

ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN DE POLIFENOLES TIPO
ANTOCIANINAS AISLADA DEL FRUTO DE IVILAN (*Monima obtusifolia*),
ESTABILIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

CLAUDIA MILENA CHARFUELAN BRAVO

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

ESTUDIO QUÍMICO DE LA FRACCIÓN DE POLIFENOLES TIPO
ANTOCIANINAS AISLADA DEL FRUTO DE IVILAN (*Monima obtusifolia*),
ESTABILIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO.

CLAUDIA MILENA CHARFUELAN BRAVO

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director
Nelson Humberto Hurtado Gutierrez
Ph, D en ciencias Químicas.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2012

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son de responsabilidad exclusiva de los autores.

Artículo 1º del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Nelson Humberto Hurtado Gutierrez
Director

Juan José Lozada castro
Jurado

Freddy Pantoja
Jurado

San Juan de Pasto, mayo de 2012

DEDICATORIA

Esta investigación es fruto del trabajo que con tanto esfuerzo y agrado realice y está dedicado en primer lugar a Dios por estar siempre presente en mi vida, a mi madre Martha Charfuelán y mi hermano Mauricio por todo el apoyo que me brindaron

AGRADECIMIENTOS

A la vicerrectoría de investigaciones, posgrados y relaciones internacionales (VIPRI) de la universidad de Nariño por su apoyo financiero para la realización de esta investigación.

A mi director, Dr. Nelson hurtado por su apoyo, comprensión y orientación, durante la realización del presente trabajo.

A los doctores Juan José Lozada y Fredy Pantoja por el tiempo dedicado a la revisión del presente trabajo.

A los profesores y laboratoristas del programa de Química de la universidad de Nariño por sus enseñanzas y colaboración durante mi formación profesional, en especial a los químicos David Arturo y Juan Pablo Jiménez, por sus asesoría además de la amistad que me dispensaron.

A mi familia por su apoyo y ejemplo pero sobre todo por haber creído en mí.

A mis compañeros y amigos y a todos a aquellos con quienes tuve la oportunidad de compartir gratos momentos, gracias por hacer parte de mi formación.

RESUMEN

La investigación en el campo de los pigmentos naturales provenientes de frutas, permite establecer el potencial de ellas como alimento con propiedades biofuncionales. En este trabajo se realizó el análisis cualitativo, cuantitativo, de estabilidad y capacidad antioxidante de los pigmentos antocianicos mayoritarios responsables del color azul púrpura en el fruto de Ivilan (*Monima Obtusifolia*), una especie que crece de forma silvestre en el municipio de Guachucal Nariño, y del cual no existían estudios químicos.

Con el firme propósito de contribuir al conocimiento de la composición química y actividad biológica de los extractos de polifenoles de este fruto, éstos se aislaron y se purificaron mediante el uso de técnicas como la maceración química, extracción líquido-líquido y cromatografía en columna y se analizaron por cromatografía líquida alta eficiencia, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, RMN ^1H y espectroscopia UV-Vis, estos análisis permitieron sugerir que las posibles estructuras de las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto de Ivilan corresponden a la Vitisin b de la peonidina-3-O-(6''-O-succinil- α ramnosa)-O-acetil- β glucosido, la delfinidina-3-O-((feruil) (propionil)- β ramnosa)-O- β glucosido, un derivado de la peonidina con dos azúcares y dos grupos acilo p-cumaroil y un grupo acilo p-hidroxibenzoico, y cianidina-3-O-((galoi) (propionil)- α xilosa)-O-malonil- β glucosido.

Como contribución al estudio de frutales, se pudo establecer que el fruto de Ivilan contiene antocianinas monoméricas y poliméricas y fenoles totales superior al de frutas como la mora, la uva. Adicional a lo anterior, los estudios de estabilidad mostraron que el extracto purificado y almacenado a pH 3, a 4 °C y en ausencia de luz y aire fue el más estable

Finalmente se evaluó la actividad antioxidante de los extractos y de las antocianinas mayoritarias frente al radical ABTS $^{+}$ estos resultados mostraron que los extractos más activos fueron el extracto crudo de Ivilan y la antocianina 2.

ABSTRACT

Natural pigments research of fruits allows the determination of its potential use as a bio-functional food and the development of value-added products like natural pigments. In this work the qualitative and quantitative analysis of stability and the antioxidant capacity of the majority anthocyanin pigments responsible of the purple blue color in the Ivilan fruit (*Monima Obtusifolia*) were performed, this is a wild plant not chemically researched that grows in the municipally of Guachucal in Nariño department.

Several extracts were obtained using techniques like chemical maceration, liquid-liquid extraction and column chromatography, in order to contribute in chemical structure and biological activities knowledge of the polyphenols presents in the extracts. The extracts were analyzed by techniques like high performance liquid chromatography, high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry, NMR 1H and UV-Vis spectroscopy, the results allow to propose that the structures for majority anthocyanins in Ivilan fruit are: an Vitisin b de la peonidin-3-O-(6''-O-succinyl- α ramnoside)-O-acetyl- β glucoside, a delphinidin-3-O-((feruyl) (propionyl)- β ramnoside)-O- β glucoside a peonidin derivate with two sugars and two acyl groups p-comaroyl and a acyl group p-hydroxybenzoic and a cyanidin-3-O-((galloyl)(propionyl)- α -xiloside)-O-malonyl- β -glucoside.

