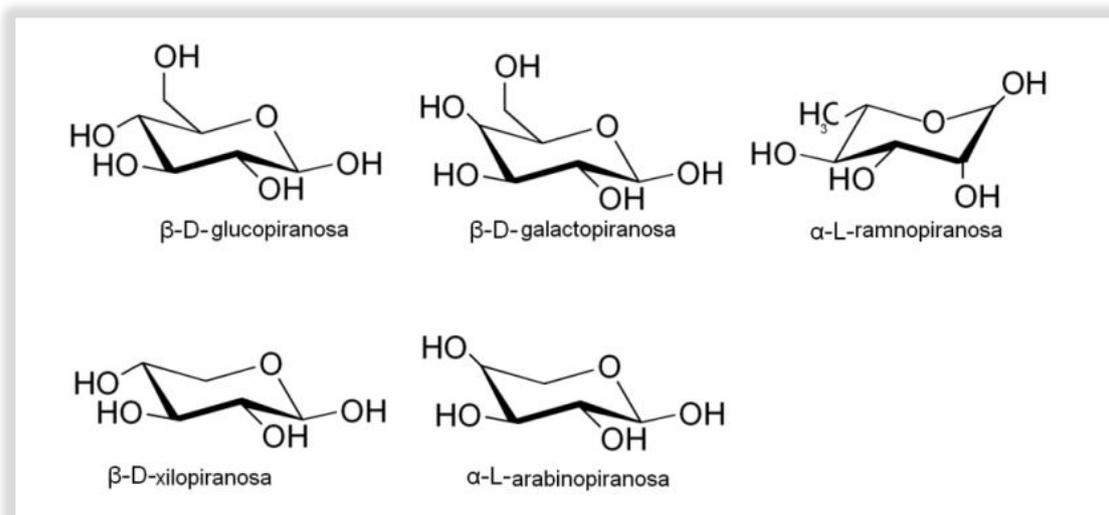


Figura 4. Estructura de los monosacáridos más comunes encontrados en las estructuras de antocianinas.

Fuente: Santacruz, 2011

### 2.1.1 Biosíntesis de las Antocianinas

La ruta bio-sintética de las antocianinas es parecida al de los compuestos flavonoides debido a que poseen el esqueleto carbonado característico  $C_6C_3C_6$  y el mismo origen bio-sintético como otros flavonoides naturales (Garzón, 2008), siendo estos productos de una unidad de arranque de cinamoil-CoA, con extensión de cadena utilizando tres moléculas de malonil-CoA como se observa en la Figura 5, permitiendo de esta manera que se pueda enlazar en dos maneras diferentes, por reacción aldólica o Claisen, las enzimas estilbeno sintasa y chalcona sintasa acoplan una unidad cinamoil-CoA con tres unidades de malonil-CoA dando estilbenos, resveratrol, chalconas o naringenina-chalcona respectivamente (Dewick P.,2002, p150).

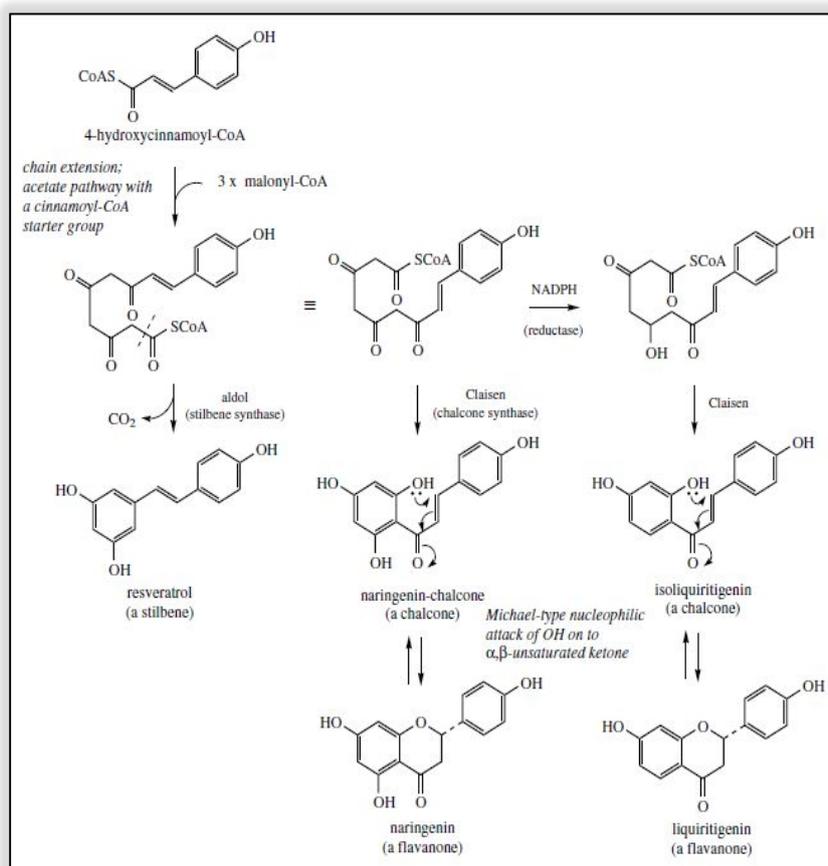


Figura 5. Biosíntesis de flavonona.

Fuente Dewick P., 2002, p 150

Este compuesto intermedio de 15 C es transformado en una flavanona a partir de reacción catalizada por una chalcona isomerasa, para la posterior transformación correspondiente de la flavona en antocianidina por una reacción de hidroxilación en el carbono 3 seguida de una deshidratación como se observa en la Figura 6.

La función presente de la antocianidina sintasa (ANS) en la ruta biosintética es catalizar la reducción de las leucoantocianidinas (Andersen O. & Markham K., 2006).

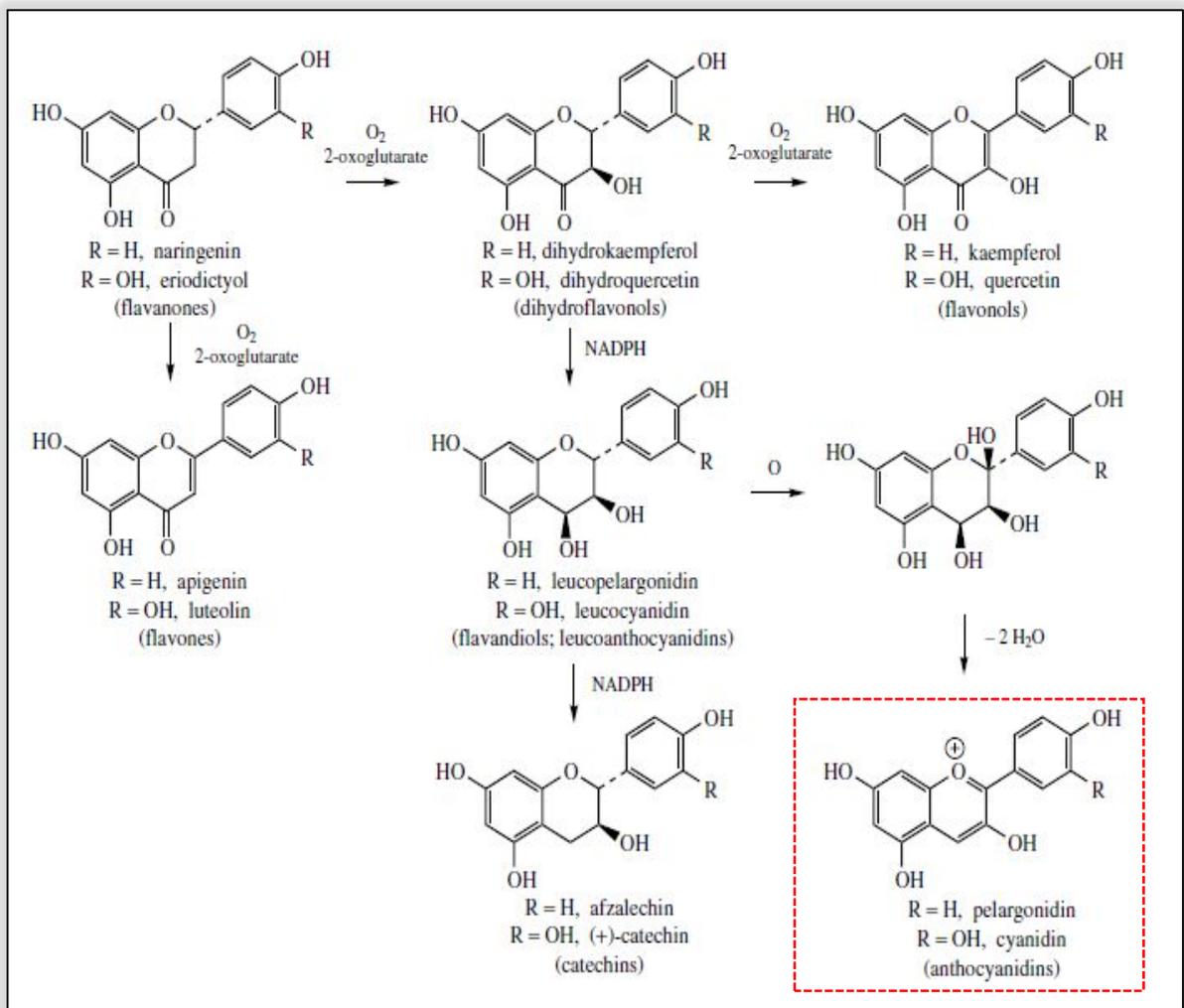


Figura 6. Biosíntesis de antocianinas

Fuente Dewick P.,2002

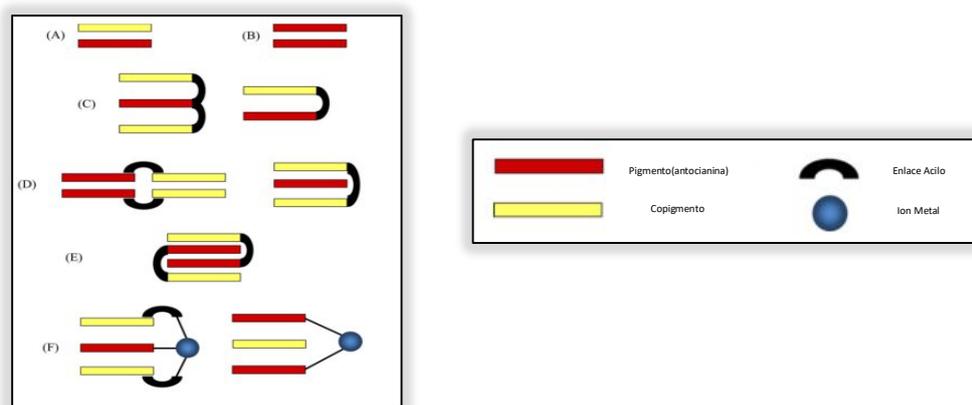
### 2.1.2 Estabilidad de antocianinas

Las antocianinas como pigmentos naturales inocuos tienen considerable potencial en la industria alimentaria, pero varios factores afectan la estabilidad y producen la degradación de estos, entre ellos se encuentran la pérdida de color, seguida de la aparición de color amarillento y formación de productos insolubles; la estabilización del color es dependiente de la estructura y la concentración de los pigmentos, y otros factores como el pH, la temperatura, la presencia de oxígeno (Lopes et al., 2007), luz y presencia de otros compuestos como flavonoides, proteínas y minerales (Leyva, 2009).

### 2.1.2.1 Copigmentación.

La Copigmentación es una interacción molecular que se produce entre antocianinas y copigmentos (Gris et al.,2005) entre ellos: aminoácidos, ácidos orgánicos, flavonoides y alcaloides; a partir de la interacción electrónica planar (Cuevas et al., 2008), produciendo un aumento de intensidad de color y un cambio en la longitud de absorción máxima (efecto bato-crómico) (Lopes et al., 2007); que se da a través del desplazamiento del equilibrio de hidratación-deshidratación hacia los cromóforos, de esta manera la intensifica el color y mejora la utilización de las antocianinas como colorantes naturales (Santacruz, 2011).

Las antocianinas forman complejos débiles con proteínas, taninos, otros flavonoides y polisacáridos esta interacción se conoce como copigmentación intermolecular (Figura 7), la cual pareciera ser menos eficiente en la estabilización de los cromóforos de las antocianinas que la co-pigmentación intra-molecular, que es la acilación, aun así las características de ambos fenómenos son similares; este efecto ha sido considerado principalmente responsable de la coloración de tejidos de flores y frutas (Ortiz, 2009).

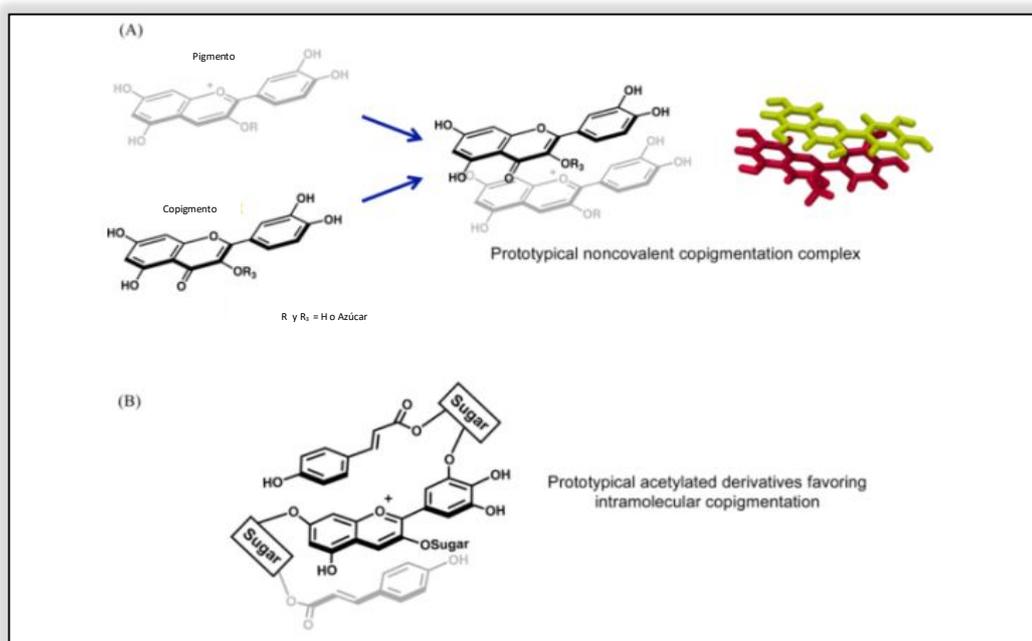


“ (A) Copigmentación intermolecular, (B) auto-asociación, (C) copigmentación intramolecular en antocianinas aciladas, (D) auto-asociación de antocianinas aciladas, (E) intercalación en copigmentación intermolecular, y (F) copigmentación en complejos metal-antocianina”

Figura 7. Interacciones  $\pi$ - $\pi$  de apilamiento en antocianinas y sus complejos

Fuente: Trouillas et al., 2016

Las estructuras anteriores se mantienen por la interacción hidrófoba ( $\pi$ - $\pi$  apilamiento) de los núcleos planares polarizables del anillo B de la antocianina (tanto del catión de flavilo como de la base quinoidal) con el residuo aromático del mismo pigmento (He et al., 2012). Mientras que la forma hemiacetal tiene dos anillos aromáticos sin conjugar y un anillo central el cual no es planar, porque tiene un carbono tetraédrico, por lo tanto el ión flavilio es la única especie capaz de co-pigmentar (Cuevas et al., 2008). Por el contrario las energías de asociación de copigmentación intramolecular son menos susceptibles de determinar experimental porque posee un equilibrio conformacional (Trouillas et al., 2016).



“(A) Asociación no covalente de un pigmento prototípico de antocianina y un copigmento prototípico de flavonoides (copigmentación intermolecular). (B) Derivados acilados prototípicos que permiten la copigmentación entre el resto antocianina y dos ácidos fenólicos unidos covalentemente (copigmentación intramolecular)”

Figura 8. Tipos de copigmentación

Fuente: Trouillas et al., 2016

### 2.1.2.2 Luz

Según Lopes et al., 2007 indican que el efecto de la luz ataca a las antocianinas presente en la hierba, con una intensidad considerable, pero este efecto está íntimamente ligado al efecto del pH (Figura 10) sin embargo las

antocianinas que presentan sustituyentes en el hidroxilo del carbono 5 son más susceptibles a la degradación de la luz (Castañeda-Sanchez et al., 2015), su descomposición es principalmente foto-oxidativa debido a que el ácido p-hidroxibenzoico ha sido identificado como un producto de degradación menor (Ortiz, 2009).

Mientras que las antocianinas di-glicosiladas son más estables a la decoloración durante la exposición a la luz que los mono-glicósidos (Márquez, 2011).

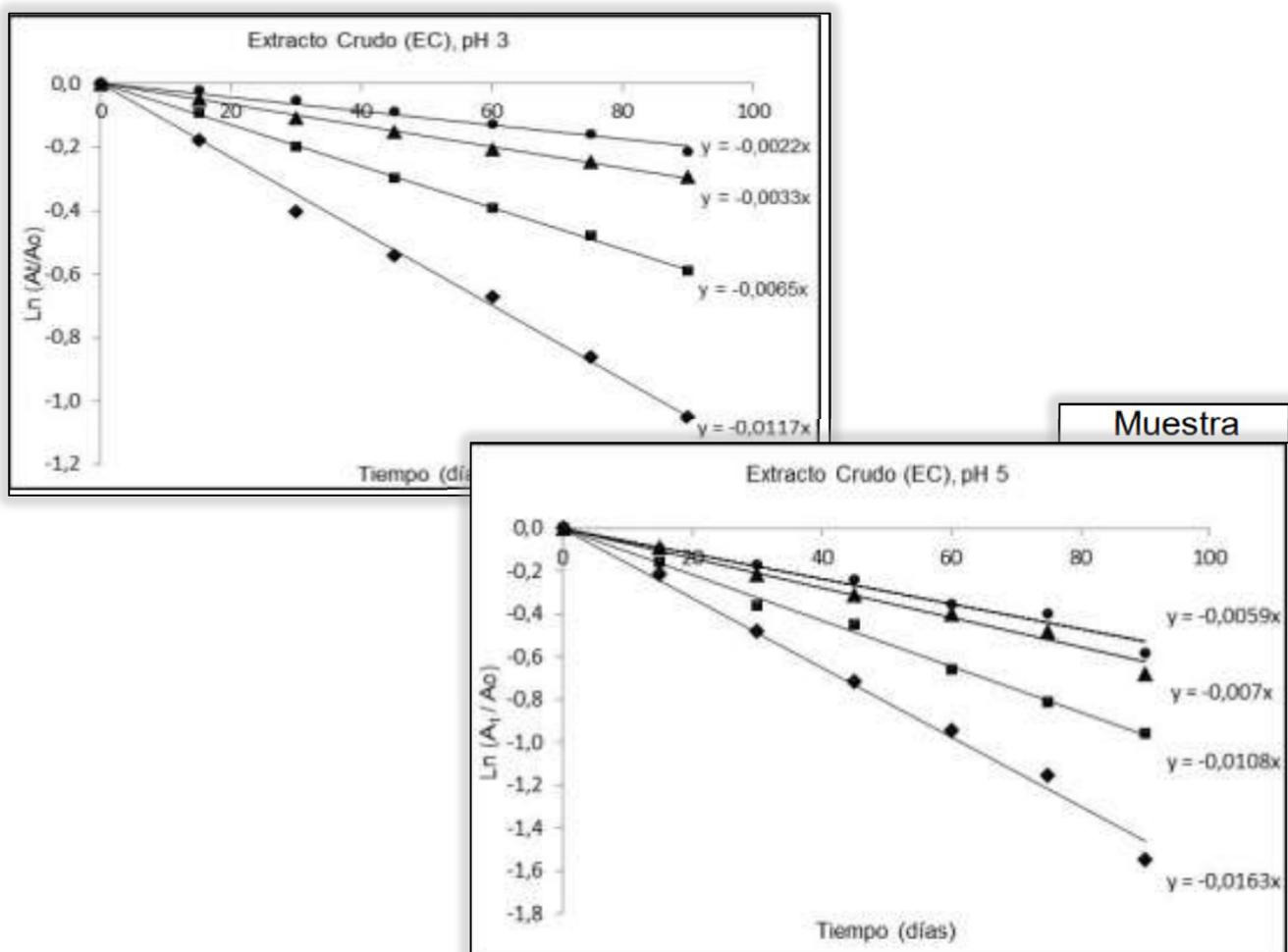


Figura 9. Comportamiento cinético del proceso de degradación del EC, en diferentes condiciones de almacenamiento (PA; presencia de aire, PL; presencia de luz, AL; ausencia de luz, AA; ausencia de aire)

Fuente: Trouillas et al., 2016

### 2.1.2.3 Temperatura

La estabilidad térmica de las antocianinas varía según su estructura, presencia de oxígeno e interacciones con otros componentes. En general, la estabilidad del pH conduce a su estabilidad térmica, por ejemplo, la hidroxilación de la aglicona decrece la estabilidad, mientras que la metoxilación, glucosilación y acilación tienen el efecto opuesto (Ortiz, 2009).

Las antocianinas se degradan fácilmente a temperaturas superiores a los 40°C. El efecto de la temperatura ocurre por dos mecanismos: por la hidrólisis del enlace glucosídico (pérdida del azúcar glicosilante en la posición 3 de la molécula que da lugar a la formación de la aglicona) (Marquez., 2011) o la ruptura hidrolítica (formación de chalconas) (Castañeda – Sánchez et al., 2015).

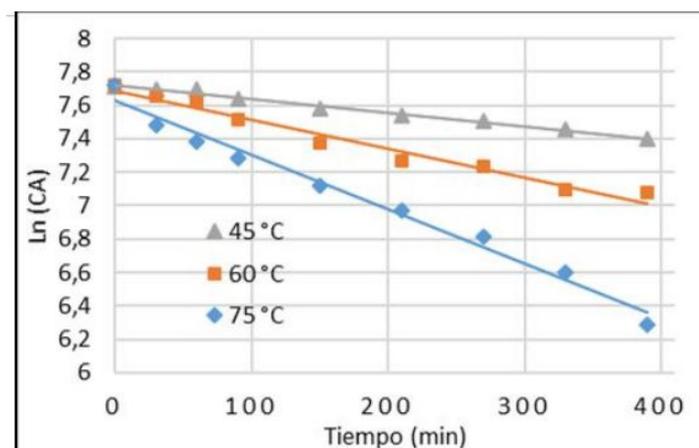


Figura 10. Cinética de primer orden de degradación 45°C, 60°C y 75°C; lineación de la concentración de antocianinas en función del tiempo.

Fuente: Mendoza E. et al., 2016)

### 2.1.2.4 Variación de pH

En medios acuosos las antocianinas sufren transformaciones estructurales dependiendo del pH (Ortiz., 2009).

Se han encontrado cuatro formas de antocianinas que existen en equilibrio: el catión flavilio, la base azul quinonoidal, la pseudobase incolora carbinol y la

chalcona (Figura 11). En soluciones ácidas, la antocianina es de color rojo, debido al catión flavilium, pero al aumentar el pH la intensidad de color disminuye, por el efecto de conjugación del catión flavilio o hidratación del C2, incrementando la forma carbinol que es incolora (Peguero, 2007) este cambio es debido a la formación de un carbinol, por ataque nucleófilo del agua, sobre el ión flavilio.

A valores de pH ligeramente ácidos o neutros el carbinol y las formas de base quinoidal dominan al catión flavilio, así el color destiñe y cambia de rojo a azul (Lopes et al., 2007), por la pérdida de un protón en el C7; un aumento del pH conduce, seguidamente, a una chalcona (Morales et al., 2005).

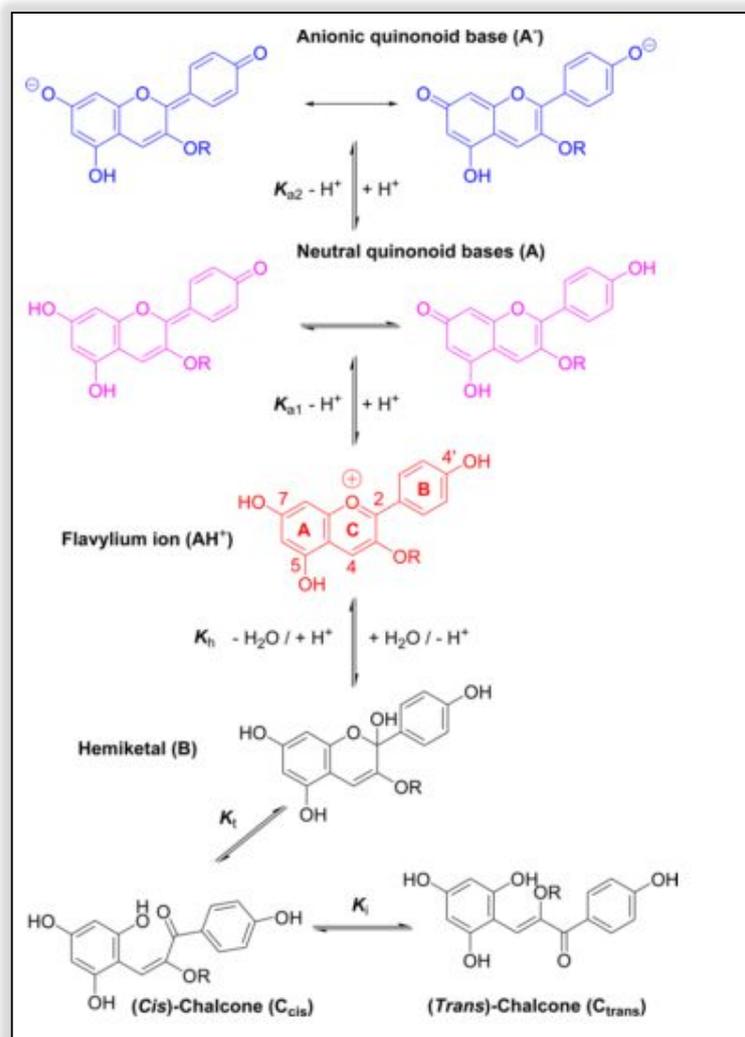


Figura 11. Transformaciones estructurales de las antocianinas en solución ácida a neutra.