The monomeric anthocyanins content, polymeric content and total fenolic content were also determinate as a contribution to the fruit studies. By the stability studies it was conclude that the purified extract stored at pH 3, 4°C in absence of light and air was the most stable.

The antioxidant activities of the extracts and for the four majority anthocyanins against ABTS free radical was also studied, the results indicated that most active extract is the Ivilan crude extract (8,500 μ mol of trolox/g of fruit), and the anthocyanin 2.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCION.....	19
1. OBJETIVOS.....	21
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2. MARCO REFERENCIAL.....	22
2.1 ANTECEDENTES.....	22
2.2 MARCO CONTEXTUAL.....	23
2.3 MARCO TEORICO.....	23
2.3.1 Compuestos fenólicos.....	23
2.3.1.1 Fenoles simples.....	24
2.3.1.2 Fenilpropanoides.....	27
2.3.1.3 Taninos.....	27
2.3.1.4 Quinonas.....	27
2.3.1.5 Flavonoides.....	28
a. Flavanos.....	29
b. Flavonoles.....	29
c. Flavonas.....	30
d. Antocianidinas.....	30
2.3.2 Antocianinas.....	31
2.3.2.1 Estructura de las antocianinas.....	32
2.3.2.2 Métodos de extracción y separación de antocianinas.....	33
2.3.2.3 Cuantificación de antocianinas.....	34
2.3.2.4 Métodos de caracterización de antocianinas.....	36
2.3.2.5 Estabilidad de color de las antocianinas.....	38
a. Efectos Estructurales.....	39
b. Efectos del pH.....	39
c. Efecto de la temperatura.....	41
d. Efectos del oxígeno.....	41
e. Efectos de la luz.....	41
f. Efectos de las enzimas.....	41
g. Efecto del ácido ascórbico.....	42
h. Presencia de un azúcar.....	42
i. Copigmentación.....	42
2.3.4 capacidad antioxidante.....	43
2.3.4.1 Estrés oxidativo.....	43
2.3.4.2 Sistema antioxidante.....	44
2.3.5 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante in vitro.....	44
2.3.5.1 Fenoles totales.....	44
2.3.5.2 Método TEAC.....	45
2.3.5.3 Método DPPH.....	45

3. METODOLOGÍA.....	47
3.1 Equipos y reactivos.....	47
3.1.1 Equipos.....	47
3.1.2 Reactivos.....	47
3.2 recolección del material vegetal.....	48
3.3 Extracción de pigmentos.....	48
3.3.1 Preparación de la muestra.....	48
3.3.2 Obtención del extracto crudo del fruto.....	48
3.4 Purificación del pigmento.....	49
3.4.1 Separación de compuestos lipofilicos y medianamente polares.....	49
3.4.2 Obtención de un extracto rico en antocianinas.....	49
3.4.3 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas.....	49
3.4.4 Análisis por HPLC analítica.....	50
3.4.5 Purificación de antocianinas por HPLC preparativa.....	51
3.5 Caracterización del pigmento.....	51
3.5.1 Cromatografía de capa fina.....	52
3.5.2 Caracterización por espectroscopia UV-Vis.....	52
3.5.3 Caracterización por cromatografía liquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	53
3.5.4 Determinación del espectro RMN ¹ H.....	53
3.6 Cuantificación de antocianinas.....	53
3.6.1 Antocianinas monoméricas.....	53
3.6.2 Antocianinas poliméricas.....	53
3.7 Determinación de la estabilidad.....	54
3.8 Capacidad antioxidante in vitro.....	55
3.8.1 Fenoles totales.....	55
3.8.2 Método ABTS.....	55
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
4.1 Ensayos preliminares.....	57
4.2 Métodos de purificación.....	58
4.3 separación e identificación de antocianinas.....	58
4.3.1 Cromatografía de capa fina (TLC).....	59
4.3.2 Cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC).....	60
4.3.3 Separación de antocianinas mayoritarias por HPLC preparativa.....	64
4.3.4 Espectroscopia UV-Vis.....	65
4.3.5 Análisis por cromatografía liquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).....	67
4.3.6 Espectro RMN ¹ H.....	72
4.4 Cuantificación de los extractos obtenidos.....	79
4.4.1 Determinación de antocianinas monoméricas.....	79
4.4.2 Determinación de antocianinas poliméricas.....	81
4.5 Estudio de la estabilidad de los extractos.....	83
4.6 Capacidad antioxidante.....	89
4.6.2 Método TEAC.....	92
CONCLUSIONES.....	96

RECOMENDACIONES..... 97
BIBLIOGRAFÍA..... 98
ANEXOS..... 105

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla N° 1. Gradiente de HPLC para la separación de antocianinas sobre columnas polimérica C18.....	51
Tabla N° 2. Cantidades de los diferentes extractos.....	58
Tabla N° 3. Factores de retención para las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.....	59
Tabla N° 4. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.....	60
Tabla N° 5. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el ERM.....	63
Tabla N° 6. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el ERP.....	64
Tabla N° 7. Ensayos para determinar los % de solvente y el flujo adecuado para la separación de las antocianinas por HPLC preparativa.....	64
Tabla N° 8. Parámetros espectroscópicos para las antocianinas obtenidas por HPLC preparativa.....	66
Tabla No 9. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de tres antocianinas mayoritarias del fruto de Ivilan en CD3OD/TFAd (19:1).....	78
Tabla N° 10. Absorbancias para los EIC y EIP a diferentes pHs.....	79
Tabla N° 11. Contenido de antocianinas monoméricas para los EIC y EIP...	80
Tabla N° 12. Absorbancias para los EIC y EIP a las $\lambda_{\text{vis-max}}$	82
Tabla N° 13. Contenido de antocianinas poliméricas para los EIC y EIP....	82
Tabla N° 14. Convención utilizada para las muestras almacenadas a diferentes condiciones.....	84
Tabla N° 15. Parámetros cinéticos de la degradación de antocianinas del EIC y EIP a diferentes condiciones de almacenamiento.....	86
Tabla N° 16. Convención utilizada para la degradación térmica.....	87
Tabla N° 17. Parámetros cinéticos de la degradación térmica de antocianinas del EIC y EIP.....	89
Tabla N° 18. Resultados de la prueba de Folin aplicada a patrones de ácido gálico.....	90
Tabla N° 19. Fenoles totales para los EIC y EIP.....	91
Tabla N° 20. Resultados de la prueba ABTS para los diferentes extractos y las antocianinas puras.....	93
Tabla N°21. Resultados de TEAC en los diferentes extractos y en el patrón de ácido ascórbico.....	94

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura básica y ejemplo de un fenol simple.....	25
Figura 2. Esquema de las rutas biosintéticas de los flavonoides.....	26
Figura 3. Estructura de un fenilpropanoide.....	27
Figura 4. Estructura básica y ejemplo de un tanino.....	27
Figura 5. Estructura de una quinona.....	28
Figura 6. Estructura básica de un flavonoide.....	28
Figura 7. Estructura básica y ejemplo de un flavano.....	29
Figura 8. Estructura básica y ejemplo de un flavonol.....	29
Figura 9. Estructura básica y ejemplo de una flavona.....	30
Figura 10. Estructura básica de una antocianidina.....	30
Figura 11. Estructura de las antocianidinas naturales más importantes.....	31
Figura 12. Estructura básica de las antocianinas.....	32
Figura 13. Esquema de las cuatro especies en equilibrio de las antocianinas en medio acuoso.....	40
Figura 14. Interacciones antocianina-co-pigmento.....	43
Figura 15. Estructura de trolox.....	45
Figura 16. Fruto de Ivilan.....	48
Figura 17. Separación de compuestos incoloros de baja polaridad por CC con amberlita XAD7.....	49
Figura 18. Separación de ERM y ERP por CC con sephadex.....	50
Figura 19. Equipo HPLC Waters 1525.....	51
Figura 20. Cromatografía de capa fina del EIP.....	52
Figura 21. Espectrofotómetro Pharo Merck.....	52
Figura 22. Estabilidad térmica a 80°C.....	55
Figura 23. Variación del color respecto al pH del extracto de Ivilan.....	57
Figura 24. Espectro UV-Vis del extracto de Ivilan.....	58
Figura 25. Cromatografía de capa fina de las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.....	59
Figura 26. Perfil cromatográfico del EIP.....	60
Figura 27. Espectros de absorción UV-Vis de las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.....	61
Figura 28. Perfil cromatográfico de los diferentes extractos obtenidos por CC con Sephadex.....	63
Figura 29. Perfil cromatográfico de la separación de las antocianinas mayoritarias por HPLC en modo preparativo.....	65
Figura 30. Espectro UV-Vis de la antocianina 1.....	65
Figura 31. Espectro UV-Vis de la antocianina 2.....	65
Figura 32. Espectro UV-Vis de la antocianina 3.....	66
Figura 33. Espectro UV-Vis de la antocianina 4.....	66
Figura 34. Perfil cromatográfico HPLC-MS.....	68
Figura 35. Espectro de masas de la señal 1.....	68

Figura 36. Estructura básica pigmento 1	69
Figura 37. Espectro de masas de la señal 2.....	69
Figura 38. Estructura básica pigmento 2.....	70
Figura 39. Espectro de masas de la señal 3.....	70
Figura 40. Estructura básica pigmento 3.....	71
Figura 41. Espectro de masas de la señal 4.....	71
Figura 42. Estructura básica pigmento 4.....	72
Figura 43. Estructura de la Vitisin b de la peonidina-3-O-(6''-O-succinil- α ramnosa)-O-acetil- β glucosido.....	74
Figura 44. Estructura de la delfinidina-3-O-((feruil) (propionil)- β ramnosa)-O- β glucosido.....	75
Figura 45. Estructura de la cianidina-3-O-((galoil) (propionil)- α xilosa)-O-malonil- β glucosido.....	77
Figura 46. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar compuestos incoloros.....	82