Fuente: Trouillas et al., 2016

La formación de cis-chalcona de base quinoidal anhidra ocurre por dos maneras diferentes: el resultado de un aumento de pH, o la formación de especies base quinoidal anhidra ionizadas ( $A^-$ ), debido a un aumento gradual entre los valores de pH 6,5 y 9. En medio altamente alcalino se observa un equilibrio entre las formas ionizadas de chalconas: cis y trans, que muestra un color amarillento (Henrique Marco et al., 2007).

Aunque en muchos casos debido al pH existente, el carbinol incoloro es el mayoritario, lo que implica que las coloraciones observadas, estén ligadas a una copigmentación base anhidra con flavonoides o a un complejo metálico (Morales et al., 2005).

Según se hace mención, tres equilibrios importantes ocurren al elevar el pH de una solución ácida que contiene una antocianina (Boldarini., 1998); la primera reacción es el equilibrio rápido ácido-base de la protonación de catión flavilio, luego la formación de una pseudo-base carbinol, a través de un equilibrio rápido con constante  $K_b$  y finalmente un equilibrio tautomérico lento, formando un pseudobase chalcona incolora con una constante de equilibrio  $K_T$ .

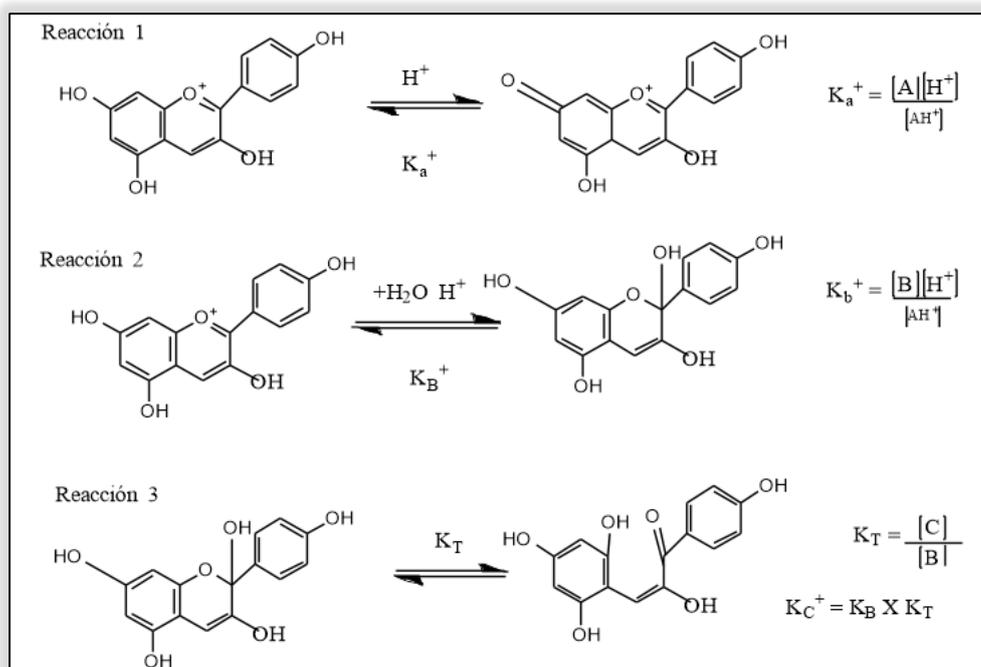


Figura 12. Equilibrio de las antocianinas, durante la variación de pH

Fuente: Boldarini., 1998

### 2.1.2.5 Oxígeno

Las antocianinas son inestables en presencia de oxígeno, son termolábiles y los cambios en el pH provocan su transformación estructural, incluso en ausencia de luz.

Se produce dos tipos de degradación, oxidación directa o indirecta de los componentes del medio que reaccionan con antocianinas.

**Oxidación directa:** Formación de precipitados y el desarrollo de turbidez en zumos de fruta (Lopes, 2007).

**Oxidación indirecta:** Oxidación de constituyentes que reaccionan con las antocianinas resultando producto descolorido u oscuro. (Ortiz Aguilera, 2009)

En presencia de oxígeno la máxima estabilidad térmica de las antocianidina – 3 glicosidadas es a pH 1.8 a 2.0, mientras que para las antocianidinas -3,5 diglicosidadas lo es a pH 4.0 – 5.0 (Fuentes, 2005).

### 2.1.3 *Punica granatum L.*-

El estudio de las antocianinas en frutas tropicales, ha tomado fuerza la última década no solo por la capacidad de pigmentación, sino también por su capacidad antioxidante (Santacruz, 2011).

La granada (*Punica granatum L.*) es un fruto cuyo cultivo se conoce desde la antigüedad, pertenece al Centro Oriente Próximo (Asia Menor, la Transcaucásica, Irán y las tierras altas de Turkmenistán), centro al que también pertenecen otros frutales como la higuera, manzano, peral, membrillero, cerezo, almendro, avellano, castaño, etc. El cultivo del granado se extendió desde estas zonas al resto de países del área mediterránea, India y China. Los españoles lo llevaron a América y aquí está adquiriendo gran importancia, especialmente durante los últimos 15 años (Melgarejo et al., n.d)

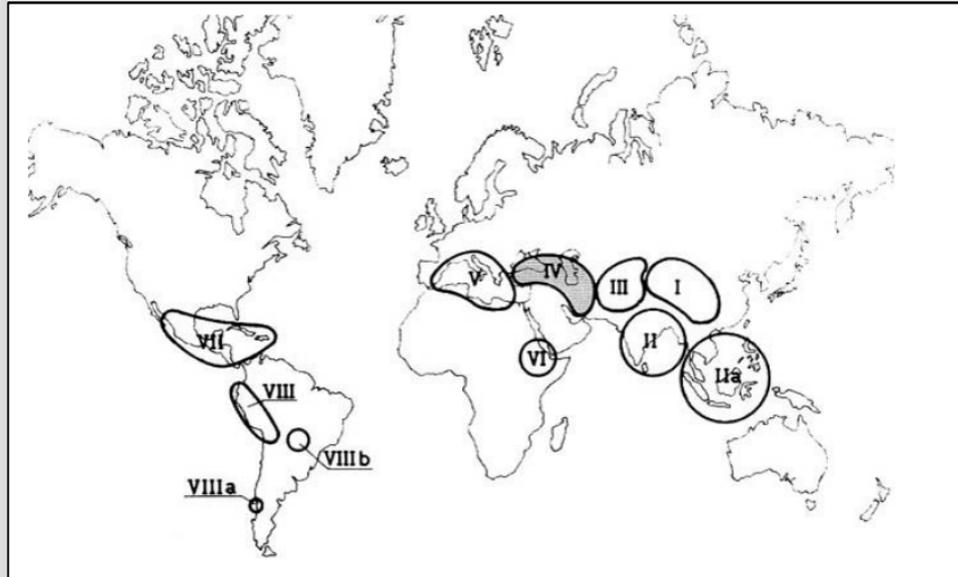


Figura 13. Centro de origen y diversidad de las plantas cultivadas.

Fuente: Melgarejo et al., n.d

El árbol llega a medir entre 3 a 6 m de altura, posee el tronco retorcido, madera dura y corteza escamosa de color grisáceo, algunas de las ramas son espinosas, tiene ramillas angulosas, copa extendida y mucho ramaje

Su clasificación sistemática es la siguiente (Calín & Carbonell, n.d.):

- División:** Fanerógamas
- Clase:** Dicotiledóneas
- Subclase:** Arquiclamídeas
- Orden:** Myrtales.
- Familia:** Punicaceae
- Género:** *Punica*
- Especie:** *Punica granatum L.*

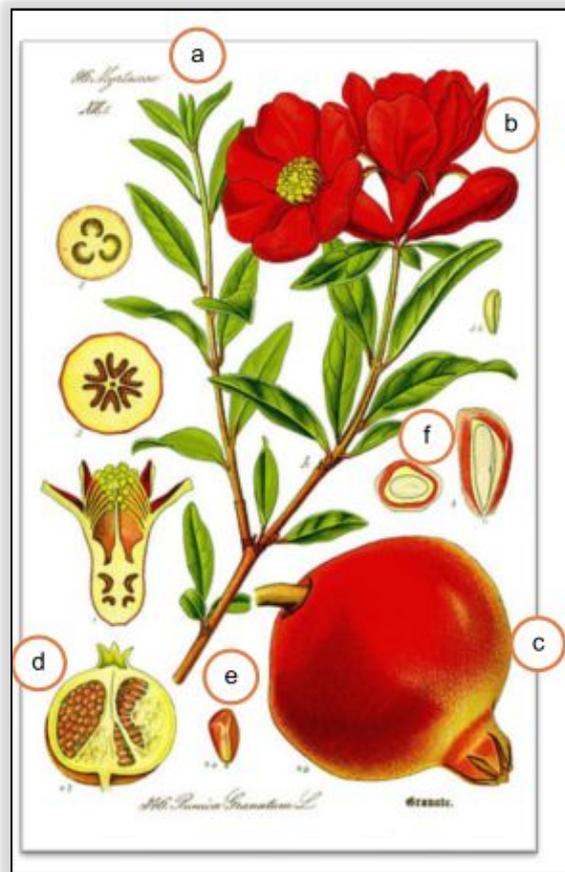


Figura 14. Partes de *Punica granatum L.* a) hojas, b) flores, c) fruto, d) corte longitudinal del fruto, e) arilo, f) cortes longitudinal y transversal del arilo.

Fuente: Díaz., 2014

La granada posee numerosos compuestos químicos de alto valor biológico en sus diferentes partes: corteza, membranas carpelares, arilos y semillas; entre ellos se encuentran: polifenoles, flavonoides; elagitaninos, proantocianidinas y minerales (potasio, nitrógeno, calcio, fósforo, magnesio y sodio). La parte comestible de la granada representa alrededor del 50% del peso total de una granada y consiste en un 80% de arilo (parte carnosa) y un 20% de semilla (Calín A. et al n.d).

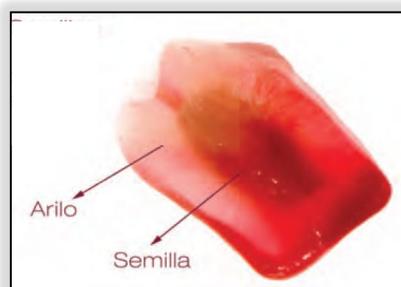


Figura 15. Porción comestible: arilo y semilla.

Fuente: Calín & Carbonell, n.d

Diversos estudios indican que los arilos de la granada presentan un elevado contenido de antocianinas, a las cuales se les atribuye la alta capacidad antioxidante de los jugos de granada (Díaz, 2014). Además, análisis químicos han reportado que la *Punica granatum L.* contiene un nivel significativamente alto de taninos hidrolizables, así como antocianinas; como se observa en la Figura 16, los cuales han sido asociados con diversas propiedades benéficas a la salud (Tzulker R., 2007)

Tabla 1: Principales compuestos funcionales en las diferentes partes de la granada.

Fuente: Díaz, 2014

Parte de la Planta	Constituyentes
<b>Jugo</b>	Antocianinas, ácidos gálico, elágico y cafeico, catequina, elagitaninos, quercetina, rutina.
<b>Aceite de Semilla</b>	Ácido linoleico conjugado, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido eleosteárico, ácido catálpico
<b>Cáscara y albedo</b>	Punicalagina, punicalina, pedunculagina, ácido elágico y galágico, luteolin, quercetina, kaempferol

### 2.1.3.1 Propiedades del zumo de granada (*Punica granatum L.*)

El ácido púnico tiene efectos anti-aterogénicos, que pueden ser transformados en urolatinas (Larrosa et al, 2010). Las punicalaginas son los compuestos que presentan mayor capacidad antioxidante o captadora de radicales libres y son

responsables de aproximadamente el 50% de esta actividad en el zumo de la granada (Díaz, 2014).

El zumo de granada posee sustancias con actividad antibacteriana, antiviral, anticancerígena, antiinflamatoria, para el control del colesterol y prevención de problemas cardiovasculares, etc. Son las punicalaginas los compuestos que presentan mayor capacidad antioxidante o captadora de radicales libres y son responsables de aproximadamente el 50% de esta actividad en el zumo de granada, desarrollando así una capacidad antioxidante tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde (Melgarejo et al., n.d).

### **2.1.3.2 Extracción de zumo de granada (*Punica granatum L.*)**

El producto más estudiado e importante del derivado de la granada es el zumo. La composición del arilo de la granada es la siguientes: agua (85%); azúcares (10%), principalmente fructuosa y glucosa; ácidos orgánicos (1,5%), principalmente ácido ascórbico, cítrico y málico; compuestos bio-activos tales como poli-fenoles y flavonoides (principalmente antocianinas) (Calín & Carbonell, n.d)

Existen diversos métodos de extracción de jugo de granada, los más utilizados son: método manual, donde se separan los arilos de la cáscara y albedo para prensarlos a través de una malla; y exprimidor, en donde se utiliza una prensa donde se comprime la fruta entera, por lo que se extrae jugo tanto de los arilos como del albedo. A diferencia del contenido de fenoles solubles totales y taninos hidrolizables, la concentración de antocianinas es menor en extractos elaborados a partir del exprimidor y del procesador que en los elaborados a partir del método manual (Díaz, 2014).

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 Análisis de Antocianinas por espectrofotometría UV-Vis

Las antocianinas son compuestos cromóforos al igual que los carotenos y las xantófilas. Tales compuestos al tener estructuras resonantes tienen conjugación electrónica, por sus 8 dobles enlaces (Ortiz, 2009), lo cual aumenta a medida que la molécula tiene grupos sustituyentes con pares de electrones no compartidos. A partir de esto se generan alteraciones en la configuración electrónica que provocan cambios en la forma de la molécula y por ende un desplazamiento de la máxima absorbancia en el espectro ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) (Peguero, 2007).

Debido a su estructura, las antocianinas presentan máximos de absorción tanto en la región visible como en la ultravioleta lo que resulta muy importante para la caracterización estructural de dichos compuestos. De hecho, la espectrofotometría UV/Vis, constituye una herramienta muy útil para el estudio de pigmentos y colorantes, determinando la longitud de onda de absorción del grupo cromofórico que da lugar a la coloración específica (Contreras R., 2007)

Sus espectros de absorción se caracterizan por tener dos bandas separadas una en el UV alrededor de 275 nm. y otra en la región visible entre 465 y 550 nm, esta última banda de absorción varía con el pH del medio. (Castillo et al., 2010). Esto sugiere que el anillo A absorbe en el rango UV, mientras que la absorción visible es debido al anillo B. La región visible permite observar el efecto de la co-pigmentación, muestra un efecto hiper-cromico (el aumento de la intensidad de la máxima observada) resultando en muestras con mayor presencia de color; y un desplazamiento batocromico de la absorbancia máxima de la posición de la longitud de onda más pequeño, causada por el efecto de solvatación (Lopes, 2007).

Algunos factores que influyen en el desplazamiento de la absorbancia o la longitud de onda, son la glicosilación y grupos acilo.

**Glicosilación.**- Se produce un desplazamiento del máximo de absorción en la región visible de unos 10 nm hacia longitudes de onda más bajas, en relación con el aglicón correspondiente. Las antocianinas de di-glucósido presentan máximos de absorción hacia longitudes de onda más bajas que los mono-glucósidos correspondientes.

**Grupos acilo.**- Puede causar la aparición de un máximo adicional (o hombro) en el espectro UV. Un ejemplo, la esterificación con el ácido p-cumárico aumenta la absorción aproximadamente a 308-313 nm y con ácido cafeico a 326-329 nm (Escribano – Bailon et al.,2004).

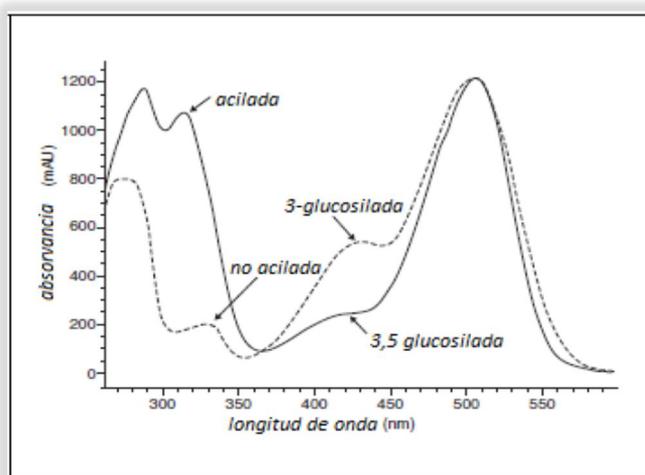


Figura 16. Espectros UV-Vis de las antocianinas aciladas y 3,5 –diglicósido (línea continua); no aciladas y 3-glucosiladas (línea discontinua)

Fuente: Santacruz., 2011

### 2.2.2 Análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS

La cromatografía líquida en fase reversa C18 se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas, debido a las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, y una fase estacionaria apolar. Debido a que las antocianinas son compuestos polares, este tipo de columnas se usa para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de estos pigmentos, usualmente el tiempo de retención de las agliconas se da en el siguiente orden: delphinidina < cianidina < pelargonidina < petunidina < peonidina < malvidina. Las

antocianinas glucosiladas eluyen en el siguiente orden: 3,7 diglucósidos < 3,5 diglucósidos < 3-sophorósidos < 3-rutinósidos < 3 ramnósidos (Santacruz, 2011).

El Espectrofotómetro de Masas Q Exactive Focus, presenta algunas herramientas en particulares:

- Electro-Spray: La fuente de ionización, que es el punto de partida donde se forma la nube y el flujo de iones.
- Tubo de Transferencia o Ion transfer: Es el túnel de entrada donde la muestra se mueve por el vacío que aplican las bombas internas.
- Lentes "S": Se encargan de colimar (ajuste de trayectoria) mediante la aplicación de voltajes.
- Skimmer: Puerta posterior que poseen los lentes S.
- Flatopolo de Inyección o Flatopolo Curvo: Las únicas vías de aceleración del haz de iones, debido a que solo aplican un radio de radiofrecuencia que hace moverse a cualquier partícula con carga, sin discriminar ni filtrar por masa.
- El cuadrupolo: Separación y filtración por masas, adicionalmente aplican un campo eléctrico variable que permite a las masas separarse y filtrarse.
- La celda C o Celda de Confinamiento (C trap): Caja de almacenamiento de iones, pueden pasar de forma directa al detector Orbitrap (Celda de colisiones HCD).

El sistema fue totalmente automatizado y controlado por el software Thermo Scientific SIEVE, que fue usado para la recopilación y análisis de datos. La temperatura del Vaporizador fue 500°C, el ion de transferencia de temperatura del tubo en 400°C, y el voltaje del Spray utilizada fue en +3000 V, mientras el flujo del líquido 1000uL/min.

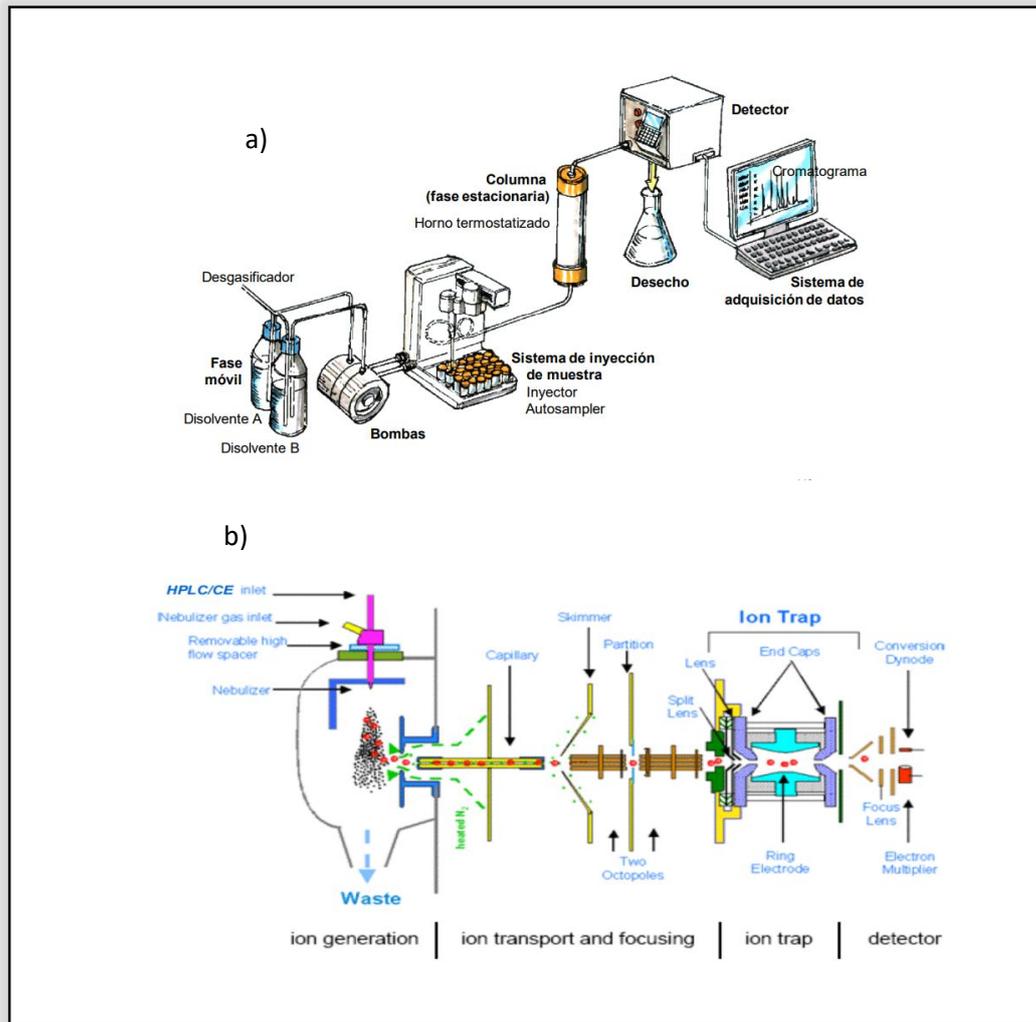


Figura 17. a) Esquema que incluye los componentes básicos de un sistema de HPLC b) Esquema de un espectrófotometro de masas ESI-IT.

Fuente: Gómez., 2010



Figura 18. Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electro spray ionization- Quadrupole-Orbitrap-Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS)

Fuente: Foto tomada del Laboratorio de Productos Naturales – Universidad de Antofagasta

### 2.2.3 Indicadores Ácido – Base

Los indicadores ácido-base y los indicadores de pH son sustancias orgánicas débilmente ácidas (indicadores ácidos o indicadores básicos) que tienen diferentes colores para sus formas protonadas y des-protonadas (cambian de color en función del pH). Se clasifican comúnmente de acuerdo con los mecanismos de modificación de sus colores, para ser aplicados como indicadores (Marcondes et al., 2014).

En el análisis químico se estudia los métodos y las técnicas para determinar la composición de la materia en forma cualitativa y cuantitativa. Ambos procedimientos se asemejan en el hecho de que se utiliza para su determinación cualquiera de las propiedades de la sustancia de interés, ya sean químicas y físicas que puedan proporcionar la información deseada, para detección o cuantificación.

La química analítica ha empleado indicadores sintéticos con el fin de verificar cambios de pH por la variación de color, no obstante se determinó que el extracto coloreado de ciertos frutos, vegetales, flores también cambia de color en soluciones ya sean ácidas o básicas (Barahona et al., 2006).

Un estudio con extractos de etanol de flores quaresmeria (*Granulosa tibouchina*) entre otras, se utilizaron como indicadores en el proceso de normalización del NaOH usando biftalato de sodio como patrón, demostrando su eficacia (Suarez, et al 2001, citado por Brillhante et al.,n.d).

### 2.2.4 Determinación de $pK_{Ind}$

La determinación del  $pK_{Ind}$ , se realizó a partir de las diferentes absorbancias emitidas en diferentes valores de pH, utilizando la ecuación de:

$$pK_{ind} = pH + \log\left(\frac{A - A_{Ind^-}}{A_{HIN} - A}\right)$$

Deducida de la Ecuación de Lambert – Beer “Ley del equilibrio  $H_{\text{Ind}} \rightarrow H^+ + \text{Ind}^-$ ”  
Una misma alternativa de intervalo de pH con transición de color para el indicador fue dado por  $\text{pH} = \text{pK}_{\text{Ind}} \pm 1$ . (Guimarães et al., 2012)

## 2.3 Formulación de hipótesis y variables

### 2.3.1 Hipótesis

#### 2.3.1.1. Hipótesis general

El indicador natural del extracto *Punica granatum L.*, puede reemplazar un indicador sintético (Fenolftaleína)

#### 2.3.1.2 Hipótesis específicas

El indicador natural del extracto de *Punica granatum L.* cambia de color en un rango de pH 3.5 – 10.

El extracto de *Punica granatum L.* puede usarse como indicador natural en valoraciones potenciométricas ácido – base.

El extracto de *Punica granatum L.* es estable frente al oxígeno y luz, durante un periodo de tiempo (5, 10 y 15 minutos).

### 2.3.2 Variables

Variables Independientes. -

- La estructura química de la antocianina que presenta el fruto *Punica granatum L.* en el extracto de los arilos.

Variable Dependiente. -

- La capacidad del extracto *Punica granatum L.* de ser un indicador natural.