LISTA DE GRAFICAS

	pág.
Grafica N° 1. Comparación del contenido de antocianinas monoméricas en diferentes frutos.....	81
Grafica N° 2. Degradación de las antocianinas contenidas en el EIC y en el EIP almacenadas a diferentes condiciones.....	84
a. Almacenamiento a pH 3.....	84
b. Almacenamiento a pH 5.....	85
Grafica N° 3. Degradación térmica de las antocianinas contenidas en el EIC y en el EIP a pH 3 y pH 5.....	87
a. Degradación a 4°C.....	87
b. Degradación a 80°C.....	88
Grafica N° 4. Curva de calibración de ácido gálico.....	90
Grafica N° 5. Comparación del contenido de fenoles totales del Ivilan con otros frutos.....	92
Grafica N°6. Degradación térmica de las antocianinas contenidas en el EIP almacenadas a pH 5.....	93
Grafica N° 7. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de Ivilan con otros frutos.....	95

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Cromatogramas de las antocianinas mayoritarias separadas por HPLC tipo preparativo a 520nm.....	105
Anexo B. espectros RMN ¹ H de las antocianinas mayoritarias.....	107

GLOSARIO

AA ausencia de aire
ABTS 2,2 azinobis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico
AL ausencia de luz
 $A_{\lambda_{vis-max}}$ Absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción en la región visible
 A_{440} Absorbancia a 440 nm
BAW n butanol/ácido acético glacial/agua
CC cromatográfica de columna
Cy-3-glu cianidina-3-glucosido
DPPH 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo
Ea energía de activación
EIC extracto de Ivilan crudo
EIP extracto de Ivilan puro
ESI-MS espectrometría de masas por ionización electrospray
ERM extracto rico en antocianinas monoméricas
ERP extracto rico en antocianinas poliméricas
EROS especies reactivas de oxígeno
FD factor de dilución
GIPIB grupo de investigación en productos de importancia biológica
HPLC-DAD cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
HPLC-MS cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
HPLC cromatografía líquida de alta eficiencia
K el constante de degradación
 $\lambda_{vis-max}$ Longitud de onda de máxima absorción en la región visible
MS espectrometría de masas
ODS octadecilsilano
PA presencia de luz
PL presencia de luz
Rf factor de retención
RMN ^1H resonancia magnética nuclear protónica
RP-HPLC cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa
TA temperatura ambiente
TEAC capacidad antioxidante equivalente al trolox
TFA ácido trifluoroacético
TLC Cromatografía de capa fina
Tr tiempo de retención
 $t_{1/2}$ tiempo de vida media

INTRODUCCION

El estudio de los colorantes de origen natural como aditivos para alimentos, es un área de gran interés científico, debido a la creciente necesidad por sustituir los colorantes artificiales con efectos tóxicos para la salud.

Las antocianinas, son los colorantes naturales más ampliamente utilizados en la industria alimenticia, por ejemplo, actualmente se usan extractos obtenidos de bayas de sauco, piel de uvas, repollo rojo, arándano azul,¹ también se han sugerido muchas fuentes de antocianinas como la mora,² bananos silvestres,³ maíz⁴, zanahoria negra⁵, etc. La alta demanda de este tipo de pigmentos, se debe a su solubilidad en agua, a que imparten diversos colores, y además por que presentan actividad biológica.

Debido a la variedad de pisos térmicos que posee Colombia y en especial el departamento de Nariño⁶, existe una gran biodiversidad de frutas, sin embargo el conocimiento sobre la composición química de los pigmentos que generan su color es aún desconocido, llevando a un aprovechamiento nulo o inadecuado de este inmenso recurso natural, que puede aportar grandes avances en diversos campos de la ciencia.

En las zonas alto-andinas nariñenses crece un arbusto conocido como Ivilan (*Monima Obtusifolia*) el cual posee frutos con pulpa y cascara de color azul púrpura, su intenso color generó el interés en el estudio no solo de los compuestos químicos responsables de su color (potencial aditivo para alimentos), sino también, por su posible actividad biológica a nivel in vitro. Es conocido que los pigmentos que dan color a las frutas son compuestos polifenólicos, a los que se les atribuyen diversos beneficios para la salud humana, como son, tratamiento de desórdenes neurodegenerativos⁷, células cancerígenas⁸, problemas del corazón, diabetes⁹ y arterioesclerosis¹⁰.

¹ SCHWARZ, M; and HILLEBRAND, S. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of the anthocyanin. En: Biochemical engineering journal. Vol. 14, No. 3 (jun. 2003); p. 179.

² SPEDES, C and HAFIDI, M. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristoteliachilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. En: Food Chemistry. Vol. 107 (ago. 2008); p. 823.

³ KASIPONG, K and PONGSAGON, P. Anthocyanin Composition of Wild Bananas in Thailand. En: Journal agricultural and food chemistry. Vol. 56 (jun. 2008); p. 10854.

⁴ CHUN, Y and HEE, W. Corn Husk as a Potential Source of Anthocyanins. En: Journal agricultural and Food chemistry. Vol. 56 (mar. 2008); p. 114.

⁵ KIRCA, A and OZKAN, M. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. En: Food chemistry. Vol. 97, No. 4 (ago. 2006); p. 599.

⁶ Departamento de Nariño, Informe Departamental de Evaluación del Desempeño de la Gestión Municipal, período 2005, San Juan de Pasto, 2006, p. 107.

⁷ MIGUEL, G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory Activities. En: Journal of Applied pharmaceutical Science. Vol. 06 (jun. 2011); p. 13.

Desde esta perspectiva, en esta investigación se planteó realizar un estudio químico de los pigmentos mayoritarios tipo antocianinas presentes en el fruto de Ivilan, esta metodología constó de los siguientes pasos básicos. En la primera parte se aislaron, purificaron e identificaron las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto, con métodos como espectroscopia UV- Vis, cromatografía en columna, cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) y resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H). En la segunda parte, se evaluó su estabilidad frente a factores como el pH, luz y temperatura. Finalmente en la tercera parte se estudió la capacidad antioxidante in vitro de los extractos y de las antocianinas mayoritarias mediante la técnica TEAC (capacidad antioxidante equivalente al trolox).

De este modo, se realizó un aporte al conocimiento científico no solo del tipo de pigmentos presentes en el fruto, sino también de su estabilidad y capacidad antioxidante in vitro. Los resultados obtenidos en esta investigación, permiten sugerir al fruto de Ivilan como posible aditivo en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica¹¹, llevando a un aprovechamiento más integral del fruto.

⁸ BERMUDEZ, M and LARROSA, M. Up-regulation of tumor suppressor carcino embryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. En: Journal of Nutritional Biochemistry. Vol. 18 (may. 2007); p. 2561.

⁹ RUFINO, M and ALVES, R. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. En: Food Research International. Vol. 44, No. 7 (ago. 2011); p. 2073

¹⁰ BRIDLE, P and TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as Natural food colours- select aspects. En: Food chemistry. January. Vol. 58, No. 1 (Feb. 1997); p. 108.

¹¹ GIUSTI, M and WROLSTAD, R. Acylated anthocyanin from edible sources and their applications in food. En: Biochemical engineering journal. Vol. 14, No. 3 (jun. 2003); p.224

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar purificar e identificar las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto de Ivilan (*Monima obtusifolia*) y determinar su estabilidad y capacidad antioxidante in vitro.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer y purificar las antocianinas mayoritarias presentes en el fruto del Ivilan (*Monima obtusifolia*) mediante la extracción con solvente y el fraccionamiento por medio de técnicas cromatográficas.
- Identificar por medio de la espectroscopia UV-Vis, resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC las antocianinas mayoritarias del fruto de Ivilan (*Monima obtusifolia*).
- Evaluar la estabilidad del extracto crudo y de la fracción de polifenoles purificada frente a factores como pH, luz y temperatura.
- Evaluar la capacidad antioxidante in-vitro de las antocianinas mayoritarias por medio del método TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox).

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 ANTECEDENTES.

Si bien se encuentran diversas publicaciones sobre la caracterización de antocianinas en diversos frutos, en la actualidad no se han publicado estudios relacionados con la extracción, purificación y caracterización de pigmentos tipo antocianinas presentes en el fruto del Ivilan.

A continuación se discuten brevemente algunos de estos trabajos.

Recientemente Zheng y colaboradores (2011), identificaron y cuantificaron catorce antocianinas, (la mayoría aciladas) contenidas en la *L. ruthenicum*, usando técnicas como cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) y cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de espectrometría de masas con ionización electrospray (HPLC-ESI-MS)¹². También LIU Liang y colaboradores (2011), evaluaron, la cinética de degradación térmica de tres antocianinas obtenidas de la naranja sanguina a diferentes temperaturas (70, 80 y 90 °C) determinando parámetros como la constante de degradación (K), tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y energía de activación (E_a)¹³.

De igual manera SEYIN y colaboradores (2008), determinaron la capacidad antioxidante (TEAC) de las antocianinas contenidas en el arándano azul (*Vaccinium macrocarpon* Ait. cv. Pilgrim)¹⁴.

A nivel nacional Martínez, J y colaboradores, realizaron estudios de estabilidad de antocianinas en Jugo y concentrado de Agraz (*Vaccinium meridionale* Sw)¹⁵, en este trabajo se estudió la cinética de degradación térmica de las antocianinas y la degradación por almacenamiento a diferentes condiciones.

Asimismo Ramírez R y Quiñones W, desarrollaron una investigación de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos, en este trabajo se reporta el perfil químico de las antocianinas de los frutos de la mora, del mortiño y del tomate de árbol, así como también su capacidad antioxidante¹⁶.

¹² ZHENG, J and CHENXU, D. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. En: Food Chemistry. Vol. 126 (abr. 2011); p. 864.

¹³ LIANG, L and CAO, S. Thermal Degradation Kinetics of Three Kinds of Representative Anthocyanins Obtained from Blood Orange. En: Agricultural Sciences in China. Vol. 10 (abr. 2011); p. 648.

¹⁴ SEYIN, C and ELIK, A. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. En: Scientia Horticulturae. Vol. 117 (May. 2008); p. 347.