### Capítulo III: Método

El desarrollo experimental se dividió en dos partes:

- Extracción, purificación y ensayos preliminares se desarrollaron en los laboratorios de Química Analítica y Química Experimental de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

- Los estudios de identificación y curvas potencio-métricas se realizaron en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Antofagasta – Chile

#### 3.1 Materiales – Reactivos

- Acetato de sodio (Anhidro)
- Ácido acético (Glacial)
- Ácido bórico (Sólido)
- Agua ultrapura ( $<2\mu\text{Scm}^{-1}$ )
- Buretas (25 mL)
- Cloruro de potasio (Sólido)
- Embaces Ámbar (100,150, 200 y 250 mL)
- Embudo
- Erlenmeyer (250 mL)
- Espátula
- Fenolftaleína
- Fiolas (100 y 250 mL )
- Fosfato de sodio di-básico (Anhidro)
- Fosfato de sodio mono-básico (Di-hidratado)
- Hidróxido de sodio (Sólido)
- Luna de reloj
- Naranja de metilo
- Papel filtro (Watman 40)
- Pipetas graduadas (10 y 25 mL)
- Pro-pipetas
- Rota-vapor
- Tela de gasa
- Tubos de ensayos

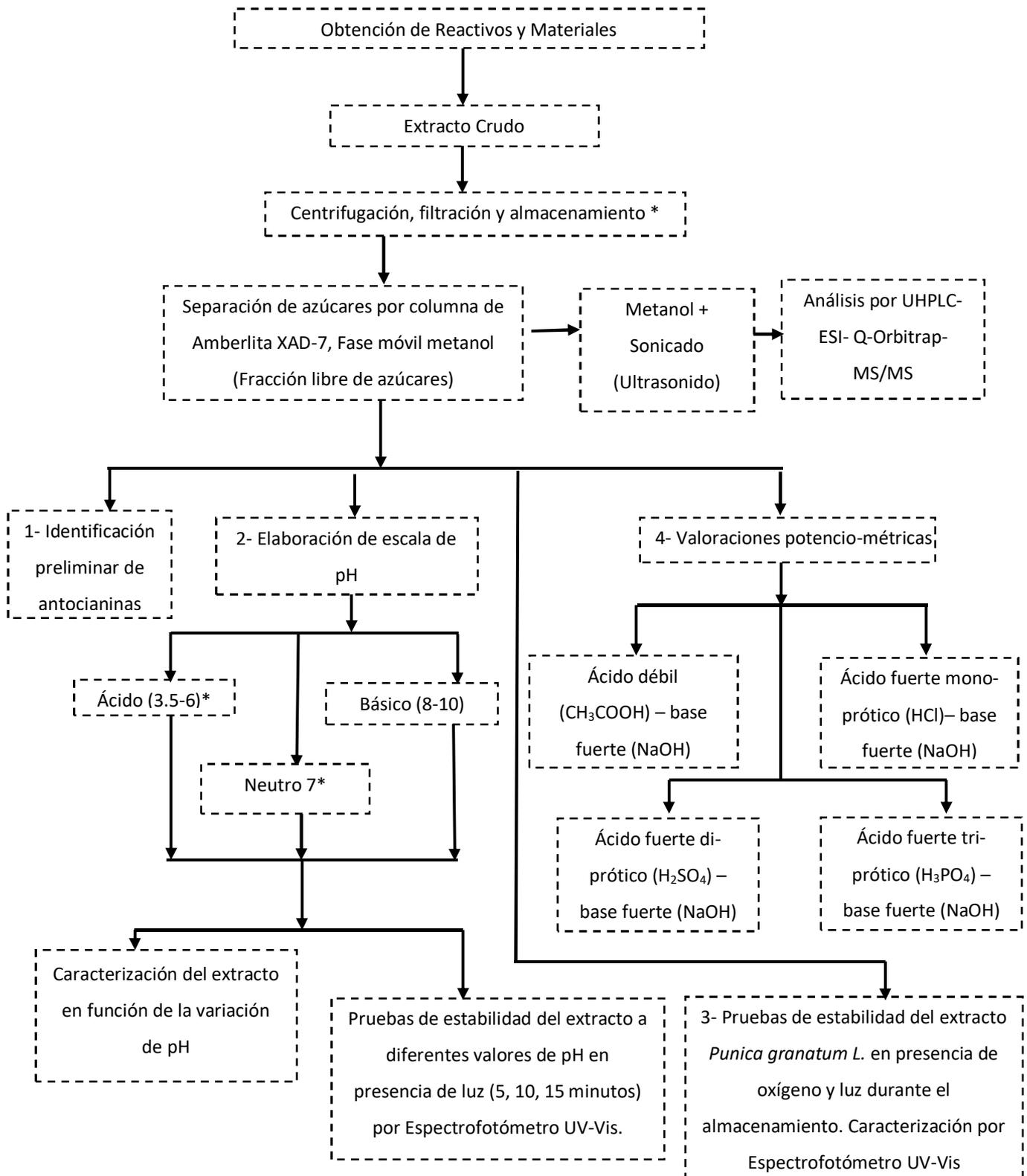
#### Equipos

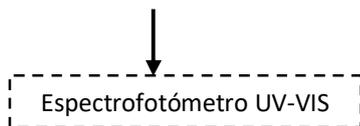
- Espectrofotómetro Uv-Vis (Spectroquant Pharo 300)

- Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electrospray ionization - Quadrupole - Orbitrap - Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS)
- pH metro. HI 2221 Calibration Check pH/ORP Meter-HANN

### 3.2 Desarrollo Experimental

La metodología de análisis para el fruto *Punica granatum L*, se resume en el siguiente esquema. -





\*Elaboración de diagrama de flujo con el aporte de Azebedo, 2011, Heras et al., 2013) y Texeira R. et al., 2014

### 3.3 Material Biológico

El fruto de *Punica granatum L.* (granada) se seleccionó a partir del color y la textura de la cáscara.



Figura 19. Fruto *Punica granatum L.*

Foto Propia

#### 3.3.1 Obtención del extracto crudo del fruto *Punica Granatum L.*

Para la obtención de los arilos de la granada, se trabajó con de 6 kg de material vegetal del cual se seleccionaron los arilos que fueron desinfectados con una solución de Hipoclorito de sodio 10 ppm, lavándose al final con abundante agua, eliminando las impurezas restantes.

La elaboración del extracto crudo de la granada se basó en la metodología de Díaz, 2014; que consistió en el método manual, para la obtención de arilos, luego fue prensado a través de una malla de nylon para obtener el extracto.



Figura 20. Obtención de los arilos del fruto *Punica granatum L.*

Foto Propia

Una vez obtenido el extracto crudo (250 mL), fue concentrado a baño maría, a una temperatura menor de 40°C. El extracto concentrado fue llevado a la centrifugadora (Janitzio T30) durante cinco minutos a 3000 rpm, posteriormente filtrándose en papel 40 (Whatman), para ser almacenados a una temperatura de -4°C hasta su análisis.

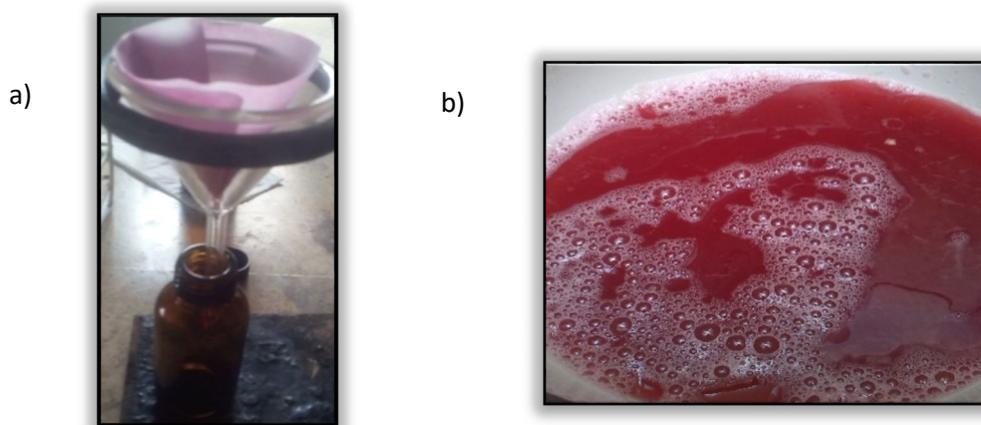


Figura 21. a) Proceso de filtración de los arilos del fruto *Punica granatum L.* (granada) b)

Extracto crudo del fruto *Punica granatum L.*

Foto Propia

El extracto almacenado, fue llevado a una columna para la separación de los azúcares, utilizando la Amberlita XAD-7 y metanol destilado como fase móvil, luego se concentró en el equipo de rotavapor a una temperatura de 40 ° C, y la fracción libre de azúcares se almacenó a -4°C.

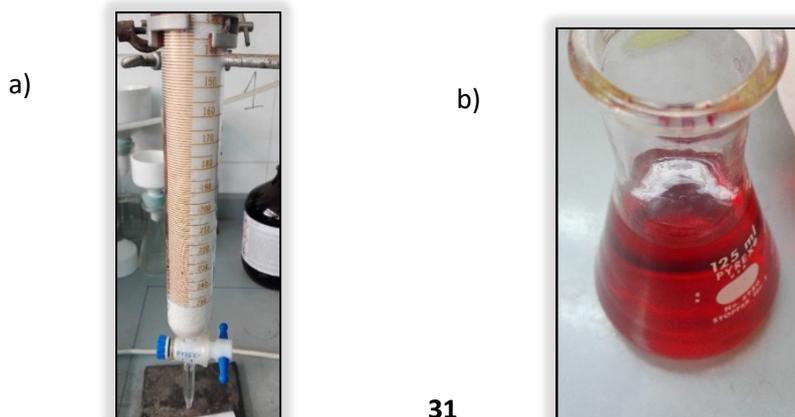


Figura 22 a) Columna de amberlita XAD -7 b) Extracto de *Punica granatum L.*, recogido de la columna amberlita XAD-7

Foto Propia

### 3.4 Identificación preliminar de antocianinas

Para la identificación de la presencia de las antocianinas, se realizó una prueba preliminar, para evaluar el cambio de color del extracto en diferentes medios ácido fuerte – base fuerte.

#### a) Medio ácido

En un tubo de ensayo se colocó 5 mL de HCl 0.1 N, pH = 0.15 y se añadió 1 mL del extracto de *Punica granatum L.* (Granada).

#### b) Medio básico

En un tubo de ensayo se colocó 5 mL de NaOH 0.1 N, pH= 12.84 y se añadió 1 mL del extracto de *Punica granatum L.* (Granada).

### 3.5 Análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS

La fracción libre de azúcares del extracto *Punica granatum L.*, fue disuelta en metanol (HPLC), llevado al equipo de Ultra Sonido y finalmente filtrada, para posteriormente ser analizada en el equipo Ultra High Performance Liquid Chromatography- Electrospray ionization – Quadrupole -Orbitrap - Mass Spectrometry (UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS), de Fase reversa C-18, acoplado a un Espectrofotómetro Masas (THERMO Q-Exactive) con precursor de cuadrupolo, operado en modo de Electro-Spray con ionización positiva (ES<sup>+</sup>).

La separación cromatográfica fue en gradiente con las siguientes condiciones: caudal de la fase móvil - 1mL/min y el tiempo de carrera para el extracto del fruto *Punica granatum L.* fue de 47 min, siendo el volumen de la muestra inyectada de 10 µL.

La composición de la fase móvil (agua y acetonitrilo) fue en gradiente y se muestra en la Tabla 1.

Tabla 2: Fase móvil para el análisis del extracto del fruto *Punica granatum L.* en UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS.

**COMPOSICIÓN VOLUMÉTRICA DE FASE MÓVIL (*PUNICA GRANATUM L.*)**

	Retención(min)	Flujo (mL/min)	Agua (%)	Acetonitrilo(%)
<b>1</b>	-12	1	95%	5%
<b>2</b>	5	1	95%	5%
<b>3</b>	10	1	70%	30%
<b>4</b>	15	1	70%	30%
<b>5</b>	20	1	30%	70%
<b>6</b>	25	1	30%	70%
<b>7</b>	35	1	95%	5%

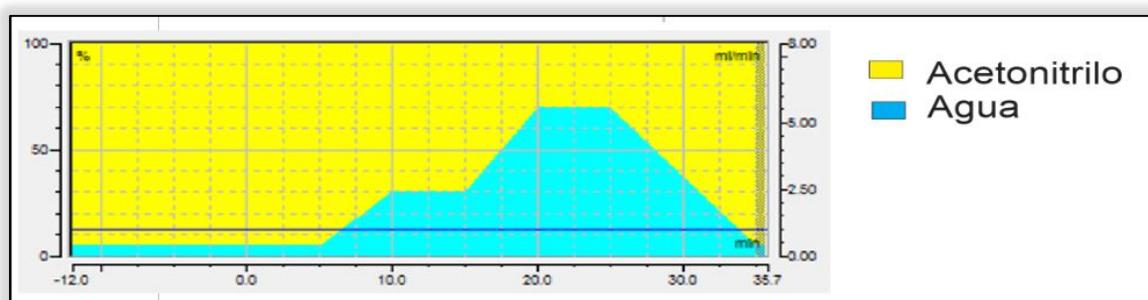


Figura 23. Multi-Step de la fase móvil del UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS-MS para el fruto *Punica granatum L.*

Fuente: Datos obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales – Universidad de Antofagasta

### 3.6 Elaboración de Escala de pH

Se prepararon buffers de ácido acético 0.2M - acetato de sodio 0.2M entre 3.5 - 5.5 unidades de pH, buffers de fosfato de sodio mono-básico 0,2M – fosfato de sodio di-básico 0.2M entre 6 - 8 unidades de pH y buffers de ácido bórico 0.1M – cloruro de potasio 0.1M – hidróxido de sodio 0.1M entre 9 – 10 unidades de pH, según se observa en la Tabla N°2 se transfirió 5 mL de cada buffer a tubos de ensayo rotulados, se adicionó 0.5 mL del extracto *Punica*

*granatum L.*, se homogenizó y dejó en reposo por un lapso de 10 segundos, observándose el viraje de color en cada uno de los tubos.

Tabla 3: Preparación de la escala de pH con soluciones amortiguadoras

Ácido Acético 0,2 M – Acetato de Sodio 0,2 M				
	pH (Teórico)	Agua	Ácido Acético 0,2 M	Acetato de Sodio 0,2 M
1	3,5	5 mL	4.63 mL	0.37 mL
2	4	5 mL	4.1 mL	0.9 mL
3	4,5	5 mL	2.55 mL	2.45 mL
4	5	5 mL	1.48 mL	3.52 mL
5	5,5	5 mL	0.48 mL	4.52 mL
Fosfato de Sodio Di-básico 0,2M - Fosfato de Sódico Mono-básico 0,2 M				
	pH (Teórico)	Agua	Fosfato de Sódico Mono-básico	Fosfato de Sodio Di- básico
6	6	5 mL	4.38 mL	0.61 mL
7	6,5	5 mL	3.42 mL	1.57 mL
8	7	5 mL	1.95 mL	3.05 mL
9	7,5	5 mL	0.8 mL	4.2 mL
10	8	5 mL	0.26 mL	4.74 mL
Ácido Bórico 0,1 M - Cloruro de Potasio 0,1 M - Hidróxido de Sodio 0,1 M				
	pH (Teórico)	Ácido Bórico - Cloruro de Potasio	Hidróxido de Sodio	Agua
11	9	5 mL	2.08 mL	2.92 mL
12	10	5 mL	4.37 mL	0.63 mL

### 3.6.1 Análisis por espectrofotometría UV- Vis de las soluciones en el rango de 3.5 a 10 unidades de pH.

En el Espectrofotómetro UV-Vis (Spectroquant Pharo 300) se analizó el desplazamiento de la longitud de onda en función de la variación de pH de las soluciones buffers anteriormente discutidas

### 3.6.2 Estabilidad del extracto *Punica granatum L.* como indicador en presencia de luz

La estabilidad del extracto *Punica granatum L.*, a diferentes pH (3.5 – 10) en presencia de la luz, se evaluó a los 5, 10 y 15 minutos, en el Espectrofotómetro UV-Vis. (Spectroquant Pharo 300)

### **3.7 Valoraciones potenciométricas utilizando el extracto *Punica granatum L.* como indicador de pH.**

El extracto de *Punica granatum L.*, libre de azúcares se evaluó como indicador de pH natural en las siguientes valoraciones potenciométricas.

#### **3.7.1 Ácido fuerte mono-prótico (HCl) y base fuerte (NaOH)**

Se realizó la valoración potenciométrica de la neutralización del HCl con NaOH utilizando como indicador fenolftaleína y también el extracto libre de azúcares del fruto *Punica granatum L.* como se describe.

- Se añadió 30 mL de ácido clorhídrico en un matraz erlenmeyer de 250 mL; en una bureta se añadió 50 mL de hidróxido de sodio. El viraje de color se observó al adicionar 3 gotas del indicador (fenolftaleína o extracto libre de azúcares del fruto *Punica granatum L.*)

#### **3.7.2 Ácido débil (CH<sub>3</sub>COOH) y base fuerte (NaOH)**

Se realizó la valoración potenciométrica de un ácido débil (CH<sub>3</sub>COOH) con una base fuerte (NaOH).

- Se añadió 30 mL de ácido acético en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y 50 mL de hidróxido de sodio en una bureta de 50 mL. El viraje de color se observó al adicionar 3 gotas del indicador con una agitación constante.

\* Como indicador el extracto de *Punica granatum L.*

#### **3.7.3 Ácido fuerte diprótico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y base fuerte (NaOH)**

La valoración potenciométrica de la neutralización de un ácido fuerte diprótico y una base fuerte se realizó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaOH.

- Se añadió 30 mL de ácido sulfúrico en un matraz erlenmeyer de 250 mL; 50 mL de hidróxido de sodio en una buret. El viraje de color se observó al adicionar 3 gotas del extracto *Punica granatum L.* con una agitación constante durante el proceso.

#### **3.7.4 Ácido fuerte triprótico ( $H_3PO_4$ ) y base fuerte (NaOH)**

La valoración potenciométrica de la neutralización de un ácido fuerte triprótico y una base fuerte se realizó con  $H_3PO_4$  y NaOH.

- Se añadió 30 mL de ácido fosfórico en un matraz erlenmeyer de 250 mL; en una bureta se añadió 50 mL de hidróxido de sodio 0.095M. El viraje de color se observó al adicionar 3 gotas del extracto *Punica granatum L.* con una agitación constante durante el proceso.

#### **3.8 Determinación del $pK_{\text{indicador}}$**

Para la determinación del  $pK_{\text{indicador}}$  se realizó un análisis en el espectrofotómetro UV-Vis, en la escala de buffer 6.5 a 8.5 de pH con aproximadamente 10 gotas de extracto libre de azúcar.

#### **3.9 Evaluación del extracto *Punica granatu L.* en presencia de oxígeno.**

La estabilidad en presencia de oxígeno del extracto libre de azúcares, se analizó durante un periodo de 7 días, siendo almacenada una fracción de 10 mL en un frasco de vidrio ámbar y otra fracción de 10 mL en un frasco de vidrio incoloro - transparente, para luego ser evaluados en el Espectrofotómetro UV-Vis.

##### **3.9.1 Prueba estadística T-Student para calcular la significancia para los datos obtenidos**

La prueba t-Student permite comparar muestras,  $N \leq 30$  y/o establece la diferencia entre las medias de las muestras (Sánchez R. 2015).

Existen dos versiones de la prueba t-Student: una que supone que las varianzas muestrales son iguales y otra versión que no asume esto último. Para decidir si se puede suponer o no la igualdad de varianza en las dos muestras, se debe realizar previamente la prueba F-Snedecor de comparación de dos varianzas.

## Capítulo 4: Resultados

### 4.1 Identificación preliminar de antocianinas

La fracción libre de azúcar de *Punica granatum L.* presentó dos cambios colorimétricos, el primero en el medio ácido - HCl (rojo) y segundo en el medio básico - NaOH (amarillo), como se observa en la Fig 25.

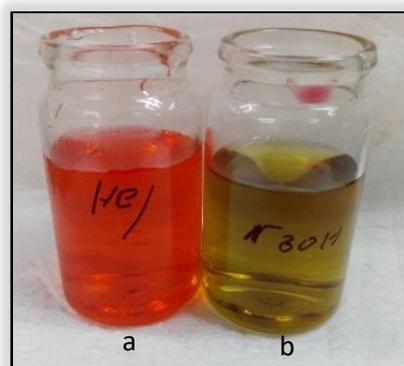


Figura 24. Ácido Clorhídrico 0.1N (a) Extracto de *Punica granatum L.* en medio ácido (color rojo) (b) Extracto de *Punica granatum L.* en medio básico. (color amarillo)

Foto Propia

### 4.2. Análisis por UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS

El análisis en el equipo UHPLC-ESI-Q-Orbitrap-MS/MS proporcionó el peso molecular de las estructuras presentes en el extracto del fruto *Punica granatum L.*, debido a que se encuentran en forma ionizada en la solución.

A partir del fraccionamiento MS/MS, se obtuvieron los pesos moleculares de las antocianidinas y algunos residuos de azúcares presentes o grupos acilos, que pueda obtener el extracto.

Tabla 4: Compuestos antocianidicos, obtenidos del análisis en el equipo UHPLC-ESI-Q-ORBITRAP-MS/MS

Nombre De Compuesto	Peso Del Fragmento (m/z)	Fórmula Condensada	Tiempo Retención (Min)
Cianidina - Diglúcósida	611.18 m/z	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub> <sup>+</sup>	19.1 min
Cianidina – Monoglucósida	433.11 m/z	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	20.2 min
Pelargonidina – Diglúcósida	595.18 m/z	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	19.5 min
Cianidin	<b>pH Teórico</b>	<b>pH Experimental</b>	
	3.5	3.49	19.1 min
Pelargonic	4	3.85	19.5 min
	4.5	4.58	
	5	5.02	
	5.5	5.6	
	6	6.05	

En los anexos 1, 2 y 3 se observan los cromatogramas del UHPLC y espectros MS y MS/MS de las antocianinas, presentes en el extracto del fruto *Punica granatum L.*

### 4.3 Elaboración de escala de pH

Tabla 5: Escala de pH teórico – experimental para el análisis colorimétrico del extracto *Punica granatum L.*

6.5	6.60
7	7.13
7.5	7.66
8	7.92
9	9.04
10	10.01

**4.3.1 Análisis por Espectrofotometría UV-Vis de las soluciones del indicador de *Punica granatum L.* en el rango 3.5 a 10 unidades de pH**

pH	Longitud De Onda (nm)	Absorbancia
----	--------------------------	-------------

En la de pH con el del fruto	<b>3.5</b>	512 nm	0.15	escala (3.5 -10) extracto <i>Punica</i>
	<b>4</b>	511 nm	0.141	
	<b>4.5</b>	514 nm	0.081	
	<b>5</b>	514 nm	0.094	
	<b>5.5</b>	523 nm	0.183	
	<b>6</b>	531 nm	0.455	
	<b>6.5</b>	539 nm	0.461	
	<b>7</b>	559 nm	0.473	
	<b>7.5</b>	582 nm	0.55	
	<b>8</b>	585 nm	0.578	
	<b>9</b>	555 nm	0.515	
<b>10</b>	556 nm	0.305		

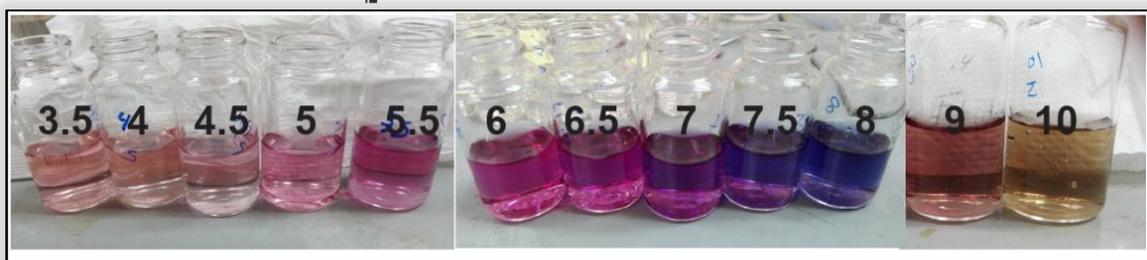


Figura 25. Escala de pH (3.5 – 10), con el extracto del fruto *Punica granatum L.*

Fuente: Elaboración propia

Tabla 6: Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10), con el extracto del fruto *Punica granatum L.*,

*granatum L.*, se distingue fácilmente la variación del valor presente en el rango 3.5 – 5 el cual presenta un rosado claro, mientras que al aumento de pH 5.5 – 7 se distingue un color morado claro, un tercer color se denota en el rango de pH 7.5 - 8 presentando una tonalidad violeta-azulado y para finalizar en el medio básico, pH 9-10 se observa la degradación de la antocianina por el color amarillo oscuro.

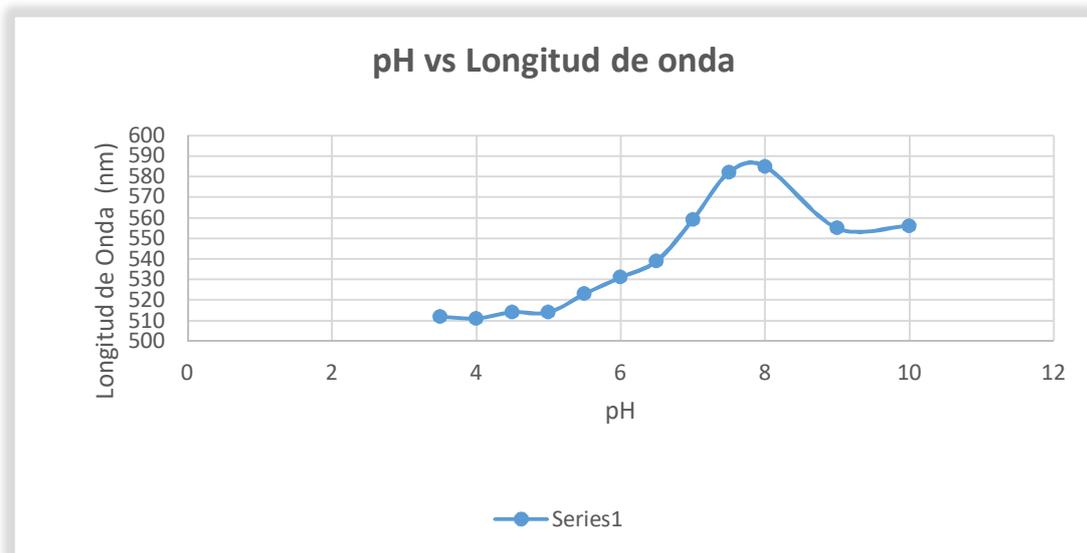


Figura 26. Variación de la longitud de onda en función de la variación de pH.

Fuente: Elaboración propia

#### 4.3.2 Estabilidad del extracto *Punica granatum L.* en presencia de la luz.

La escala de pH (3.5 - 10) fue analizada en el Espectrofotómetro UV-Vis (Spectroquant Pharo 300), después de cada lapso de tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos) para comparar y evaluar el efecto hipercrómico de la absorbancia.



Figura 27. Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto *Punica granatum L.*, después de 5 minutos.

Foto Propia

Tabla 7. Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10), después de 5 minutos de haber añadido el extracto del fruto *Punica granatum L.*

<b>pH</b>	<b>Longitud de Onda (nm)</b>	<b>Absorbancia</b>
3.5	515 nm	0.169
4	516 nm	0.101
4.5	515 nm	0.068
5	522 nm	0.067
5.5	522 nm	0.068
6	527 nm	0.134
6.5	541 nm	0.26
7	565 nm	0.382
7.5	583 nm	0.478
8	587 nm	0.645
9	557 nm	0.369
10	561 nm	0.277

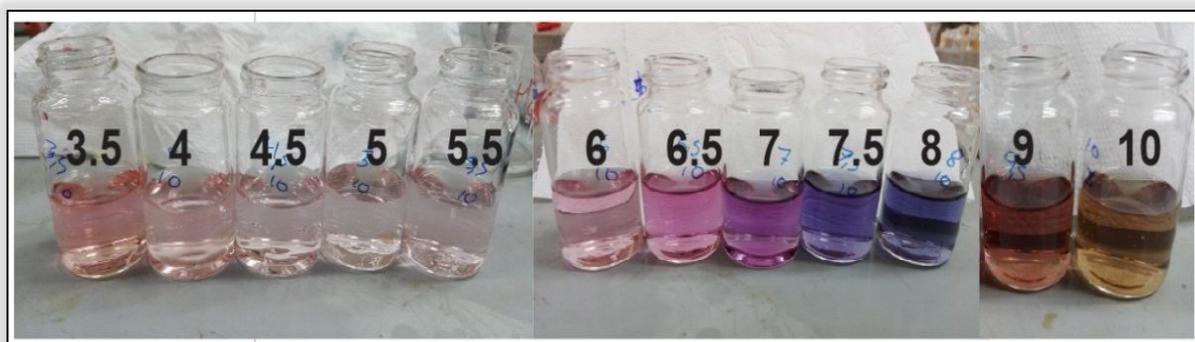


Figura 28. Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto *Punica granatum L.*, después de 10 minutos.

Foto Propia

Tabla 8: Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10.0), después de 10 minutos de haber añadido el extracto del fruto *Punica granatum L.*

<b>pH</b>	<b>Longitud de Onda (nm)</b>	<b>Absorbancia</b>
3.5	514 nm	0.167
4	515 nm	0.091
4.5	516 nm	0.055
5	518 nm	0.067
5.5	523 nm	0.057
6	526 nm	0.101
6.5	541 nm	0.202
7	568 nm	0.282
7.5	584 nm	0.415
8	584 nm	0.45
9	557 nm	0.355
10	562 nm	0.267

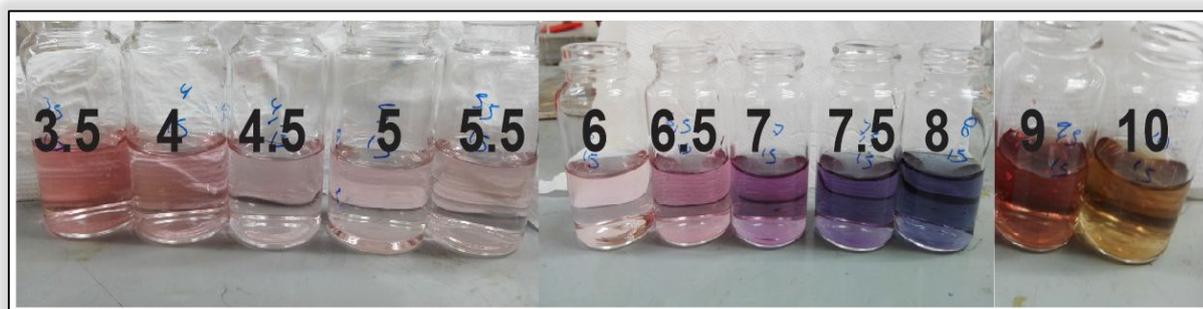


Figura 29. Escala de buffer de pH, con el extracto del fruto *Punica granatum L.*, después de quince minutos.

Foto Propia

Tabla 9: Absorbancia de la escala de pH (3.5 – 10.0), después de 15 minutos de haber añadido el extracto del fruto *Punica granatum L.*

<b>pH</b>	<b>Longitud de Onda (nm)</b>	<b>Absorbancia</b>
3.5	513 nm	0.16
4	511 nm	0.06
4.5	515 nm	0.055
5	521 nm	0.054
5.5	520 nm	0.05
6	527 nm	0.109
6.5	539 nm	0.164
7	563 nm	0.277
7.5	583 nm	0.384
8	585 nm	0.476
9	557 nm	0.333
10	565 nm	0.235

A continuación se muestran la estabilidad en cada escala de pH, según el tiempo de expuesto a luz.

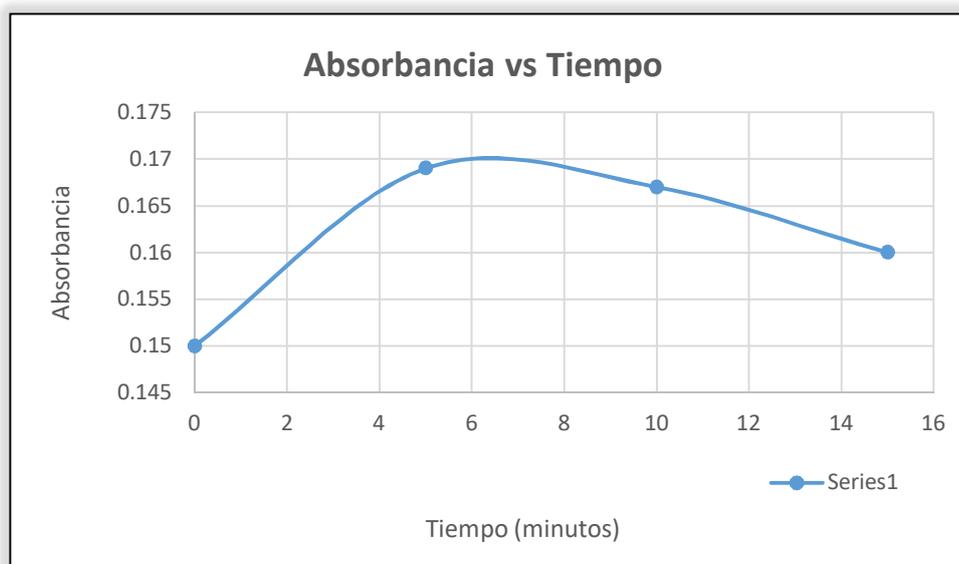


Figura 30. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 3.5.

Fuente: Elaboración propia

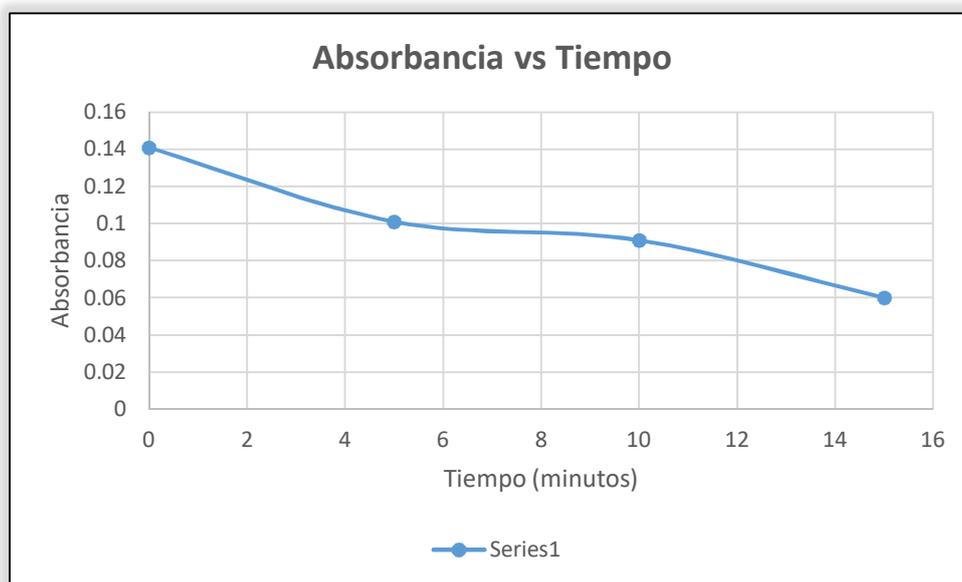


Figura 31. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 4.0.

Fuente: Elaboración propia

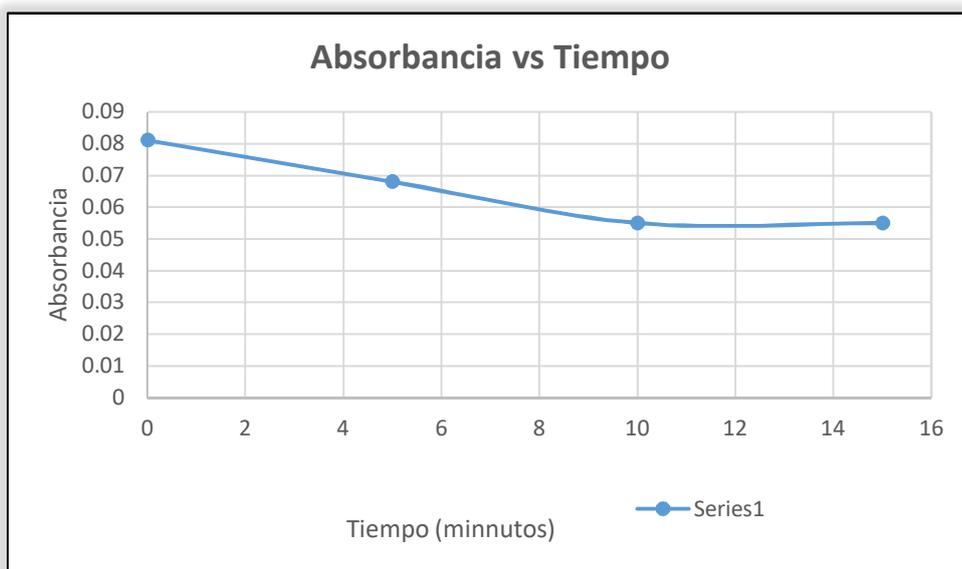


Figura 32. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 4.5.

Fuente: Elaboración propia

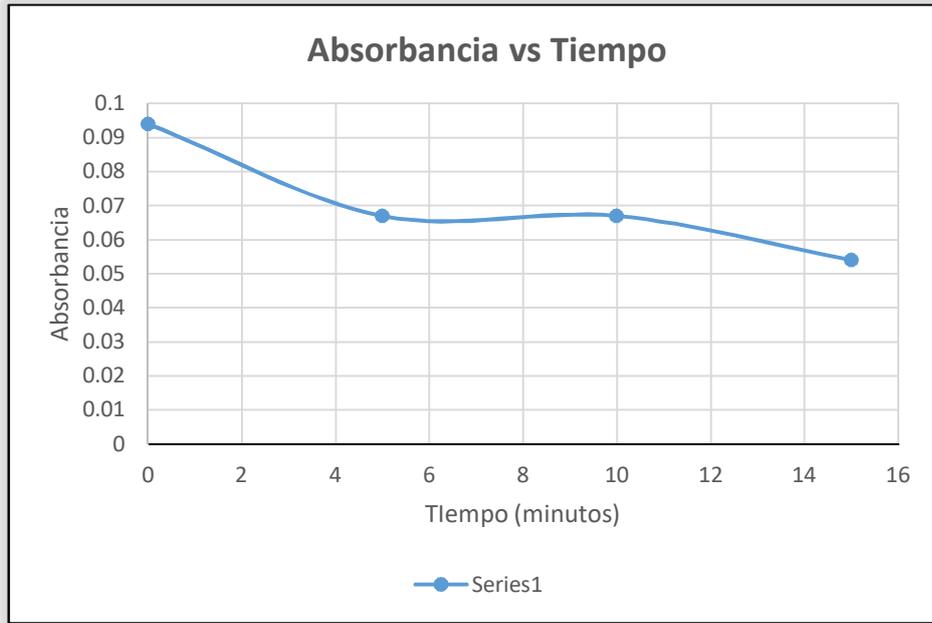


Figura 33. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 5.0

Fuente: Elaboración propia

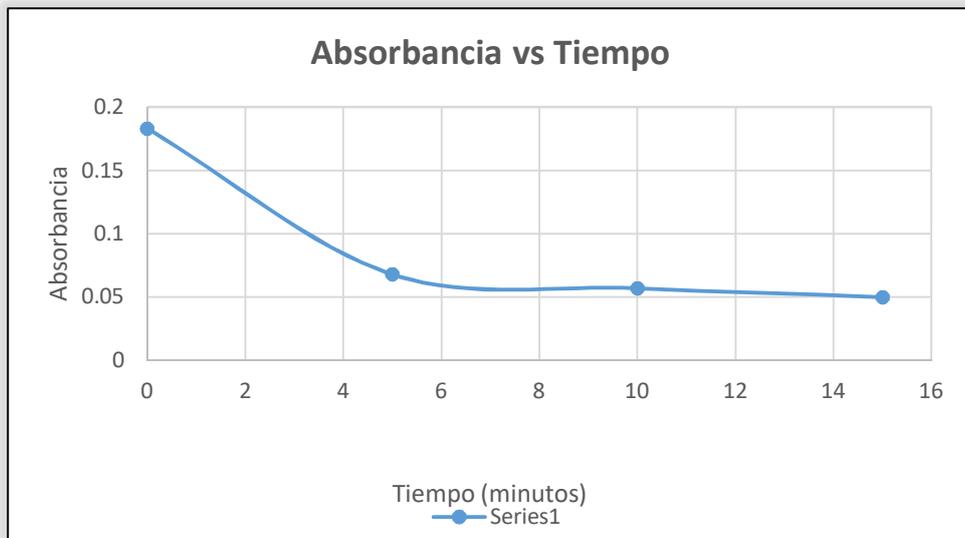


Figura 34. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 5.5.

Fuente: Elaboración propia

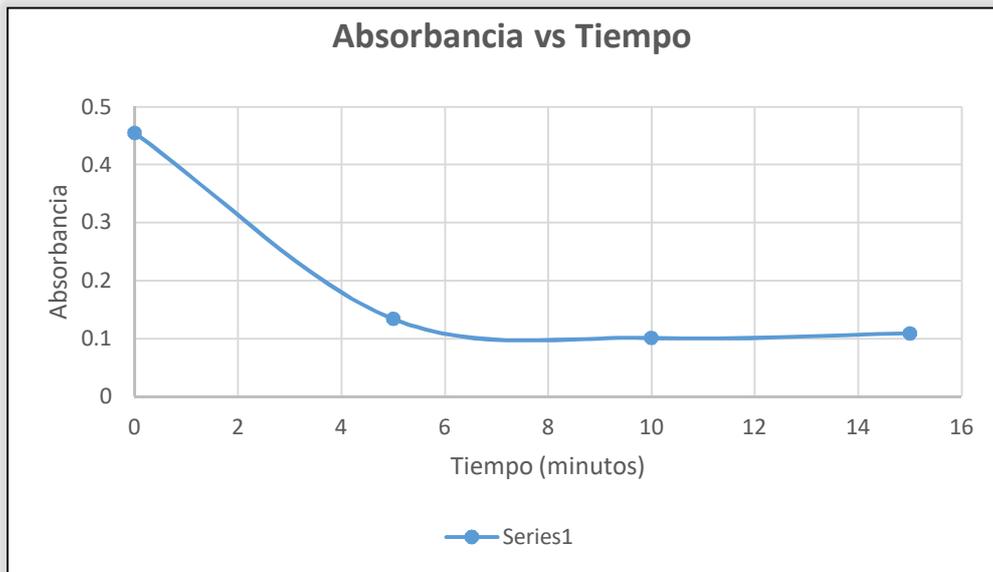


Figura 35. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 6.0

Fuente: Elaboración propia

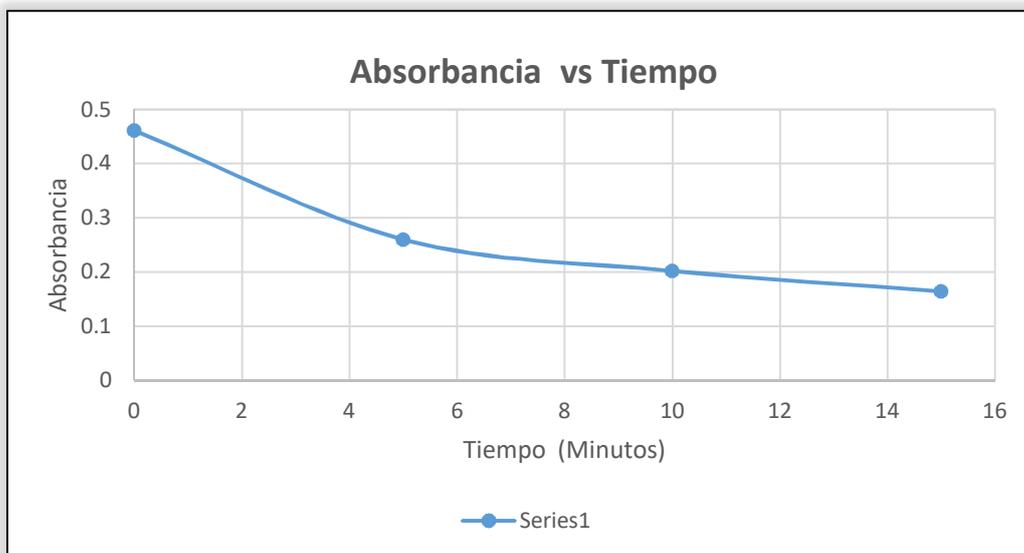


Figura 36. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 6.5

Fuente: Elaboración propia

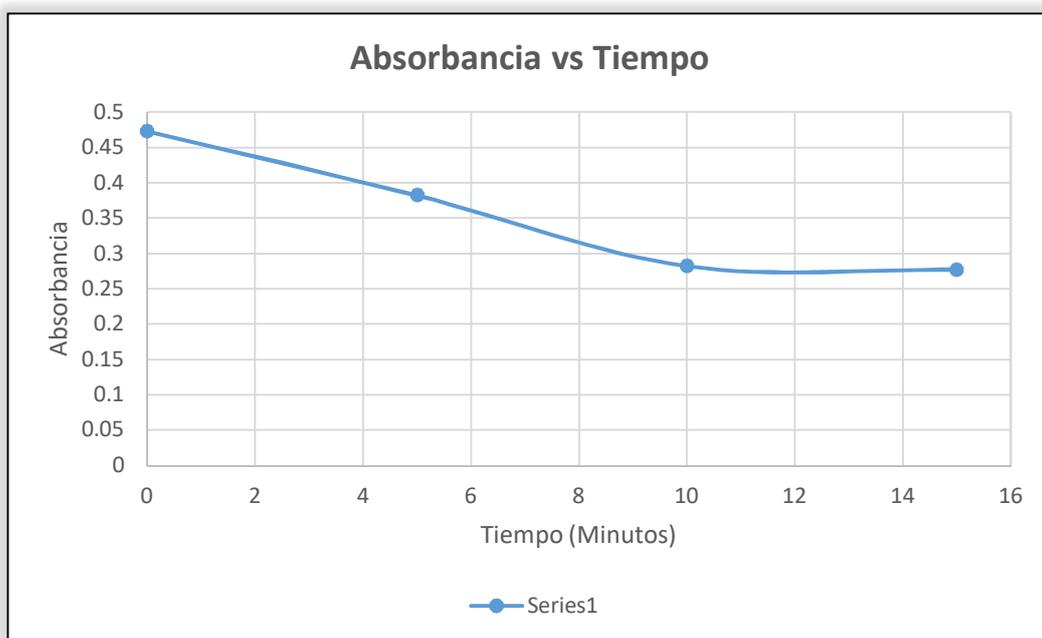


Figura 37. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 7.0

Fuente: Elaboración propia

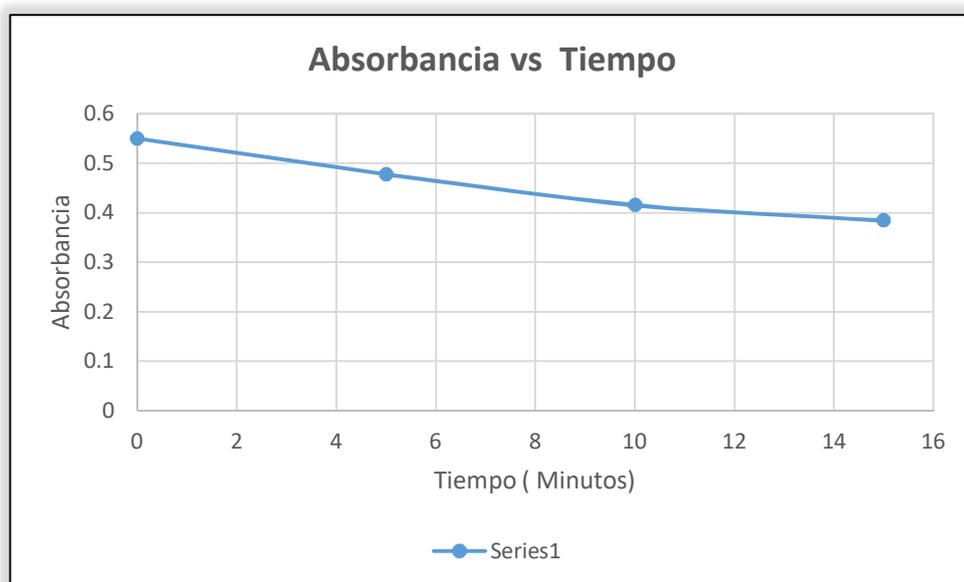


Figura 38. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 7.5

Fuente: Elaboración propia

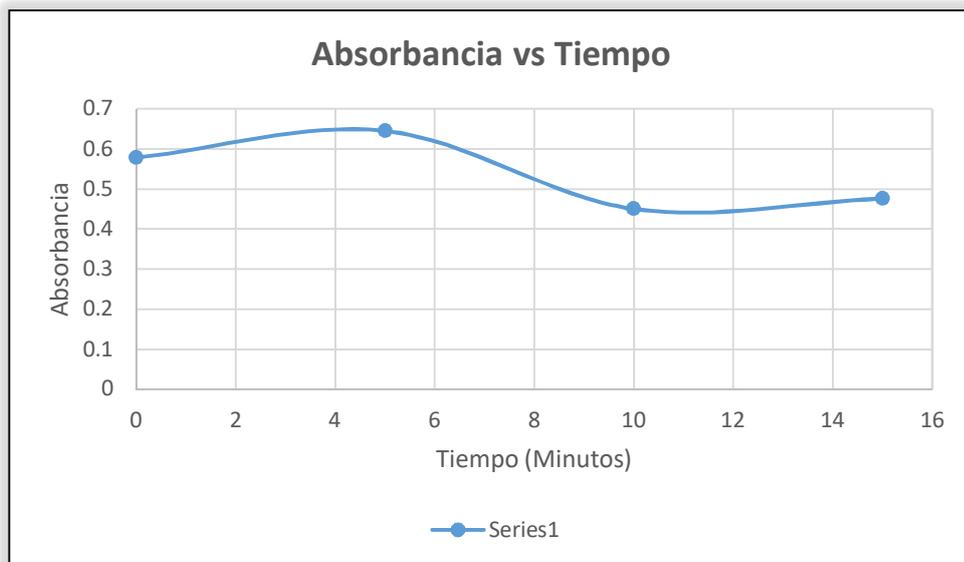


Figura 39. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 8.0

Fuente: Elaboración propia

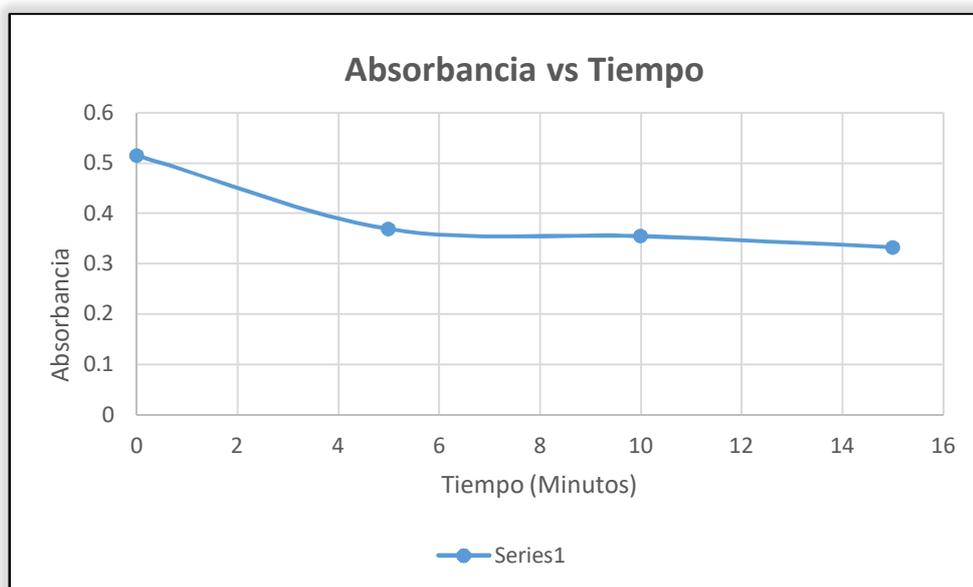


Figura 40. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 9

Fuente: Elaboración propia

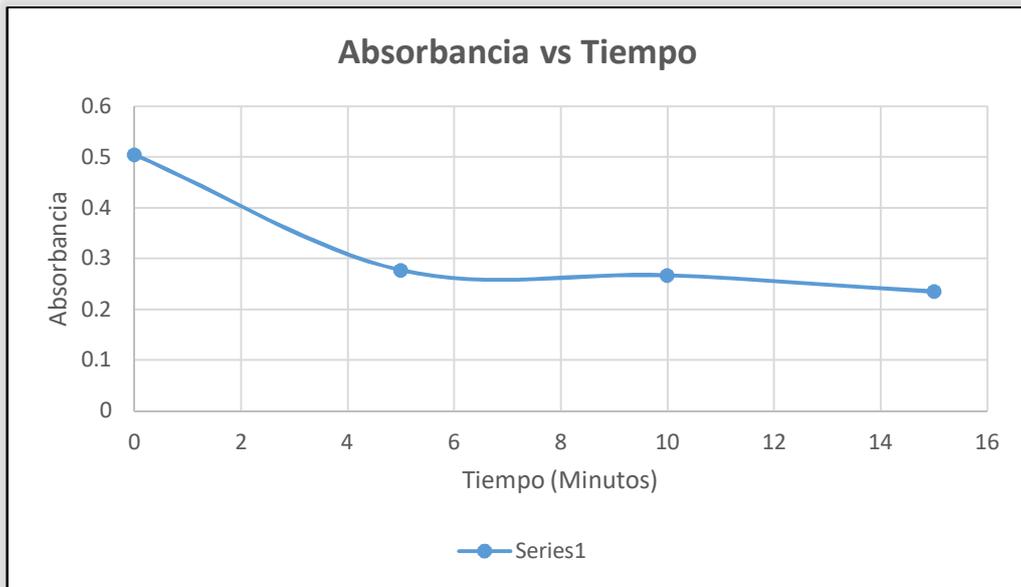


Figura 41. Absorbancia en función de la variación del tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos), a pH 10