¹⁵ MARTÍNEZ, J y ZAMBRANO, H. Estabilidad de antocianinas en Jugo y Concentrado de Agraz (*Vaccinium meridionale* Sw). En: Revista facultad nacional de agronomía, Medellín. Vol. 64, No. 1 (mar. 2011); p. 6018

¹⁶ RAMÍREZ, R y QUIÑONES, W. Perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos. En: scientia et technica. Vol. 13. No. 033 (may. 2007); p. 276

Finalmente el grupo de investigación GIPIB (Universidad de Nariño) ha evaluado la composición, estabilidad¹⁷ y actividad antioxidante in vitro del fruto de motilón¹⁸ y del fruto de mortiño¹⁹.

2.2 MARCO CONTEXTUAL

De acuerdo a la clasificación taxonómica, realizada en el herbario de la Universidad de Nariño, un ejemplar de la planta se clasificó como *Monima Obtusifolia* y la describe como un arbusto de crecimiento lento que alcanza una altura entre 1y 2 metros, esta especie está distribuida en Colombia a lo largo de la región andina, a una altura entre los 2500-3300 m.s.n.m. Se conoce que en la zona nariñense se encuentra en municipios como Ipiales, Tuquerres, Cumbal, Guachucal y en los alrededores de Pasto como Genoy, Nariño, san Fernando, entre otros.

Su fruto en estado maduro es de color azul purpura, contiene 1 semilla embebida en una pulpa del mismo color y tiene una apariencia muy semejante al mortiño. La forma varía entre redonda y ovalada y pesa alrededor de 0,100 – 0,180g, tiene un sabor agradable y es tradicionalmente usada para el tratamiento de herpes simple, es una fuente potencial de antocianinas que podrían remplazar los colorantes sintéticos por su matiz atractivo, brillante y por su solubilidad de agua.

2.3 MARCO TEORICO

2.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo considerable de compuestos orgánicos presentes en la naturaleza que poseen al menos, un anillo aromático, con uno o más grupos hidroxilo unidos a él (esos grupos funcionales pueden ser sustituidos por esteres, metil-éster, glicósidos, etc...), aunque una definición más

¹⁷ BECERRA, Liliana; y Daza, Fredy. Estabilidad y capacidad antioxidante de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (*Hyeronimamacrocarpa*). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 58.

¹⁸ JIMENEZ, Juan; y Villareal, John. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilon (*Hyeronimamacrocarpa*). Trabajo de grado (química). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 103.

¹⁹ PORTILLO, Dairo; y VILLACRÉZ, José. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*vacciniumfloribumdum* H.B.K.). Trabajo de grado (química). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 128.

precisa se basa en su origen metabólico como aquellas sustancias derivadas del metabolismo de la ruta del ácido shikímico y de los fenilpropanoides²⁰.

Existe un alto interés en los compuestos fenólicos debido a su potencial actividad fisiológica que puede estar asociado a su actividad antioxidante in vitro, normalmente estos ensayos miden su habilidad para atrapar especies de oxígeno activo y electrófilos, de quelatar iones metálicos, su potencial para la auto oxidación y su capacidad para modular ciertas actividades enzimáticas celulares. A este tipo de compuestos se les han asignado diversas propiedades biológicas como anti-inflamatorios, antialérgicos, y actividad anticarcinogénica, además se han empleado como marcadores en estudios taxonómicos, y también se relacionan con la calidad alimentaria.

Con respecto a su papel como metabolitos de plantas, es necesario mencionar que los compuestos polifenólicos participan en el metabolismo de las plantas, siendo responsables de su crecimiento y muestran determinadas interacciones con otros organismos vivos. Existen evidencias que sugieren que estos compuestos son muy importantes no solo para los ciclos vitales de las plantas, sino también pueden servir como protectores de la radiación UV, una función crucial cuando las plantas están sometidas a altas dosis de radiación²¹.

Los compuestos polifenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, principalmente en forma de subproductos generados por el metabolismo, apareciendo como metabolitos secundarios en todas las plantas.

Este tipo de compuestos se puede clasificar como fenoles simples, fenilpropanoides, taninos, quinonas y flavonoides²² que pueden acumularse como productos finales de dos rutas bioquímicas distintas tal como se refleja en el esquema mostrado en la figura 2²³.

2.3.1.1 Fenoles simples. Se obtienen por hidrólisis acida de los tejidos de las plantas, muchos de ellos son compuestos monoméricos de polifenoles poliméricos como hidroquinona, resorcinol, catecol, ácido salicílico y timol.

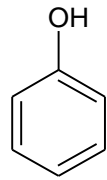
²⁰ SALDAÑA, M. Efecto de la Copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (*Prunus domestica*). México D.F, 2004, Trabajo de grado (Licenciatura en Quimicofarmacobiología). Universidad Las Américas. Escuela de ciencias. Departamento de Química y Biología. P.53.

²¹MARTINEZ, G. Los flavonoides. propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutrición hospitalaria. Vol. 17, No. 6 (Ago. 2007); p. 276.

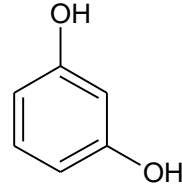
²²CAO, G and SOFIC, E. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids. En: Structure- activity relationships, Free Radical Biology and Medicine. Vol. 22, No. 5 (jun. 1997); p. 754.