Fuente: Elaboración propia

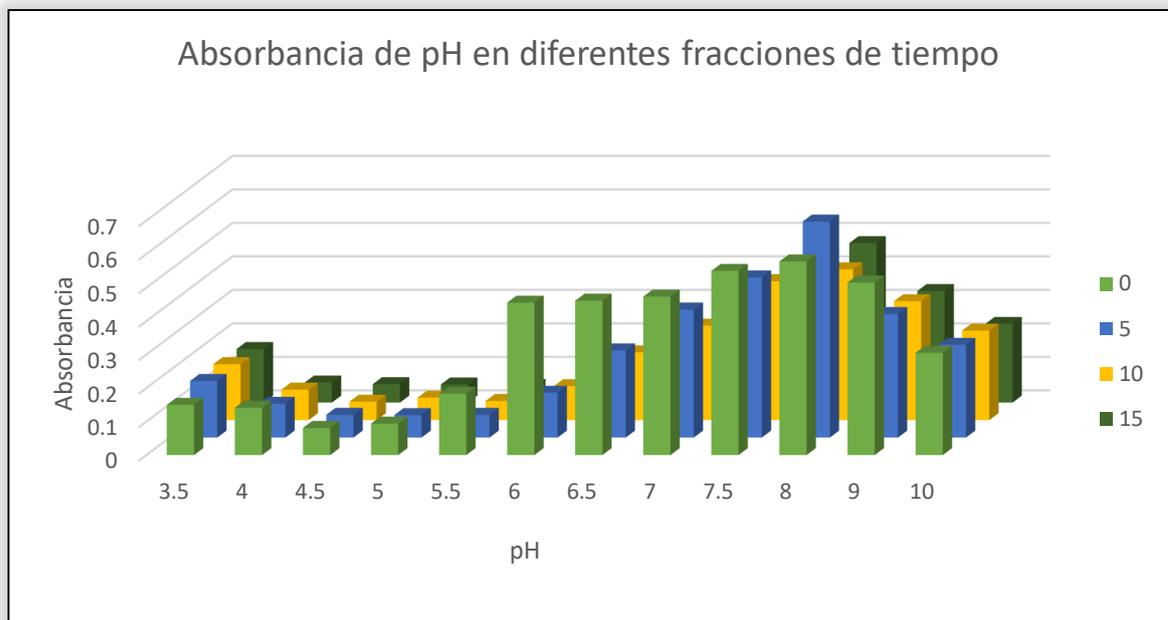


Figura 42. Absorbancia de diferentes valores de la escala de pH, en diferentes fracciones de tiempo (0, 5, 10 y 15 minutos)

Fuente: Elaboración propia

#### 4.4 Uso del extracto *Punica granatum L* como indicador de pH en valoraciones potenciométricas.

Reacciones de neutralización de carácter ácido-base, mediante el método potenciométrico.

##### 4.4.1. Ácido fuerte monoprotónico (HCl) – base fuerte (NaOH)

###### 4.4.1.1. Utilizando como indicador fenolftaleína.

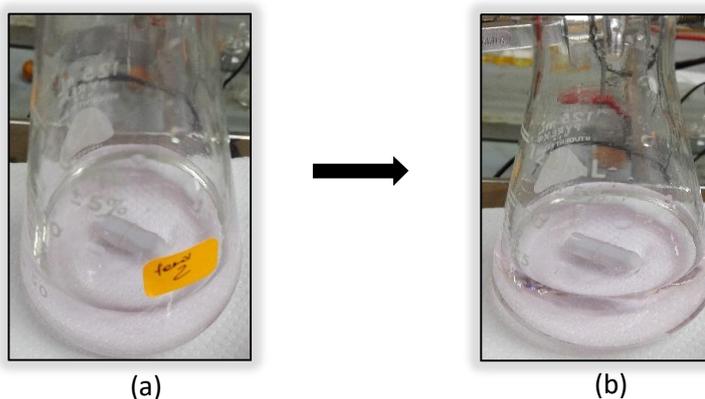
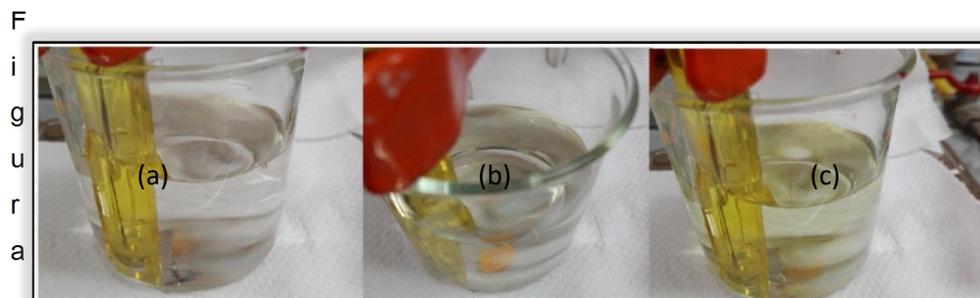


Figura 43. Titulación de Ácido clorhídrico vs. Hidróxido de sodio indicador fenolftaleína. Antes de la titulación (a) – Punto final (b).

Foto Propia

###### 4.4.1.2. Utilizando como indicador extracto de *Punica granatum L*.

En la titulación HCl vs NaOH, inicialmente presenta un color rojo escarlata, que al llegar al punto final a neutro (Punto verde) se observa un color amarillo, con un volumen de gasto de 30mL a un pH 8.27, adicional a ellos los obtenidos muestran un punto de equivalencia a 29,7 mL (punto rojo). (Figura 46)



4. Variación de color en la titulación de ácido clorhídrico (HCl) e Hidróxido de Sodio (NaOH) con el extracto *Punica granatum L* como indicador., pH = 6,43 (a); 7,12 (b) y 8,27 (c).

Tabla 10: Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido fuerte monoprotico (HCl) vs base fuerte (NaOH) utilizando como indicador extracto de *Punica granatum L.*

<b>Volumen NaOH 0.095 N (mL)</b>	<b>pH</b>	<b>dpH/dV</b>	<b>d<sup>2</sup>pH/d<sup>2</sup>V</b>
<b>0</b>	0.9	0	0
<b>5</b>	1.05	0.03	0.006
<b>10</b>	1.24	0.03	0.0016
<b>15</b>	1.47	0.04	-0.03
<b>16</b>	1.53	0.06	0.02
<b>17</b>	1.57	0.04	-0.02
<b>18</b>	1.63	0.06	0.02
<b>19</b>	1.7	0.07	0.01
<b>20</b>	1.77	0.07	0
<b>21</b>	1.88	0.11	0.04
<b>22</b>	2	0.12	0.01
<b>23</b>	2.17	0.17	0.05
<b>23.5</b>	2.27	0.2	0.06
<b>24</b>	2.39	0.24	0.08
<b>24.5</b>	2.52	0.26	0.04
<b>25</b>	2.65	0.26	0
<b>25.5</b>	2.84	0.38	0.24
<b>26</b>	3.05	0.42	0.08
<b>26.5</b>	3.26	0.42	0
<b>27</b>	3.48	0.44	0.04
<b>27.5</b>	3.73	0.5	0.12
<b>28</b>	3.96	0.46	-0.08
<b>28.5</b>	4.39	0.86	0.8
<b>28.7</b>	4.61	1.1	1.2
<b>29</b>	5.04	1.43	1.1
<b>29.2</b>	5.33	1.45	0.083
<b>29.4</b>	5.82	2.45	5
<b>29.6</b>	6.63	4.05	8
<b>29.8</b>	7.12	2.45	-8
<b>30</b>	8.27	6.15	18.5
<b>30.5</b>	9.89	3.08	-6.14
<b>31</b>	10.5	1.22	-3.72

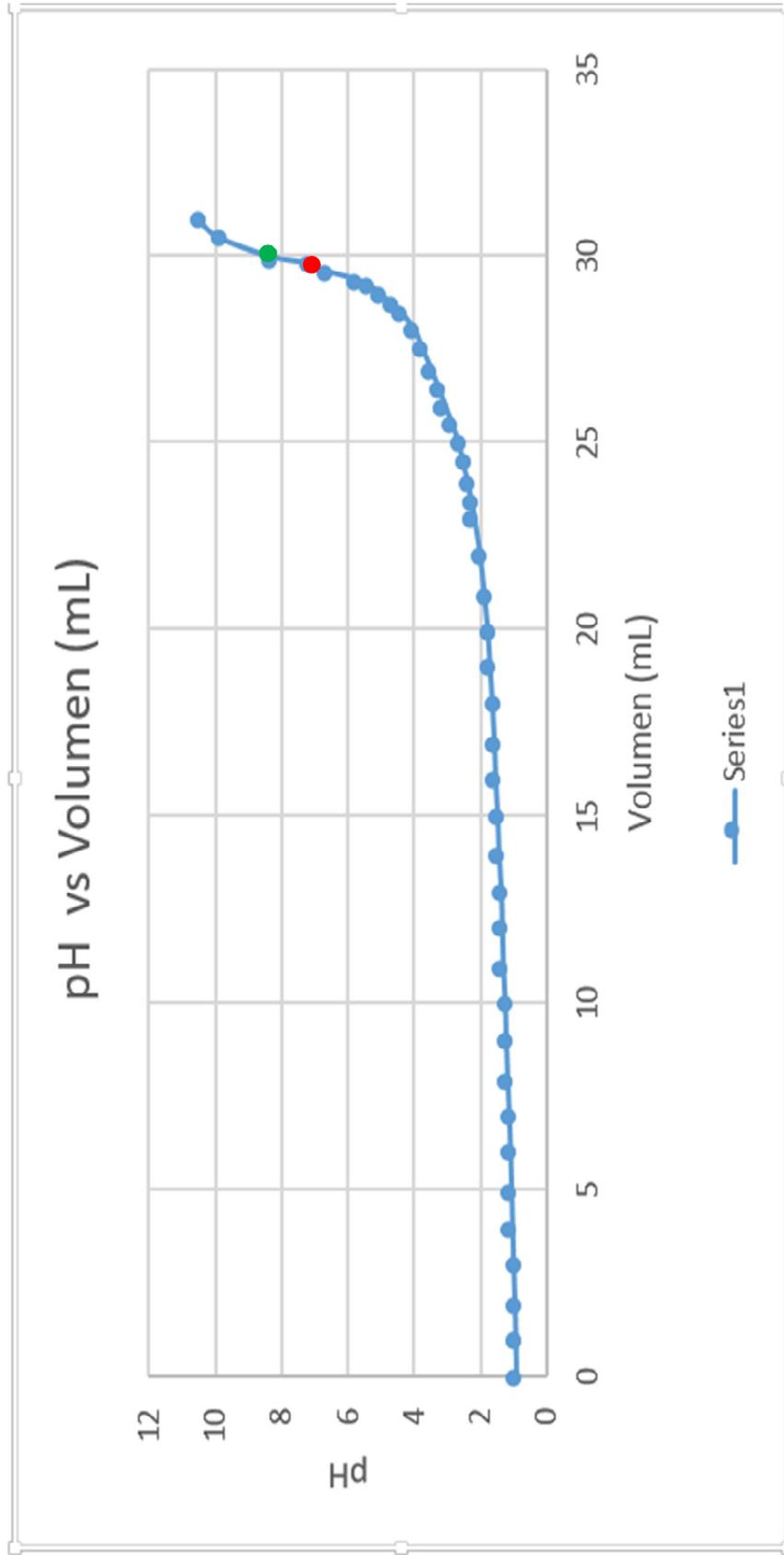


Figura 45. Curva de titulación ácido fuerte monoprotónico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde).

Fuente: Elaboración propia

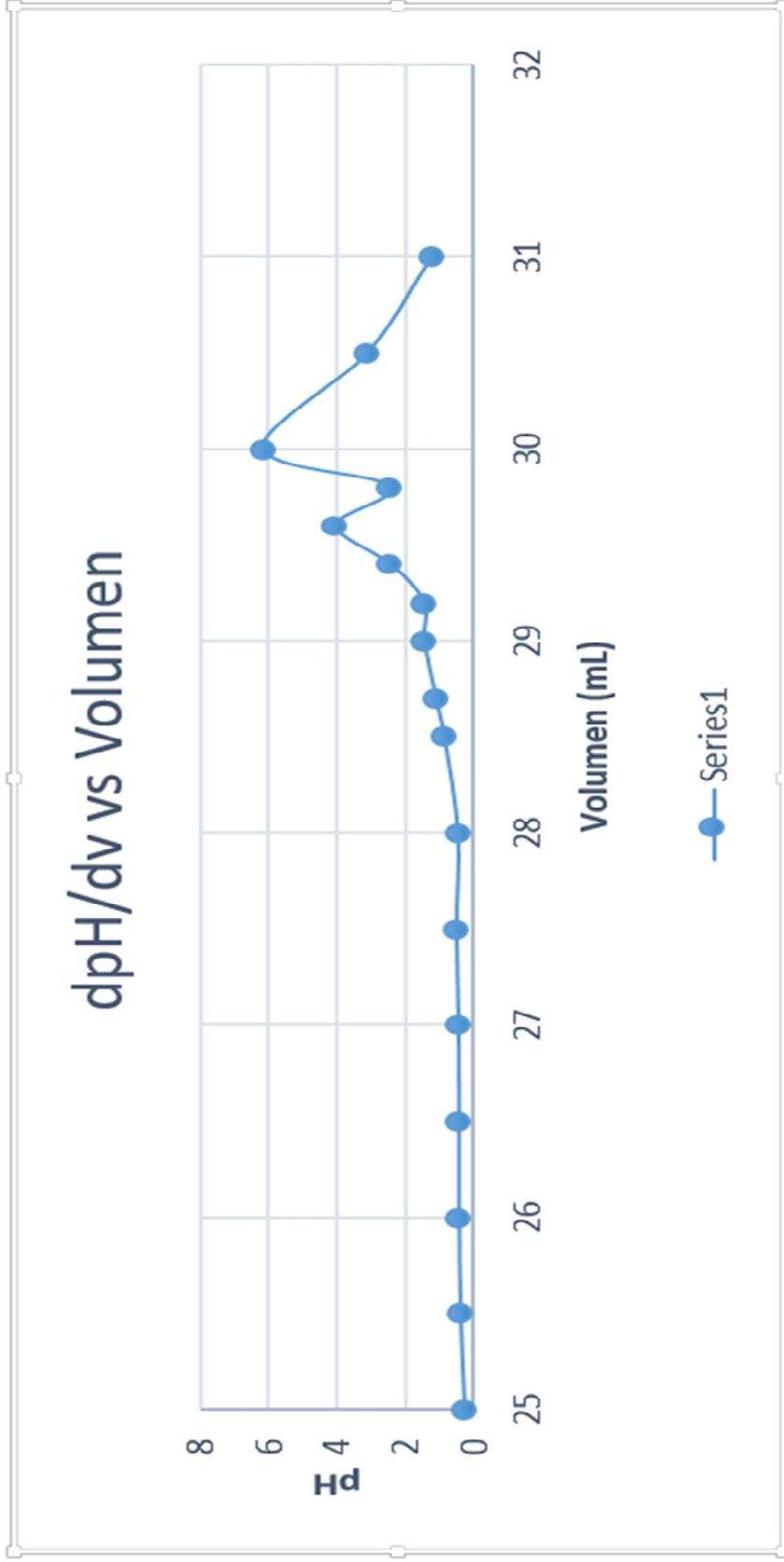


Figura 46. Curva de la primera derivada de ácido fuerte monoprotónico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde).

Fuente: Elaboración propia

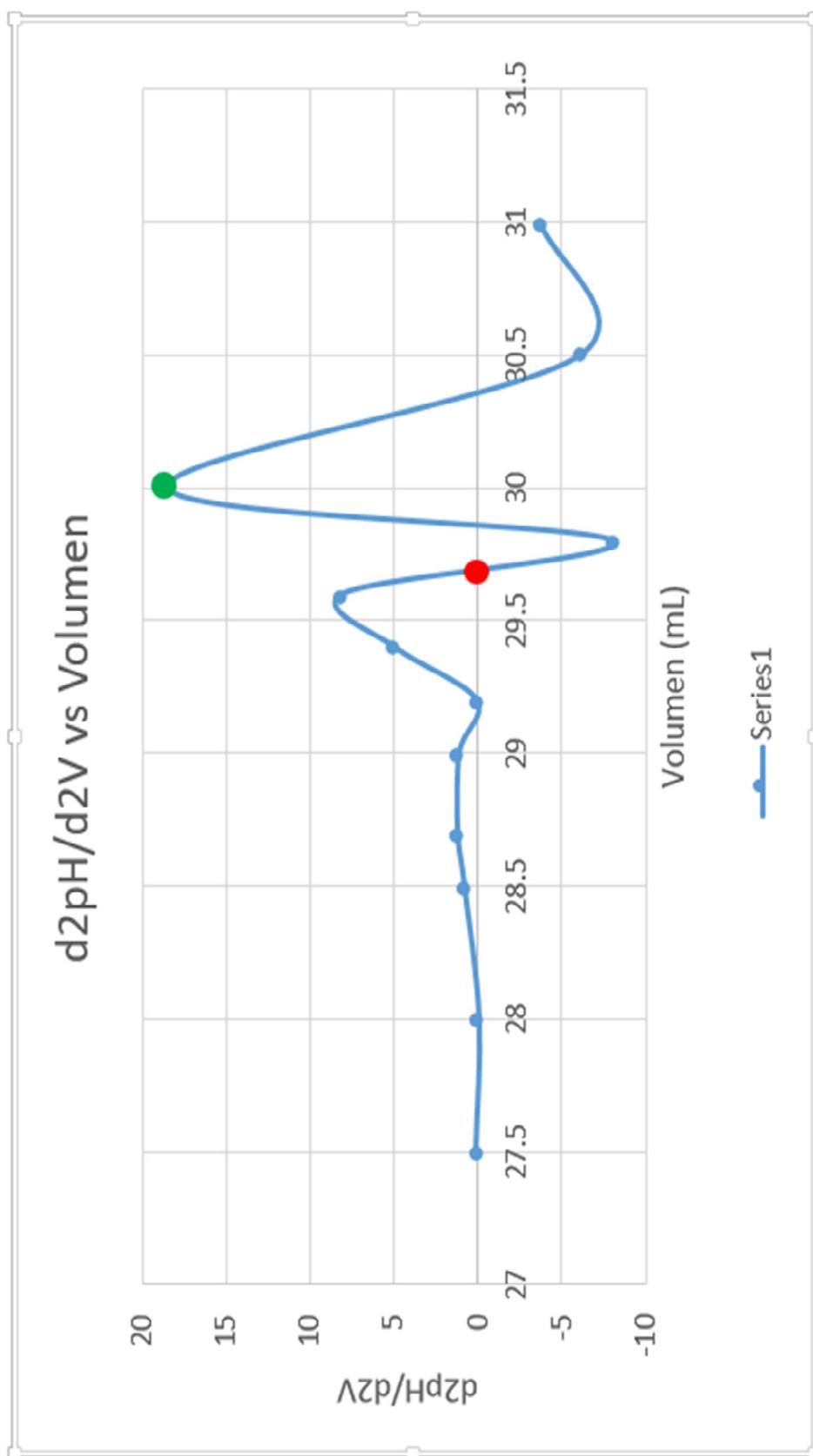


Figura 47. Curva de la segunda derivada de ácido fuerte monoprotico (HCl) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum L.*, Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

#### 4.4.2. Ácido débil ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) – base fuerte (NaOH)

En la titulación  $\text{CH}_3\text{COOH}$  vs NaOH, inicialmente presenta un color rosado, que al llegar al punto final o neutro (Punto verde) se observa un color amarillo, el cual se dio a un volumen de 35,4 mL a un pH 8.36. Con los resultados

anteriores se obtuvo el punto de equivalencia, siendo 35 mL,(Punto rojo).  
(Figura 48)

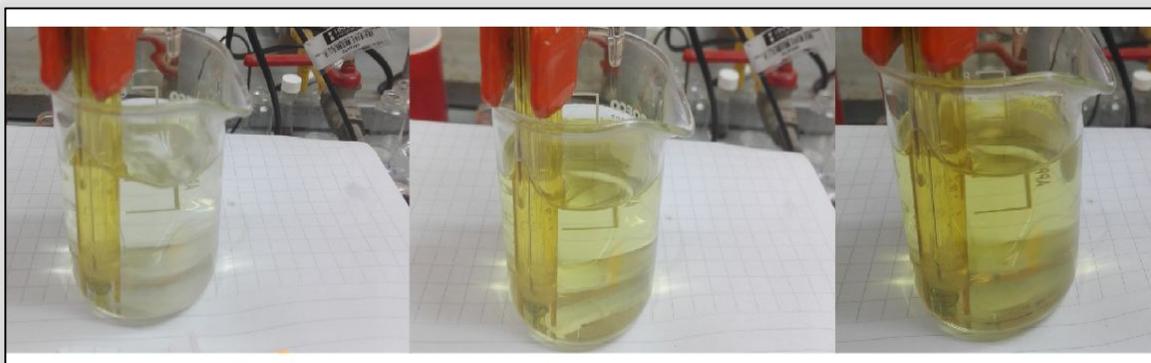


Figura 48. Titulación de Ácido Acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) con Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ )  
indicador el extracto *Punica granatum L.*, pH = 8.36 (a), 9.70 (b) y 10.29(c)  
Foto Propia

Tabla 11: Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido débil ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) vs base fuerte ( $\text{NaOH}$ ) utilizando como indicador extracto de *Punica granatum L.*

Volumen NaOH 0.095 N (mL)	pH	dpH/dV	d <sup>2</sup> pH/d <sup>2</sup> V
------------------------------	----	--------	------------------------------------

<b>0</b>	2,69	0	0
<b>2</b>	3,17	0,24	0,12
<b>4</b>	3,53	0,18	-0,03
<b>6</b>	3,77	0,12	-0,03
<b>8</b>	3,97	0,1	-0,01
<b>10</b>	4,14	0,085	-0,0075
<b>11</b>	4,21	0,07	-0,015
<b>12</b>	4,28	0,07	0
<b>13</b>	4,35	0,07	-8,9E-16
<b>14</b>	4,42	0,07	8,88E-16
<b>15</b>	4,48	0,06	-0,01
<b>16</b>	4,54	0,06	-8,9E-16
<b>17</b>	4,6	0,06	0
<b>18</b>	4,66	0,06	8,88E-16
<b>19</b>	4,72	0,06	-8,9E-16
<b>20</b>	4,79	0,07	0,01
<b>21</b>	4,85	0,06	-0,01
<b>22</b>	4,91	0,06	8,88E-16
<b>23</b>	4,98	0,07	0,01
<b>24</b>	5,06	0,08	0,01
<b>25</b>	5,13	0,07	-0,01
<b>26</b>	5,21	0,08	0,01
<b>27</b>	5,31	0,1	0,02
<b>28</b>	5,41	0,1	8,88E-16
<b>29</b>	5,52	0,11	0,01
<b>30</b>	5,66	0,14	0,03
<b>31</b>	5,82	0,16	0,02
<b>32</b>	6,04	0,22	0,06
<b>33</b>	6,36	0,32	0,1
<b>34</b>	6,92	0,56	0,24
<b>35</b>	8,36	1,45	0,89
<b>36</b>	9,7	1,33	-0,12
<b>37</b>	10,29	0,59	-0,74

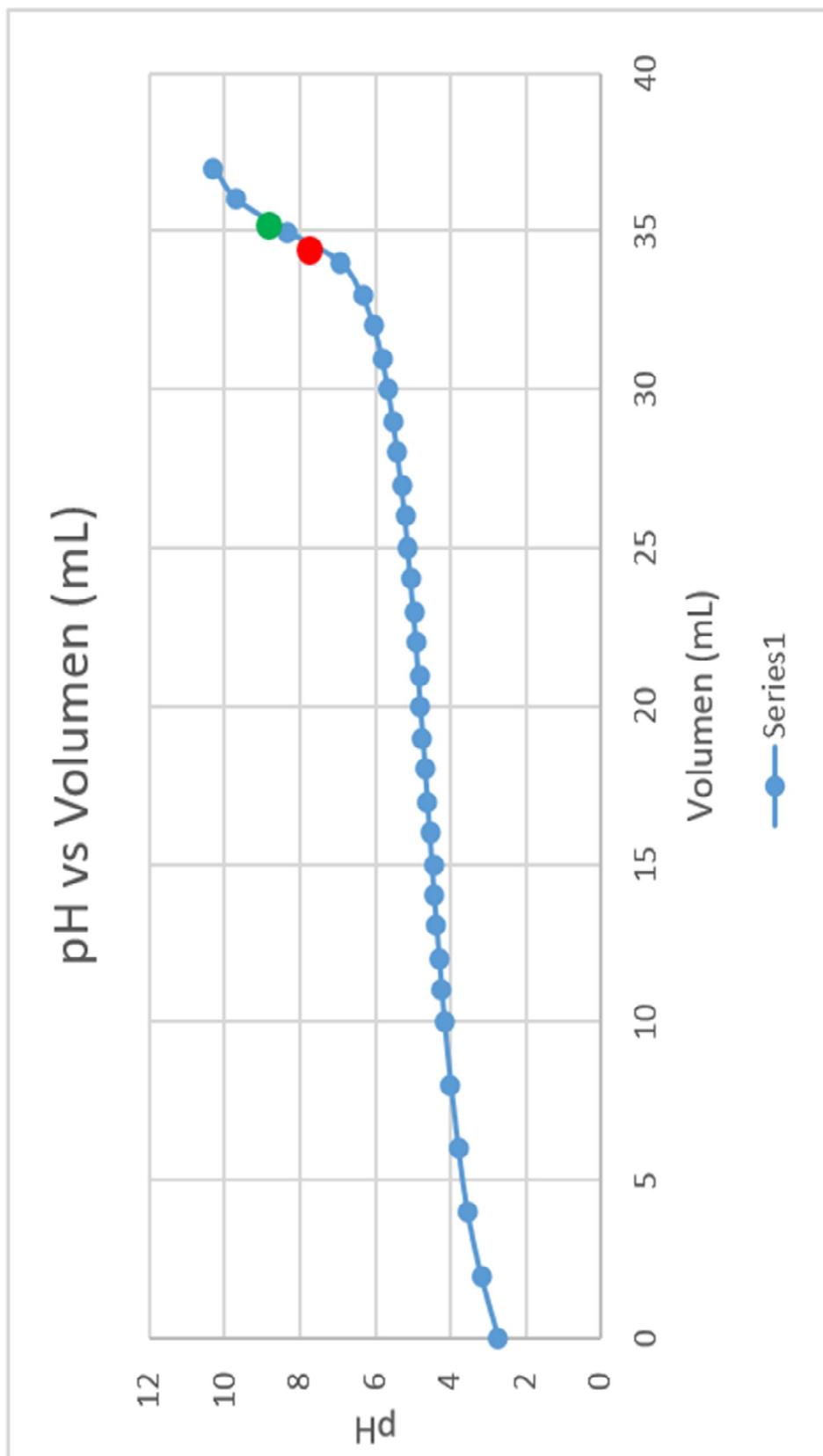


Figura 49. Curva de titulación ácido débil ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) vs base fuerte ( $\text{NaOH}$ ), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum L.* Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

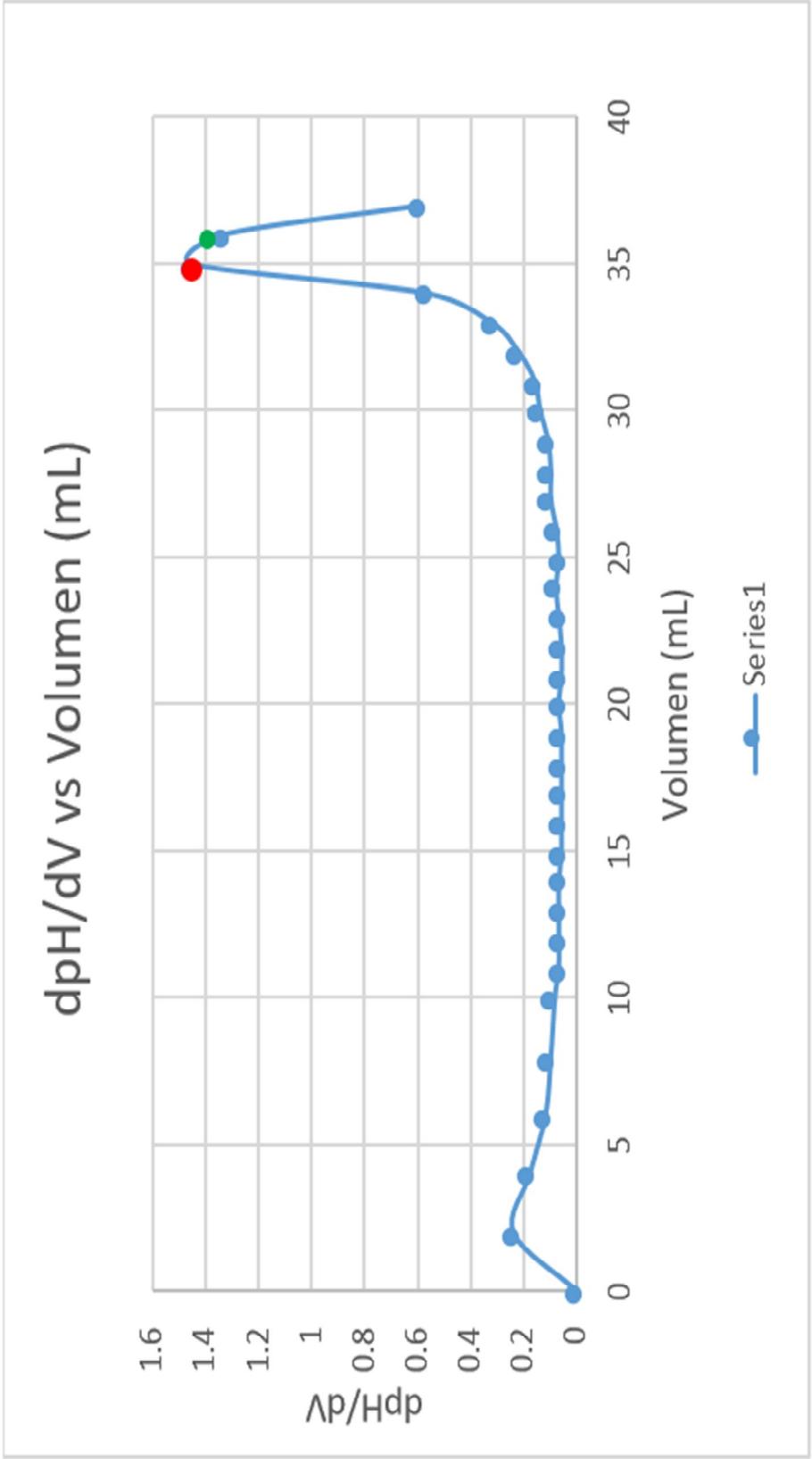
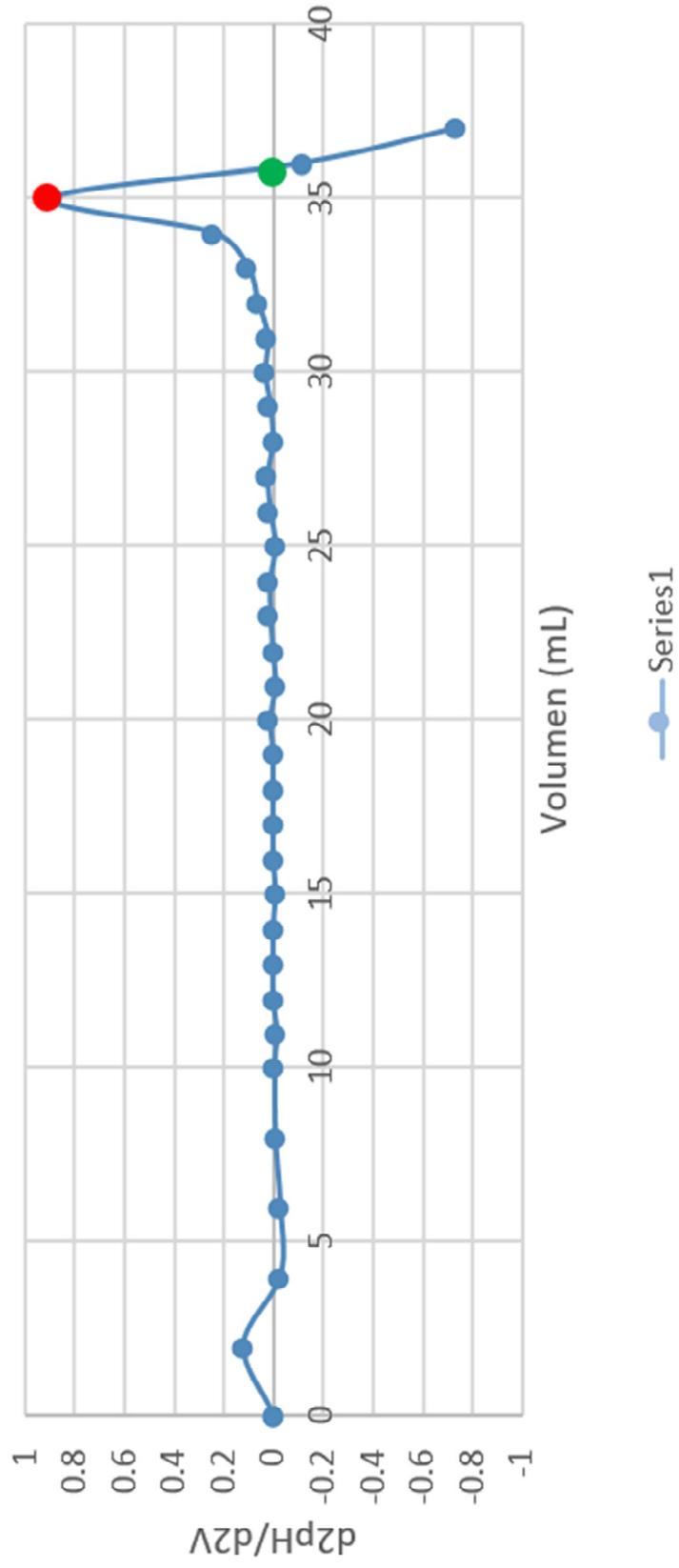


Figura 50. Curva de la primera derivada de ácido débil ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) vs base fuerte ( $\text{NaOH}$ ), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

d2pH/d2V vs Volumen (mL)



#### 4.4.3. Ácido fuerte diprótico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) – base fuerte ( $\text{NaOH}$ )

En la titulación ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) vs hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), inicialmente presenta un color rojo escarlata, que al llegar al punto final o neutro (Punto verde) se observa un color amarillo, el cual se dio a un volumen de 34 mL a un pH 8.91. Con los resultados anteriores se obtuvo el punto de equivalencia, siendo 33 mL, (Punto rojo). Figura 52.

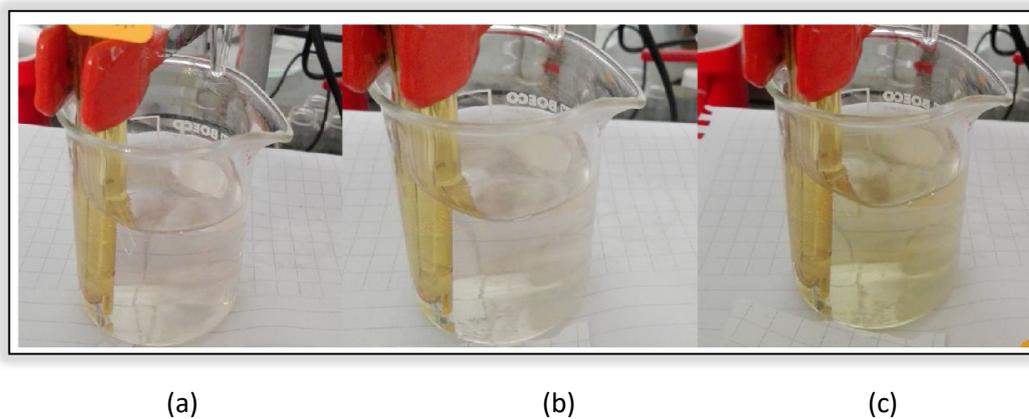


Figura 52. Titulación de Ácido Sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) con Hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), indicador el extracto *Punica granatum L.*, pH = 6.48 (a), 7.20 (b) y 8.91 (c)

Foto Propia

Tabla 12: Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada Ácido fuerte diprótico ( $H_2SO_4$ ) vs hidróxido de sodio (NaOH) utilizando como indicador extracto de *Punica granatum L.*

Volumen NaOH 0.095 N (mL)	pH	dpH/dV	d <sup>2</sup> pH/d <sup>2</sup> V
0	1.17	0	0
2	1.21	0.02	0.01
4	1.26	0.025	0.0025
6	1.32	0.03	0.0025
8	1.4	0.04	0.005
10	1.47	0.035	-0.0025
12	1.56	0.045	0.005
14	1.65	0.045	-5.6E-17
16	1.75	0.05	0.0025
18	1.86	0.055	0.0025
20	2	0.07	0.0075
22	2.2	0.1	0.015
24	2.45	0.125	0.0125
26	2.9	0.225	0.05
28	3.6	0.35	0.0625
29	4.05	0.45	0.1
30	4.81	0.76	0.31
31	5.84	1.03	0.27
32	6.48	0.64	-0.39
33	7.2	0.72	0.08
34	8.9	1.7	0.98
35	9.73	0.83	-0.87
36	10.09	0.36	-0.47

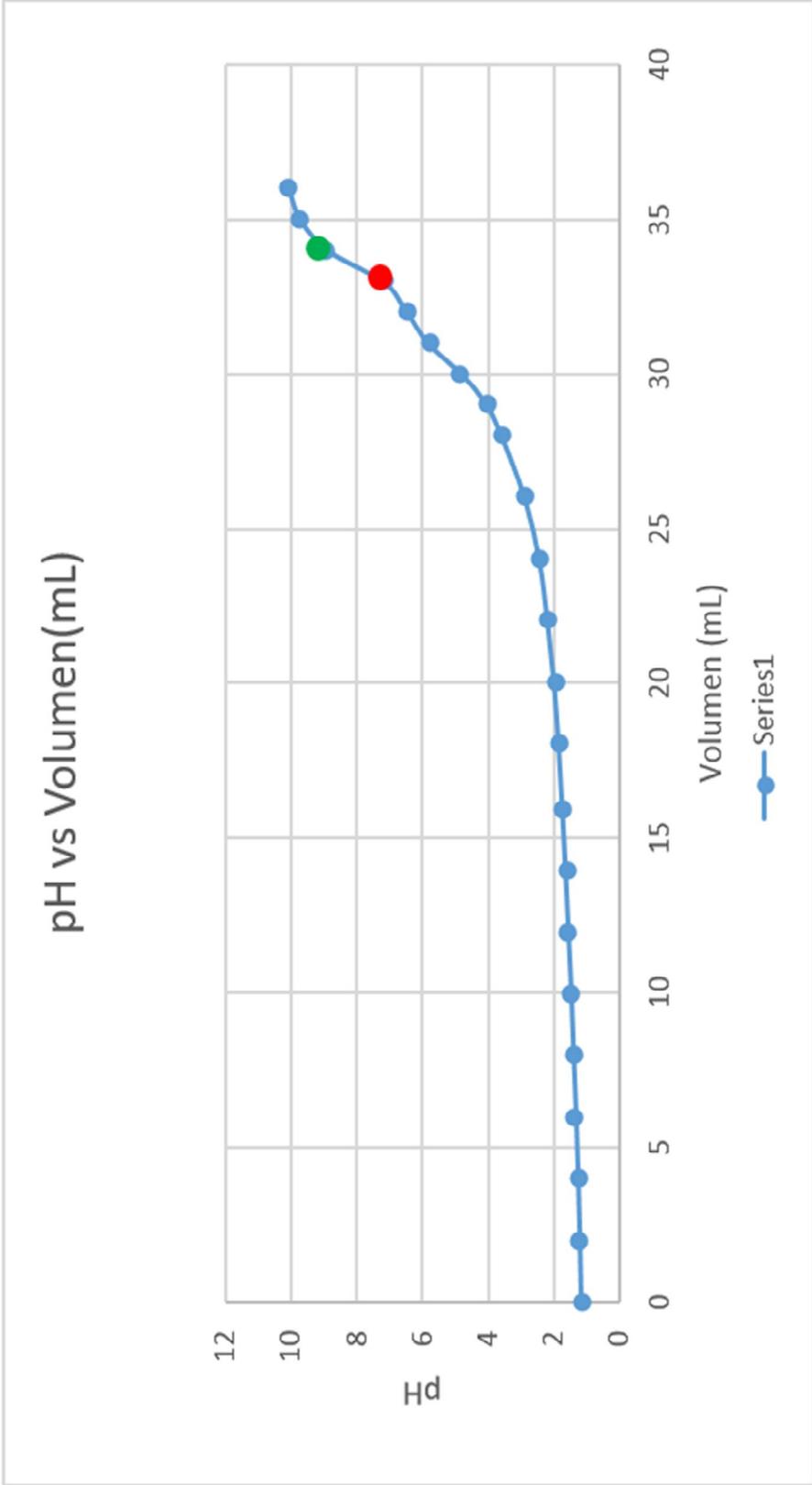


Figura 53. Curva de titulación ácido fuerte diprótico ( $H_2SO_4$  0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Elaboración Propia

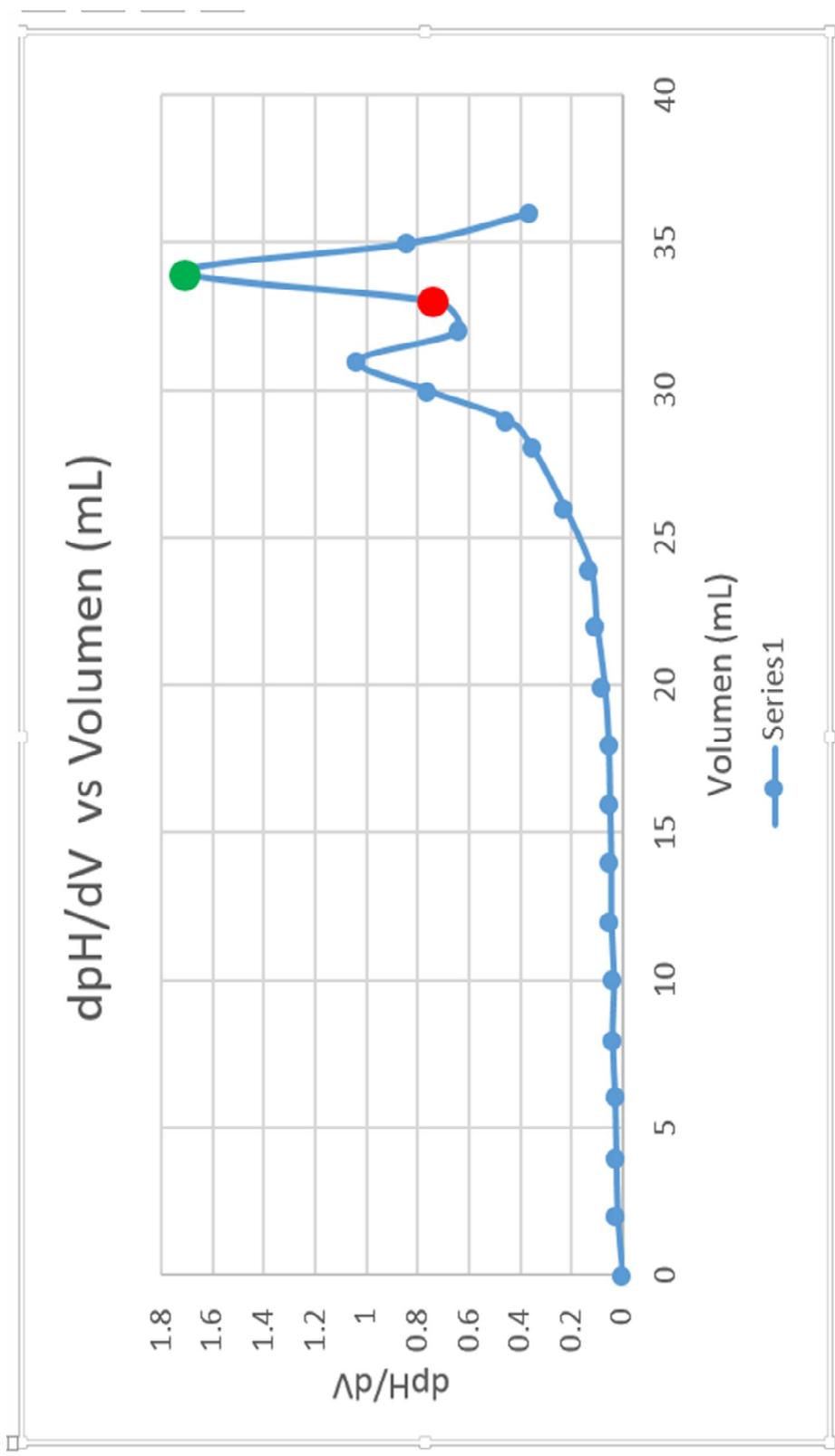


Figura 54. Curva de la primera derivada de ácido fuerte ( $H_2SO_4$  0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

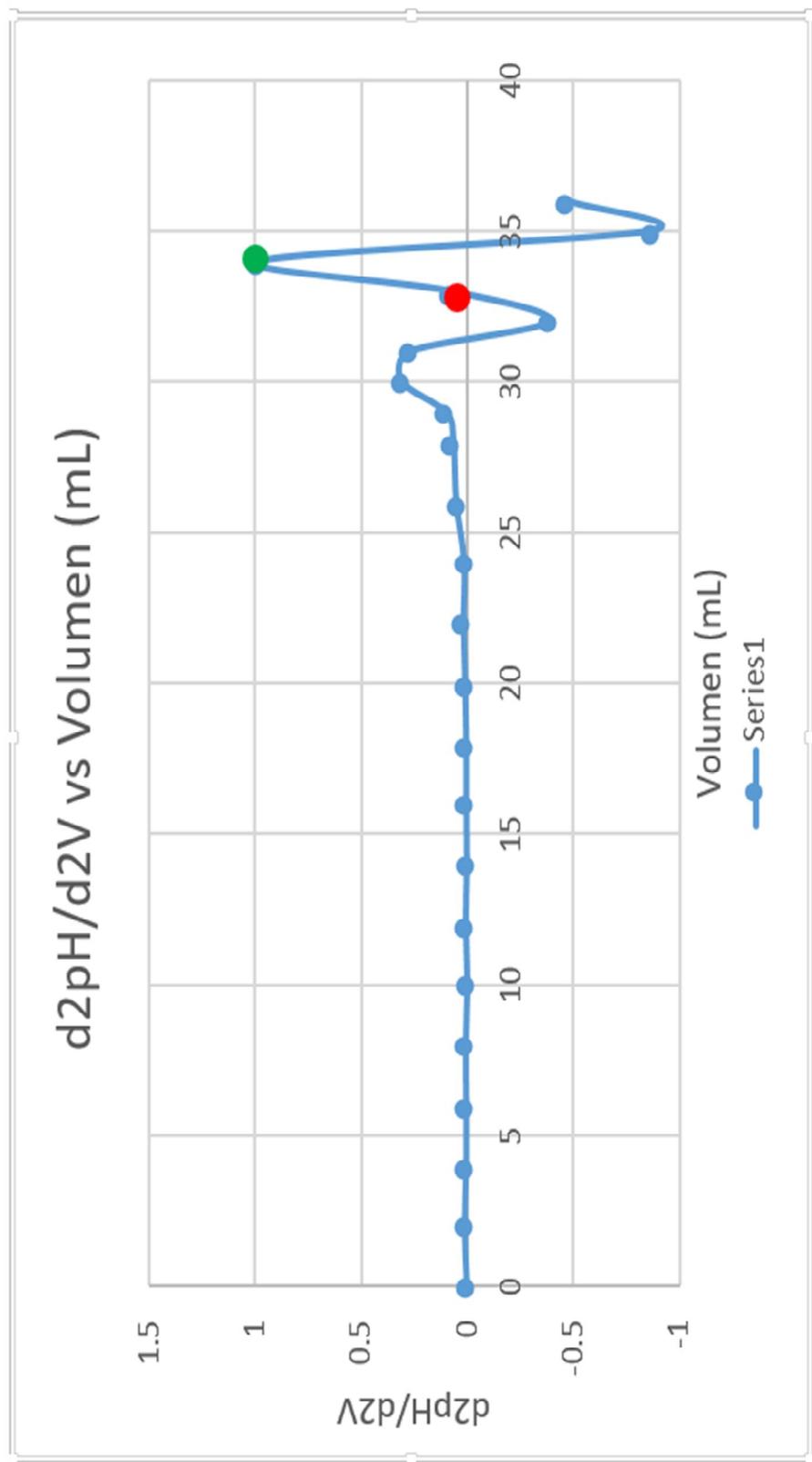


Figura 55. Curva de la segunda derivada de ácido fuerte (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L. Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

#### 4.4.4. Ácido fuerte triprótico ( $H_3PO_4$ ) – base fuerte (NaOH)

En la titulación ácido fosfórico vs NaOH, inicialmente presenta un color rojo escarlata, que al llegar al primer punto final o neutro (Punto verde) se observa el punto final un color amarillo el cual se dio a un volumen de 26 mL y un pH 8.39. Con los resultados anteriores se obtuvo el punto de equivalencia, siendo 20 mL. (Punto rojo). (Figura 54)

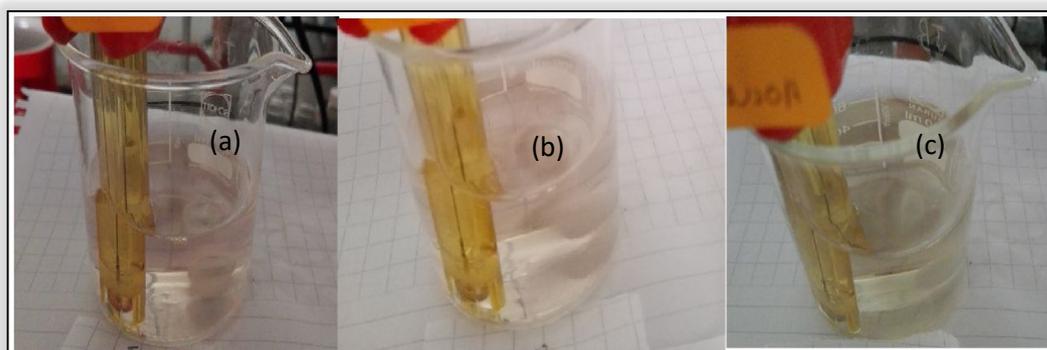


Figura 56. Titulación de Ácido fuerte triprótico ( $H_3PO_4$ ) con Hidróxido de sodio (NaOH), indicador el extracto *Punica granatum L.*, pH = 6.40 (a), 7.18 (b) y 8.39 (c)