²³ PIÑEIRO, Z. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Puerto Real, 2005, Tesis (doctorado en ciencias químicas). Universidad de Cádiz. Departamento de química analítica. p. 132.

Figura 1. Estructura básica y ejemplo de un fenol simple



Fenol

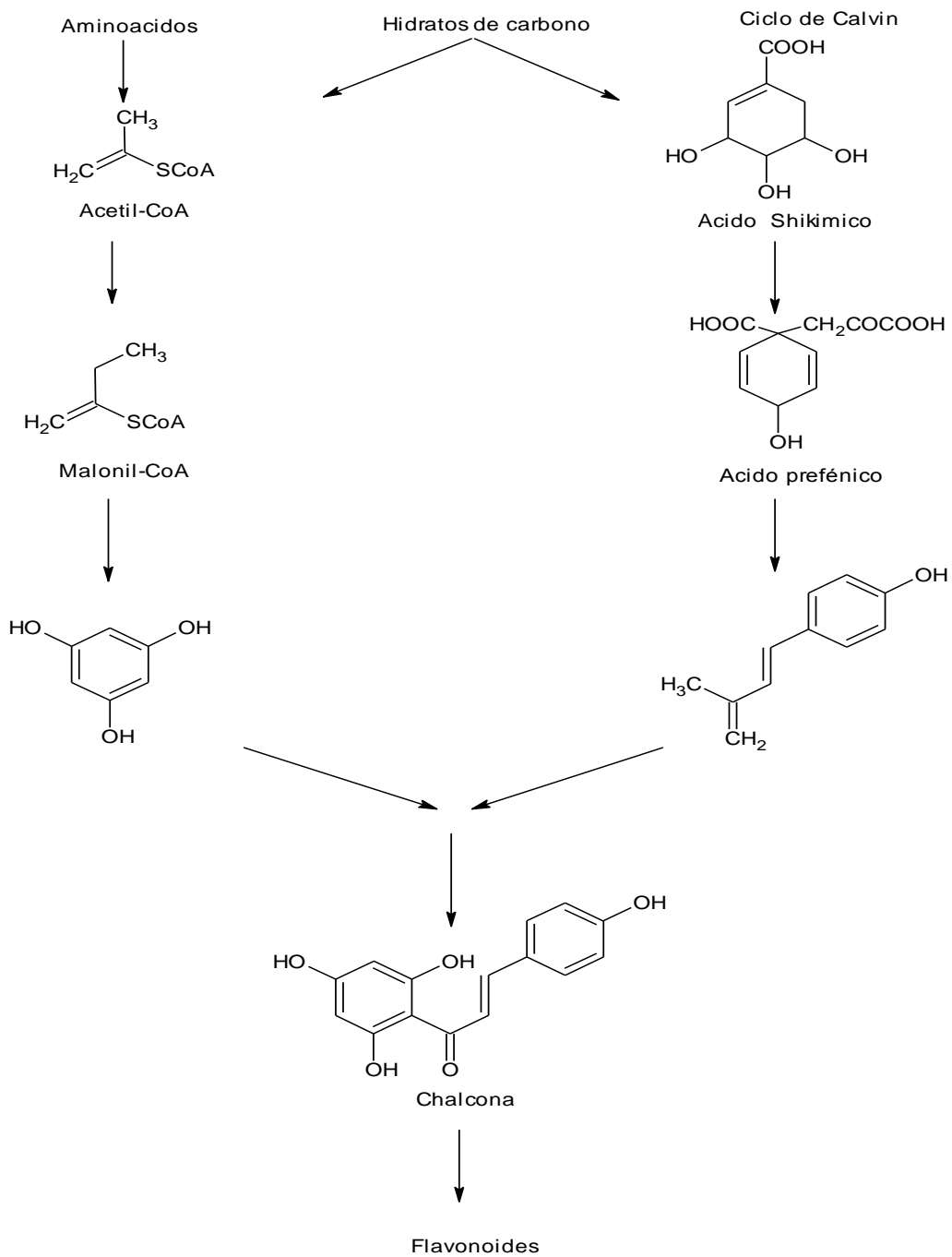


Resorcinol

Fuente. MARTINEZ, G, (2007)²⁴

²⁴ MARTINEZ, G. Op. Cit, p. 274.

Figura 2. Esquema de las rutas biosintéticas de los flavonoides

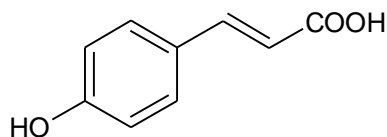


Fuente, PIÑEIRO Z, (2005)²⁵

²⁵PIÑEIRO.Op. Cit. p., 6.

2.3.1.2 Fenilpropanoides. Contienen tres átomos de carbono unidos a un fenol, no solubles en agua. Algunos ejemplos incluyen hidroxicumarinas, fenilpropanos y lignanos, también varios tipos de ácido hidroxinámico, como ácido cumárico.