Foto Propia

Tabla 13: Resultados para elaborar la gráfica de la segunda derivada ácido fuerte triprótico  $H_3PO_4$  vs hidróxido de sodio (NaOH) utilizando como indicador extracto de *Punica granatum L.*

Volumen NaOH 0.095 N (mL)	pH	dpH/dV	d <sup>2</sup> pH/d <sup>2</sup> V
0	1.81	0	0
2	1.97	0.08	0.04
4	2.16	0.095	0.0075
6	2.39	0.115	0.01
8	2.74	0.175	0.03
10	3.29	0.28	0.0525
12	4.03	0.39	0.05
14	5.7	0.96	0.25
16	6.4	0.27	-0.16
18	6.77	0.18	-0.01
20	7.05	0.13	-0.02
22	7.33	0.15	0.02
24	7.69	0.2	0.04
25	7.94	0.25	0.05
26	8.39	0.45	0.2
27	9.25	0.86	0.41
28	9.88	0.63	-0.23
29	10.24	0.36	-0.27
30	10.51	0.27	-0.09
31	10.79	0.28	0.01
32	10.98	0.19	-0.09
33	11.16	0.18	-0.01
34	11.27	0.11	-0.07
35	11.37	0.1	-0.01
36	11.47	0.1	1.78E-15
37	11.54	0.07	-0.03
38	11.61	0.07	1.78E-15
39	11.67	0.06	-0.01
40	11.72	0.05	-0.01
41	11.77	0.05	-1.8E-15
42	11.81	0.04	-0.01
43	11.85	0.04	-1.8E-15
44	11.88	0.03	-0.01
45	11.92	0.04	0.01
46	11.95	0.03	-0.01
47	11.98	0.03	1.78E-15
48	12	0.02	-0.01
49	12.03	0.03	0.01
50	12.05	0.02	-0.01

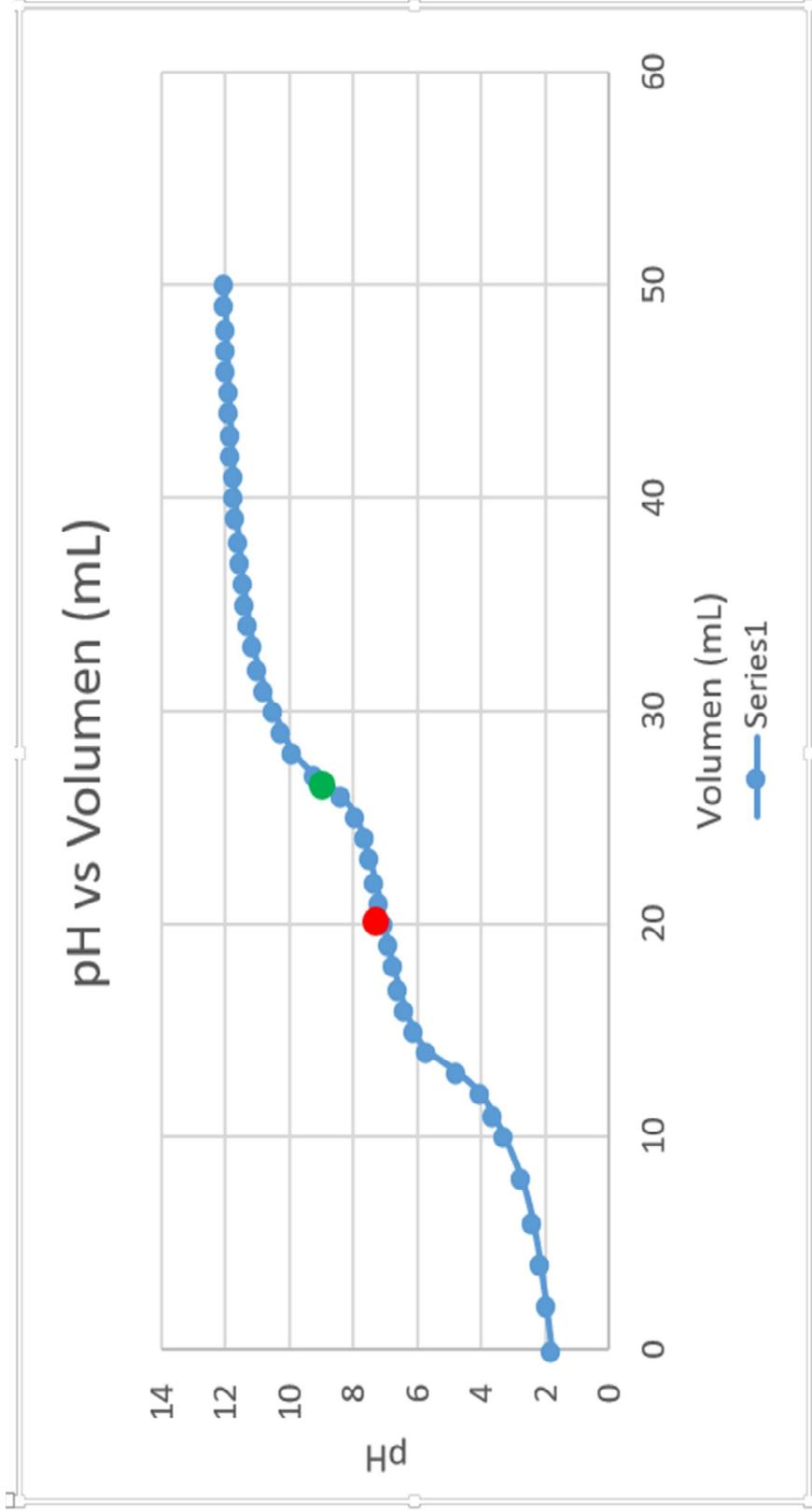


Figura 57. Curva de titulación ácido fuerte triprótico ( $H_3PO_4$ ) vs base fuerte (NaOH), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum L.* Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

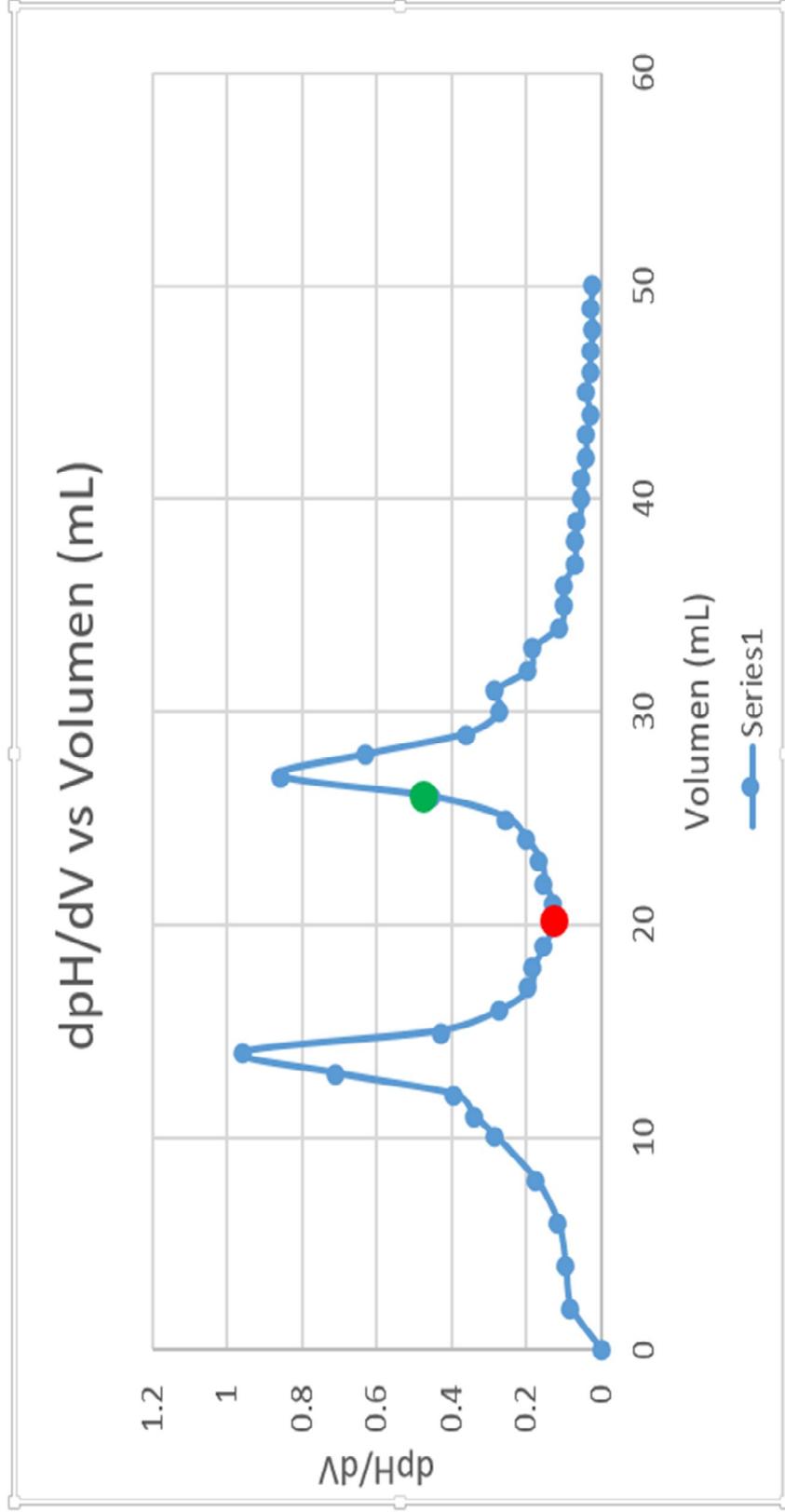


Figura 58. Curva de la primera derivada de ácido fuerte ( $H_3PO_4$  0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

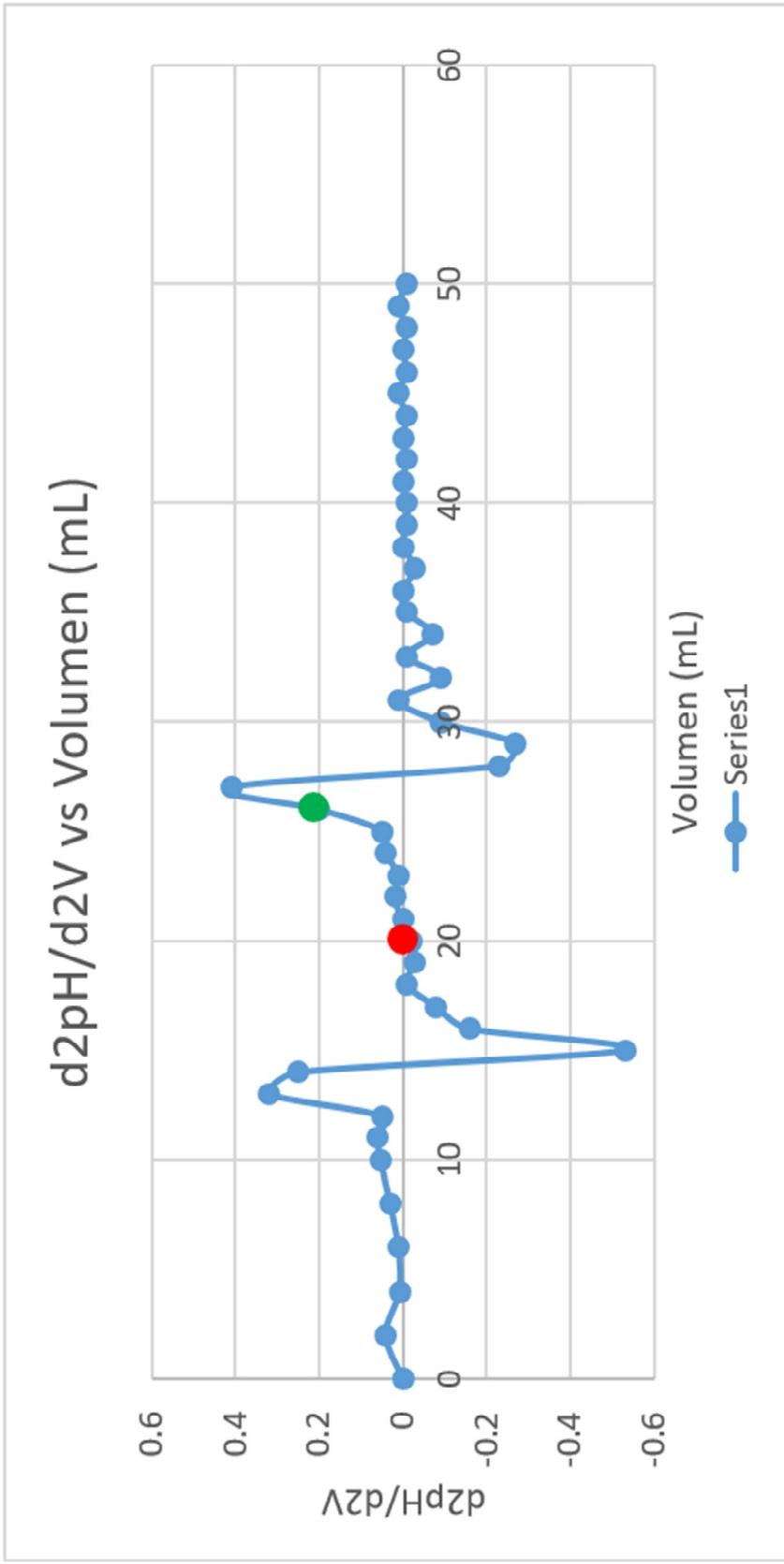


Figura 59. Curva de la segunda derivada de ácido fuerte ( $H_3PO_4$  0.1N) vs base fuerte (NaOH 0.095 N), utilizando como indicador el extracto de *Punica granatum* L Punto de equivalencia (Punto rojo) – Punto final (Punto verde)

Fuente: Elaboración propia

#### 4.5 Determinación del $pK_{\text{Indicador}^-}$

A partir del estudio espectrofotométrico del indicador, fue necesario seleccionar una región de la escala donde ocurre un cambio nítido y rápido de la coloración asociada a la variación brusca de pH, el cual ocurre cerca al pH 7, debido a que se realizó un análisis en función a la escala de buffer de pH,

Tabla 14: Valores de  $pK_1$  en función del pH

Número	pH	Absorbancia	
1	6	0.455	
2	6.5	0.461	
3	7	0.473	
4	7.5	0.55	
5	8	0.578	
6	1.5	1.018	a = $A_{in}$
7	10	0.305	b = $H_{in}$

Tabla 15: Datos de  $pK_{ind}$  a diferentes pH

Numero	pK1
1	6.455
2	6.961
3	7.473
4	8.05
5	8.578

Promedio de pK1	7.5034
pH = pK1 $\pm$ 1	(6,5 - 8,5)

#### 4.6 Estabilidad en presencia de oxígeno y luz del extracto *Punica granatum L.*

El estudio de la estabilidad del extracto del fruto *Punica granatum L.*, en presencia de oxígeno, se realizó durante 7 días y se realizó la caracterización en el Espectrofotómetro UV-Vis.

Tabla 16. Estabilidad en presencia de oxígeno y luz en función de la absorbancia de los dos frascos de vidrio (Transparente y ámbar)

		<i>Frasco de vidrio transparente</i>	<i>Frasco de vidrio ámbar</i>
<i>Días</i>	Fechas	Absorbancia	Absorbancia
0	15-May-2017	0.77	0.77
1	16-May-2017	0.593	0.366
2	17-May-2017	0.495	0.439
3	18-May-2017	0.496	0.452
4	19-May-2017	0.565	0.452
5	20-May-2017	0.533	0.416
6	23-May-2017	0.497	0.371
7	24-May-2017	0.417	0.389

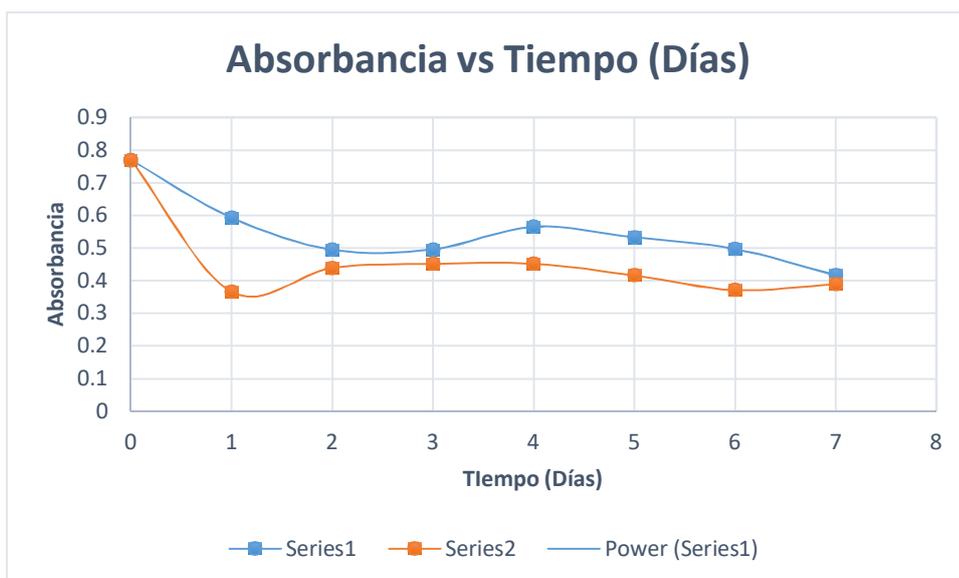


Figura 60. Comparación de Absorbancia entre dos frascos de almacenamiento vidrio incoloro (Serie 1) y ámbar (Serie 2), durante un lapso de 7 días, pH 2.5

Fuente: Elaboración propia

Para evaluar el nivel de significancia que existe entre ambos frascos de almacenamiento (transparente y ámbar) se realizó la prueba estadística T-Student.

#### 4.6.1. Estadístico T-Student para muestras independientes

Prueba F para determinar la homogeneidad de las varianzas en cada una de las muestras.

$$F_{\text{calculado}}: \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2} \cdot \frac{S_1^2}{S_2^2} \dots(1)$$

- $H_0$ : Existe una homogeneidad entre las varianzas de las muestras ( $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$ )
- $H_1$ : No existe una homogeneidad entre las varianzas de las muestras ( $\sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$ )

Tabla 17. Media, desviación estándar (S) y varianza (S<sup>2</sup>) de los tipos de frascos (ámbar y transparente), para determinar la homogeneidad de las varianzas

	<i>Frascos de vidrio color ámbar</i>	<i>Frascos de vidrio color transparentes</i>
<i>Media</i>	0.4568	0.5457
<i>S</i>	0.1311	0.1049
<i>S<sup>2</sup></i>	0.0171	0.0110

Grados de libertad (GL):

n-1, n-1

Si: n= 8

G.L = 7.7

Se desarrolló la prueba F, con el software MiniTab 17.0, en donde:

Distribución F con 7 grados de libertad, en el numerador y 7 GL en el denominador,

P( X ≤ x )      x  
0.025    0.200204

Distribución F con 7 GL en el numerador y 7 GL en el denominador

$$P(X \leq x) = 0.975 \quad x = 4.99491$$

Por lo tanto:

$$\alpha = 0,05$$

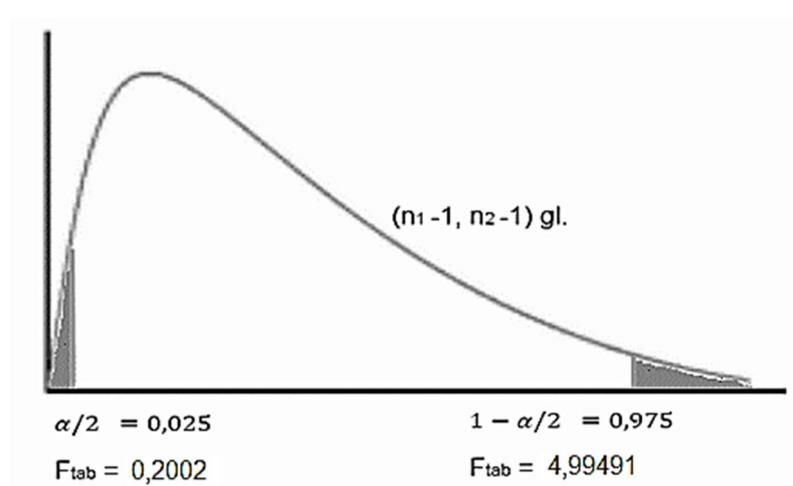


Figura 61. Función de distribución acumulada inversa

Elaboración propia

Dando, como resultado que:

- Se acepta  $H_0$ :  $0.2002 < F_{\text{calculado}} < 4.99491$
- Se rechaza  $H_0$ :  $F_{\text{calculado}} > 4.99491$  ó  $F_{\text{calculado}} < 0.200204$

Si:

$$- F_{\text{calculado}}: \frac{\cancel{\sigma_2^2} \cdot S_1^2}{\cancel{\sigma_1^2} \cdot S_2^2} = \frac{0.0171}{0.0110} = 1.5545$$

Por lo tanto se acepta  $H_0$ , existe una homogeneidad entre las varianzas de las muestras ( $\sigma^2_1 = \sigma^2_2$ )

## Distribución de T-Student varianzas desconocidas y homogéneas

$$T = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{S^2 p \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}}$$

- $H_0$ : No existe diferencia significativa entre ambos frascos de almacenamiento (ámbar y transparente)
- $H_1$ : Si existe diferencia significativa entre ambos frascos de almacenamiento (ámbar y transparente)

Número de grados de libertad (G.L):  $n + n - 2$

Donde:

$$n = 8$$

Por lo tanto G.L = 14

- Distribución t de Student con 14 GL

$$P(X \leq x) \quad x \\ 0.025 \quad -2.14479$$

- Distribución t de Student con 14 GL

$$P(X \leq x) \quad x \\ 0.975 \quad 2.14479$$

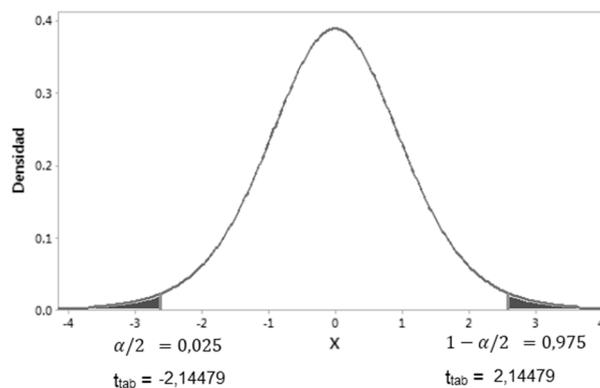


Figura 62. Función de la distribución de T de Student

Elaboración propia

Se acepta  $H_0$ :  $-2.14479 < T_{\text{calculado}} < 2.14479$

Se rechaza  $H_1$ :  $T_{\text{calculado}} > 2.14479$  ó  $T_{\text{calculado}} < -2.14479$

Tabla 18. Media, desviación estándar y error de la desviación estándar de los tipos de frascos de vidrio (ámbar y transparente), para determinar la diferencia significativa entre ambos.

<i><b>Muestra</b></i>	<i><b>Número</b></i>	<i><b>Media</b></i>	<i><b>Desviación estándar</b></i>
<i><b>Ámbar</b></i>	8	0.457	0.131
<i><b>Transparente</b></i>	8	0.546	0.105

Se desarrolló la prueba T-Student con el software MiniTab 17.0.

Diferencia =  $\mu$  (ámbar) -  $\mu$  (transparente)

Estimación de la diferencia: -0.0889

IC de 95% para la diferencia: (-0.2162, 0.0385)

Prueba T de diferencia = 0 (vs.  $\neq$ ): Valor **T = -1.50** Valor p = 0.157 GL = 14

Ambos utilizan Desviación Estándar agrupada = 0.1187

Por lo tanto el valor T, se encuentra en el rango aceptable y se acepta  $H_0$  dando a conocer que no existe una diferencia significativa, entre ambas envases

## Discusión de resultados

Las titulaciones ácido – base (ácido fuerte monoprótico – base fuerte y ácido fuerte diprótico – base fuerte) con el extracto de la granada (*Punica granatum L.*) presentaron un rápido cambio de color en el rango de pH 4.00 - 6.00, debido a la inestabilidad presente de las antocianinas, por el efecto de conjugación del catión flavilio o hidratación del C2 dando una estructura chalcona (irreversible), mientras que en la valoración de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ácido fuerte) – NaOH (base fuerte) con el extracto de la granada (*Punica granatum L.*), identifica el punto de equilibrio del  $pK_2$  (pH = 7.22) por la variación de color transparente – amarillo (base quinoidal en forma chalcona), en el  $pK_1$  (pH = 2.15) no se observa un cambio de color significativo, manteniéndose constante un color rojo; debido a la estabilidad de la estructura ion flavilium de la antocianina en pH ácido, y según Cuevas et al., 2008 hace mención que el ión flavilium es la única especie capaz de copigmentar lo que permite un aumento de intensidad de color.

La variación de colores en la escala buffer de pH (3.5 – 10) con el extracto de la granada (*Punica granatum L.*), se debió al catión Flavilio (rojo), chalcona (amarillo), pseudo-base (inoloro) y base quinoidal (azul), que presentó un desplazamiento batocrómico (aumento de longitud de onda), por la conjugación de dobles enlaces en su estructura, que según Marcondes et al., 2014 es por los elevados contenidos de antocianinas lo que los hace posible indicadores de pH.

La oxidación en presencia de la luz en diferentes lapsos de tiempo (5, 10 y 15 minutos), en la escala de buffer de pH (3.5-10), presentó un efecto hipsocrómico (disminución de la banda de absorbancia), debido a la sensibilidad que presenta la estructura según el pH, como en función de la luz. Sin embargo; por el efecto de copigmentación la fracción con mayor estabilidad fue a pH ácido (3.5) en las diferentes fracciones de tiempo, en donde el ión flavilium se encuentra más estable y dando una estabilidad del color en el extracto, según Márquez, 2011 las antocianinas diglicosidas que son menos

susceptibles a la luz que las antocianinas monoglucosidas, permitiendo una menor degradación del color, pero este factor se encuentra íntimamente ligado al efecto del pH como hace mención Lopes et al., 2007.

La estabilidad del extracto del fruto *Punica granatum L.*, en presencia de oxígeno y luz no presentó una diferencia significativa entre ambos envases de almacenamiento (frasco incoloro – frasco ámbar), según Fuentes (2005) las antocianinas diglicósidos presentan una mayor estabilidad ante el oxígeno a pH ácido (2.5), evitando el efecto de degradación del color en el extracto, siendo aún variable esta absorbancia en los días, por las presencia de antocianinas monoglicosidadas, que son susceptibles a la presencia de oxígeno.

Estudios de Wesson et al. (2011); permitieron determinar que la pigmentación se debe a la presencia de antocianinas por la comparación de los pesos moleculares de las estructuras, con un porcentaje de error menor al 0.5%, sin embargo aunque se usó fases móviles diferentes; estos datos fueron corroborados por la presencia característica de una absorbancia de antocianinas en el rango 490 – 550 nm del Espectrofotometro UV-Vis.

## Conclusiones

Se identificó mediante UHPLC-ESI-MS y MS/MS los pigmentos antocianidicos característicos: cianidina-3-monoglucosido, cianidina-3,5-diglucosido, pelargonidina-3,5-diglucosido, cianidina y pelargonidina en el extracto de granada (*Punica granatum L.*), a partir de los diferentes picos de fraccionamiento más polares.

El extracto de los arilos del fruto de *Punica granatum L.* es buen indicador natural en el rango de 4 a 8 unidades de pH debido a su cambio de color, pasando de un color rojo a pH 4, incoloro a pH 6 y color amarillo a pH 8, pudiendo utilizarse para demostrar niveles débilmente ácidos, neutros y débilmente básicos de una solución mediante la titulación.

El extracto del fruto *Punica granatum L.* presenta mejor estabilidad a pH ácido (3.5), durante los intervalos de 5, 10 y 15 min en la escala de buffer, siendo el de menor estabilidad el medio débilmente ácido (4 - 5) donde se observó una decoloración en los diferentes intervalos de tiempo, obteniéndose de esta manera que el  $pK_{Ind}$  está en el rango de 6,5 – 8,5.

Según el estadístico de la prueba T-Student a un 95 % de confianza, no existe diferencia estadística entre los valores obtenidos de la prueba de estabilidad del indicador natural por acción del oxígeno y luz (almacenado en frasco de vidrio transparente o ámbar), ambos bajo las mismas condiciones (-4 °C), por lo que dichos almacenamientos son ideales para el indicador natural en un periodo de 7 días

## **Recomendaciones**

1. Desarrollar un análisis de degradación cinética del extracto mayor a 7 días, con el fin de evaluar su eficiencia y el tiempo utilidad del extracto como indicador natural..
2. Realizar un ensayo de titulación con bases fuertes y débiles, con el propósito de obtener información relacionado a la estabilidad del extracto la cual se propone en esta investigación.

## Fuentes de Información

- Aguilera Ortiz, M. (2009). *Caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo Ficus carica variedad Misión, cultivado en Ciudad Lerdo Durango, México*. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Aguilera Ortiz, M., Alanis Guzmán, M. G. & Reza Varga, M. (2005) *Comparación de dos Métodos de Extracción de Antocianinas en Ficus carica*. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Alas E. M. & Salazar J. M. (2010). *Obtención de Indicadores Naturales Ácido-base para medio Acuoso a partir del Fruto de la Fragaria vesca (Fresa), de las cascaras de Vitis vinífera (Uva Roja) y de la Prunus domestica (Ciruela Negra)*. Recuperado de la biblioteca digital de la Universidad de el Salvador. Facultad de Química y Farmacia. p.p 1-184.
- Ananga A., Georgiev V., Ochieng J., Phills B. & Tsoleva V. (2013). *Production of anthocyanins in grape Cell Cultures: A potential source of Raw Material for Pharmaceutical, food and Cosmetic Industries*. Faculties of Agriculture and Veterinary Medicine. University of Nairobi.
- Andersen Oyvind M. & Markham Kenneth R. (2006) *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. p. 286
- Aza-González., C & Ochoa-Alejo N. (2012). *Characterization of anthocyanins from Fruits of two Mexican chili peppers (Capsicum annum L.)* Journal of the Mexican Chemical Society.
- Azebedo A. (2011). *Extração de antocianinas dos frutos do açaí da mata atlântica (Euterpe edulis Martius) e sua atuação nas atividades antioxidante e antiaterogénica em camundongos APOE*

- Barahona, C, & Rivera Bonilla, M. (2006). *Obtención de Indicadores ácido-base a partir de cáscara de Phaseolus vulgaris (Frijol Negro)*. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de el Salvador.
- Bertini, L. M, Brilhante S.E.T., de O. Neto F. B & Alcantara., L. A. (n.d) *Determinação Do Teor De Antocianinas E Sua Influência Na Variação Da Coloração Dos Extratos De Flores Do Oeste Potiguar*. IX Congreso de iniciación Científica de IFRN.
- Boldarini A., Ramos L. & Gomes É. (1997). *Aplicação De Pigmentos De Flores No Ensino De Química*. Departamento de Química. Universidad Federal de Sao Carlos.
- Calín, A. & Carbonell, A. (n.d). *La fruta Granada Cultivada en España*. Departamento Tecnología Agroalimentaria. Universidad Miguel Hernández.
- Casas J., Castillo H., Noy J., Palomares A. & Rodriguez R. (2009) *Elaboración de papel indicador a base de extractos naturales: una alternativa fundamentada en experiencias de laboratorio para el aprendizaje del concepto de pH*. Revista Eureka.
- Castañeda-Sánchez A., & Guerrero-Beltrán J.A.(2015) *Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: antocianinas*. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas Puebla.
- Castillo, G. G (2006). *Extracción de Colorante de Col morada (Brassica oleraceae) para ser usado en la elaboración de una bebida*. Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos. Universidad Técnica de Ambato.

- Castillo G., Michelena G., Nogueiras C., Ortega G., Bello D., Guerra M., Armenteros S., Reádigos R., Crespo D & Mieres G.(2010) *Caracterización cromatográfica y espectroscópica de un pigmento rojo obtenido a partir de Bothryodiplodia theobromae*. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, Cuba.
- Contreras R. (2007) *El origen del color en la naturaleza*. Universidad de los Andes.
- Cuevas E., Antezana A & Winterhalter P. (2008). *Análisis y caracterización de antocianinas en diferentes variedades de maíz (Zea mays) Boliviano*. Technische Universität Braunschweig, Alemania.
- Díaz A. (2014) *Calidad nutracéutica de extractos de Granada dulce y ácida y bioaccesibilidad de sus compuestos fenólicos en un modelo in vivo*. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- El Qada E, Allen S & Walker G. (2006) *Absorción de Metileno azul sobre carbón activado producido a partir de carbón bituminoso activado por vapor: Estudio de equilibrio de absorción isotérmica*. University of Belfast UK.
- Escribano-Bailón T., Santos-Buelga C. & Rivas-Gonzalo J. (2004). *Antocyaninas en cereales*. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
- Fuentes W. (2005). *Extracción, cuantificación y estabilidad de colorantes naturales presentes en los frutos de Punus capuli Cav. (Cereza), Rubus urticaefolius Poir (Mora) y Sambucus canadensis L. (Sauco) como alternativas naturales de consumo de los colorantes artificiales rojo 40, Rojo 3 y Rojo 2., en bebidas en el rango de pH: 3, 4 y 5*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala

- Garzón G, (2008). *Antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión*. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
- Gaurav P., Naveen J., Narendra N. & Chatap V. 2010. *Bougainvillea glabra – A Natural Indicator* . PHCOG J Vol. 2
- Gómez M., (2010). *Desarrollo y evaluación de estrategias analíticas para la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales*. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica. Universidad de Granada
- Gris E., Ferreira E., Falcao L & Bordignon-Luis M., (2005) *Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems*. Departamento de Ciencia y Tecnologia de Alimentos. Universidad Federal Santa Catarina
- Guimaraes W., Ribeiro M & Antoniosi N. (2012). *Antocianinas Em Extratos Vegetais: Aplicação Em Titulação Ácido-Base E Identificação Via Cromatografia Líquida/Espectrometria De Massas*. Instituto de Quimica. Universidades Federal de Goiás.
- Gupta P., Jain P. & Kumar P. (2012) *isolation of natural acid base indicator from the flower sap of Hibiscus rosa sinensis*. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 4(12): 4957-4960.
- He F., Liang N., Mu L., Pan Q., Wang J., Reeves M. & Duan C. (2012). *Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression*. China Agricultural University, Beijing.
- Henrique P. & Poppi R. (2007) *Procedimentos Analíticos Para Identificação De Antocianinas Presentes Em Extratos Naturais*. Departamento de Química. Universidad de Estadual de Londrina.

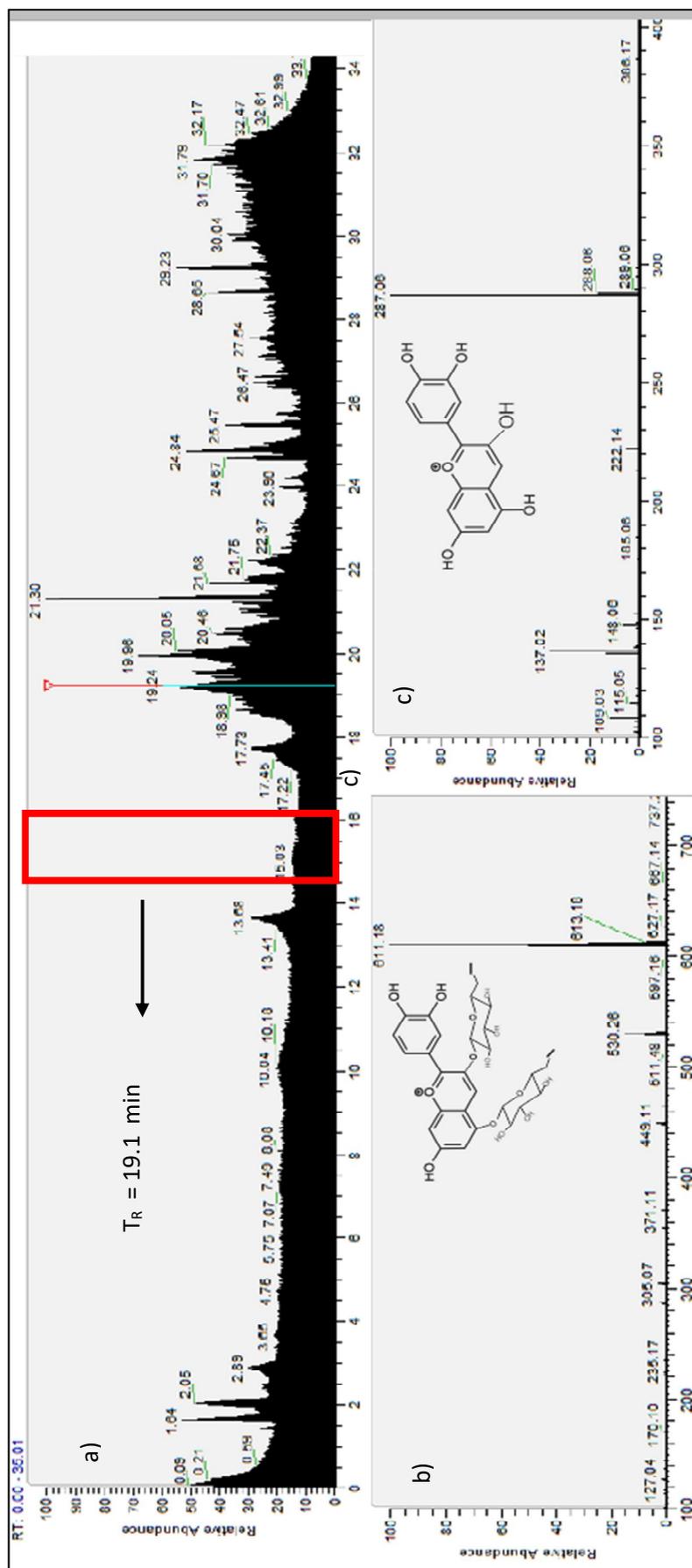
- Heras I., Alvis A. & Arrazola G. (2013). *Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.)*. Universidad de Córdoba, Programa de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingenierías. Información Tecnológica Vol. 25 N°5. p.p.93-102.
- Hong MY, Seeram NP y Heber D. 2008. *Pomegranate polyphenols down-regulate expression of androgen-synthesizing genes in human prostate cancer cells over-expressing the androgen receptor*. *J Nut Biochem* 19: 848–855.
- Aguilera Ortiz, M., Alanis Guzmán, M. G., & Carmen, R. V. M. Del. (2005). *Comparación de dos Métodos de Extracción de Antocianinas en. VII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y III Foro de Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 331–339.
- Kuskoski M., Asuero A., García-Parilla C., Troncoso A. & Fett R. (2004). *Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos*. *Cienc. Technol. Aliment. Campinas*.
- Larrosa M, González-Sarrías A, Yáñez-Gascón MJ, Selma MV, Azorín-Ortuño M, Toti S, Tomás- Barberán F, Dolara P y Espín JC. 2010. *Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism*.
- Leyva D., (2009) *Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mota*. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- Lopes J., Fonseca M., Novy M., & Bastos M. (2007) *Antocianinas: Uma Breve revisão das características estruturais e da estabilidade*. Universidad Federal Santa Catarina

- Lopes D., & Vitorino A., (2001) *Indicadores Naturales de pH: Usar Papel o Solución?*. Instituto de Química. Universidad Estatal de Campiñas.SP.
- Marcondes J., Domingos M., Pereira F., De Sousa A., Figueiredo A. & Domingui L. (2014) *Estudo da Estabilidade de Antocianinas em Diferentes Alcoóis Alifáticos para uso como Indicador de pH*. Revista Ciencias Exactas e Naturales.
- Márquez G. (2011) *Capacidad antioxidante y caracterización estructural de las antocianinas de los frutos rojos de Prunus domestica L., Ficus carica L. y Vitis vinífera L. c.v. "red globe" cultivados en Perú*. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Mendoza E., Curi C., Rojas V. & Alvarado J. (2016) *Encapsulation, characterization and thermal stability of anthocyanins from Zea mays L. (purple corn)*. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz. Bolivia.
- Melgarejo P., Hernández F. & Legua P. (n.d) *El granado. I jornadas nacionales sobre el granado: Producción, economía, industrialización, alimentación y salud*. Departamento de producción vegetal y microbiología. Universitat Miguel Hernández de Elche.
- Mera A. C. (2008). *Fotocatalisis Heterogenea Util En El Tratamiento De Residuos Liquidos Generados En Laboratorios De Analisis Quimico Y Ambiental*. Universidad de Magdalena.
- Mokhtari P., Ghaedi M., Dashtian K., Rahimi M.R. & Purkait M.K. (2016). *Removal of methyl orange by copper sulfide nanoparticles loaded activated carbon: kinetic and isotherm investigation* Yasouj University
- Morales C., Perez E. & Vega L. (2005) *Obtención de Indicadores Naturales ácido-base a partir de pétalos de cuatro especies de flores*. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de el Salvador

- Negrón M. (2009) *Microbiología Estomatológica Fundamentos y guía práctica*, 2° Edición, Argentina
- Pardo-Díaz S., Rojas-Tapias D., Roldán F., Brandao P. & Almansa-Manrique E. (2017) *Biodegradación del fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re-uso en cultivos agrícolas*. Universidad de Costa Rica
- Pascual-Teresa S., Moreno D. & García-Viguera C. (2010) *Flavonols and anthocyanins in Cardiovascular Health: A review of current evidence*. International Journal of Molecular Sciences.
- Pavan F. A., Lima E. C., Dias S., Mazzocato A. C., (2007). *Methylene blue biosorption from aqueous solutions by yellow passion fruit waste*. Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.p.703-717.
- Peguero F., (2007) *Perfil de antocianinas de tres variedades de frijol rojo (Phaseolus vulgaris L.) cultivadas en Honduras*. Carrera de Agroindustria Alimentaria. Universidad Zamorano
- Salinas Y., García C., Coutiño B. & Vidal V. (2013). *Variabilidad en contenido y tipos de antocianinas en granos de color azul/morado de poblaciones mexicanas de maíz*. Instituto nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y pecuarias (INIFAP).
- Sánchez R., (2015). *T-Student. Usos y abusos*. UMAE Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
- Santacruz L., (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.
- Suva M. (2014) *Opuntia ficus indica (L.) Fruit Extract as Natural Indicator in Acid-Base Titration*. Department of Pharmacology, Aksharpreet Institute of Pharmacy. Journal of PharmaScitech Vol. 3 (Issue 2), 85.

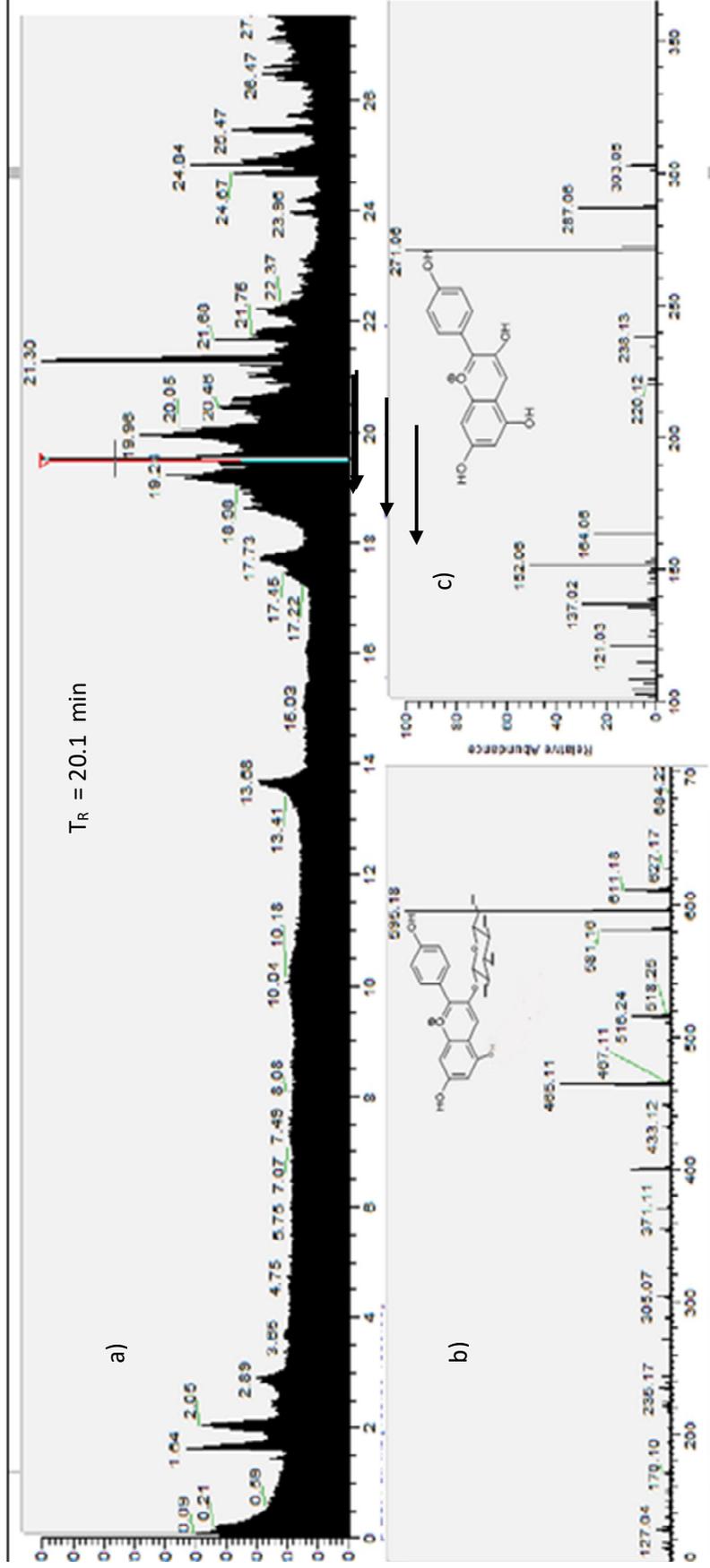
- Texeira R., Francon A., Mendes F., Molena J., Franciane L., Silva L., Aparecida P. & Gaia P., Brufatto R., (2014). *Metodología de evaluación exotoxicológica empleando germinación de semillas en gel nutriente como medio de cultura*. Universidad Federal de Sao Carlos (UFSCar), Araras, SP, Brasil. Departamento de Ciencias da Natureza.
- Trovillas P., Sancho-Garcia J., De Freitas V., Gierschener J., Otyepka M & Dangles O.,(2016) *Stabilizing and Modulating color by copigmentation: Insights from Theory and Experiment*. American Chemical Society.
- Tzulke R., Glazer I., Bar-Ilan I., Holland D., Aviram M. & Amir R. (2007) *Antioxidant activity, polyphenol content, and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions*. Institute of Plant Sciences. Agricultural Research Organization.
- Vankar P. & Bajpai D. 2010. *Rose anthocyanins as acid base indicators*. Facility for Ecological and Analytical Testing (FEAT). (875-884)
- Zhao D., Wei M., Liu D & Tao J., (2016) *Anatomical and biochemical analysis reveal the role of anthocyanins in flower coloration of herbaceous peony*. Yangzhou University.

## **Anexos**



Anexo 1.- a) Cromatograma del HPLC (Fase Reversa C-18) del extracto de la *Punica granatum L.* b) Espectro de Ms de la antocianina (Cianidina) 3,5 Di-glucosida c) Espectro de Ms/Ms de la antocianidina (Cianidina).

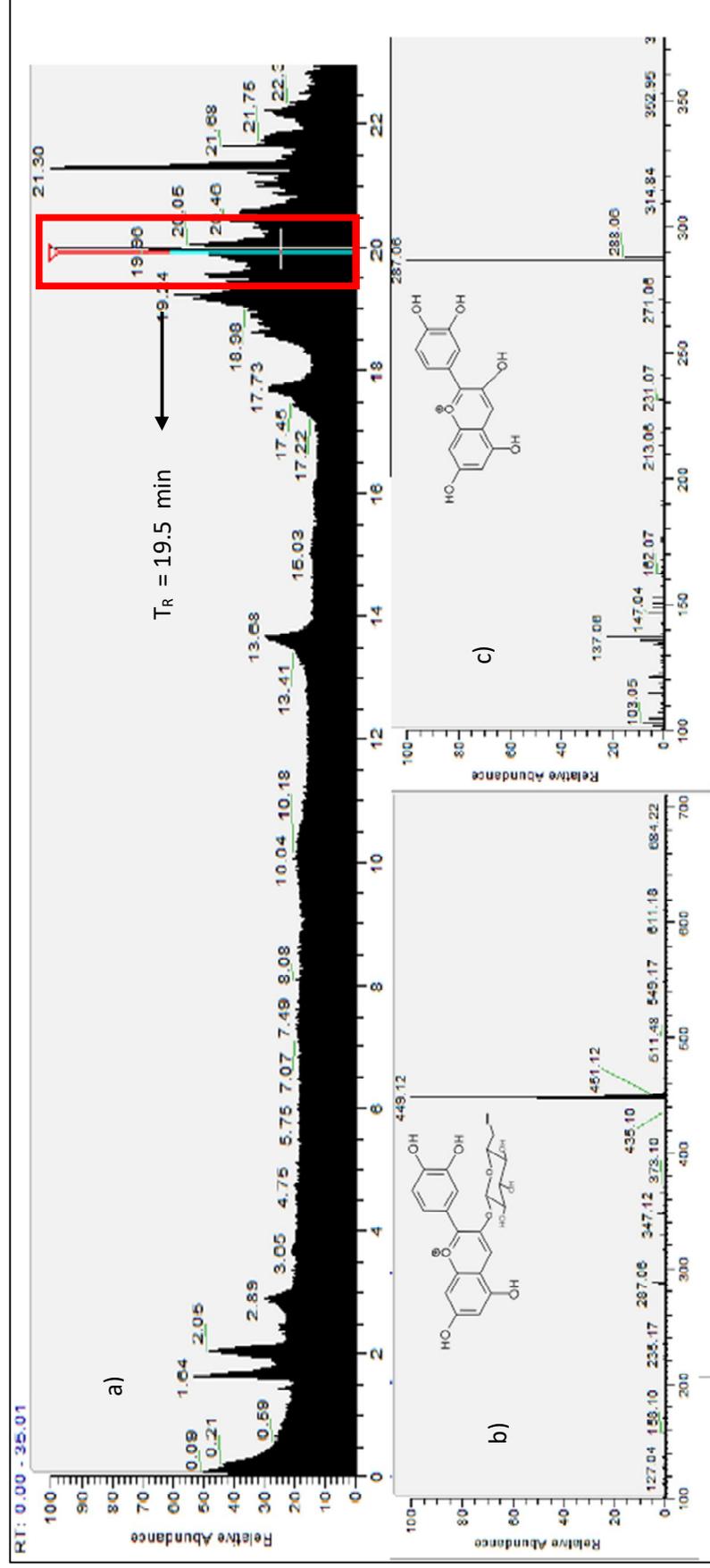
Fuente.- Cromatograma obtenido del HPLC -ESI-Ms/Ms. THERMO SCIENTIFIC – Universidad de Antofagasta – Chile.



Anexo 2.- a) Cromatograma del HPLC (Fase Reversa C-18) del extracto de la *Punica granatum L.* b) Espectro de Ms de la antocianina (Cianidina) 3 Mono-glucosida c) Espectro de Ms/Ms de la antocianidina (Cianidina).

Fuente.- Fuente.- Cromatograma obtenido del HPLC -ESI-Ms/Ms. THERMO SCIENTIFIC – Universidad de

Antofagasta – Chile.



Anexo 3.-a) Cromatograma del HPLC (Fase Reversa C-18) del extracto de la *Punica granatum L.* b) Espectro de Ms de la antocianina (Pelargonidina) 3 Mono-glucosida c) Espectro de Ms/Ms de la antocianidina (Pelargonidina).

Fuente.- Fuente.- Cromatograma obtenido del HPLC -ESI-Ms/Ms. THERMO SCIENTIFIC – Universidad de Antofagasta