Figura 3. Estructura de un fenilpropanoide

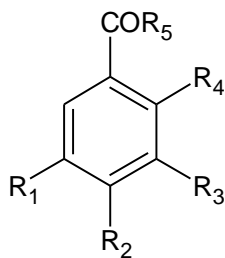


Acido Cinámico

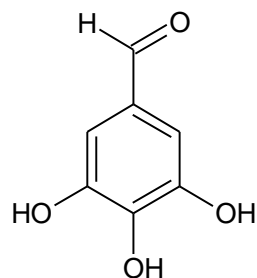
Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

2.3.1.3 Taninos. Son constituyentes de los tejidos leñosos de los árboles. Los taninos reaccionan con proteínas y forman copolímeros insolubles en agua, esta reacción es muy utilizada industrialmente, para convertir la piel animal en cuero.

Figura 4. Estructura básica y ejemplo de un tanino



Tanino



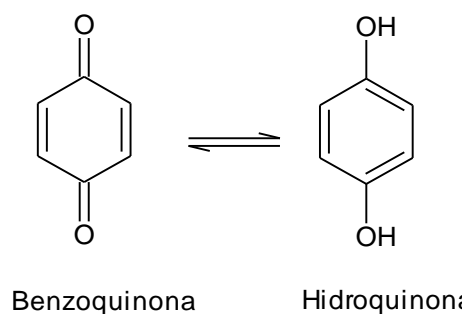
Acido Galico

Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

2.3.1.4 Quinonas. Son compuestos coloreados que absorben luz en la región visible, sin embargo ellos se encuentran en las regiones internas de la planta y esto no imparte color al exterior de ella. Generalmente las quinonas son derivados de benzoquinonas, naftoquinonas o antroquinonas²⁶.

²⁶ MARTINEZ, G. Op. Cit.p., 276.

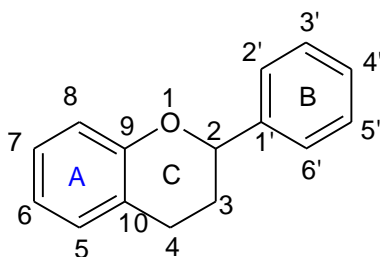
Figura 5. Estructura de una quinona



Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

2.3.1.5 Flavonoides. Es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales, que, como otros principios activos, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos). Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6²⁷, compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' como se indica en la figura 6²⁸.

Figura 6. Estructura básica de un flavonoide



Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

Farmacológicamente, los flavonoides se destacan por su baja toxicidad, presentando en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). Asimismo, tienen

²⁷ LÓPEZ, M. Flavonoides. En: OFFARM. Vol. 21, No. 4 (Abr. 2002); p. 1011.

²⁸ MARTINEZ, G. Op. Cit. p., 272.

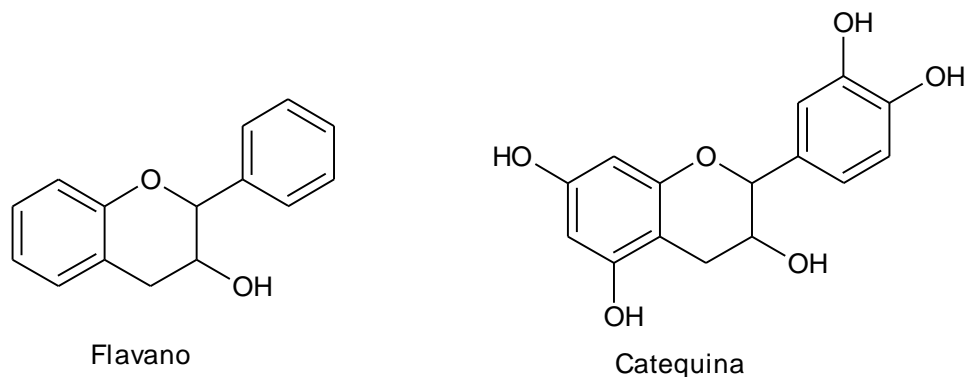
efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas²⁹.

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en.

a. Flavanos, como la catequina, tiene un grupo OH en posición 3 del anillo C.

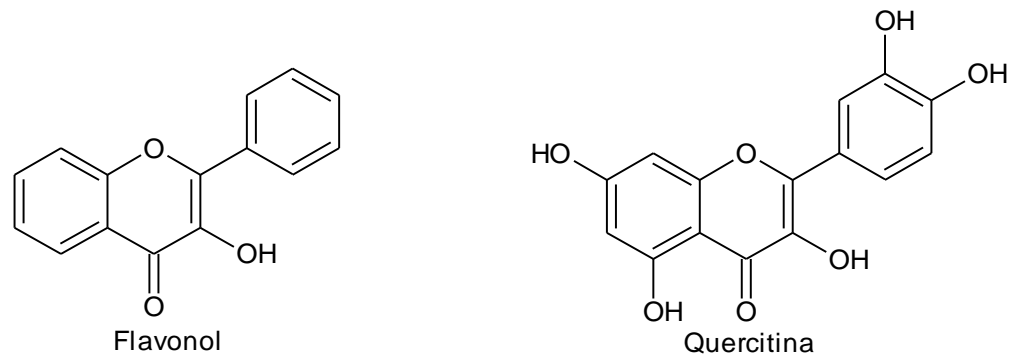
Figura 7. Estructura básica y ejemplo de un flavano



Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

b. Flavonoles, representados por la quercitina, posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C.

Figura 8. Estructura básica y ejemplo de un flavonol

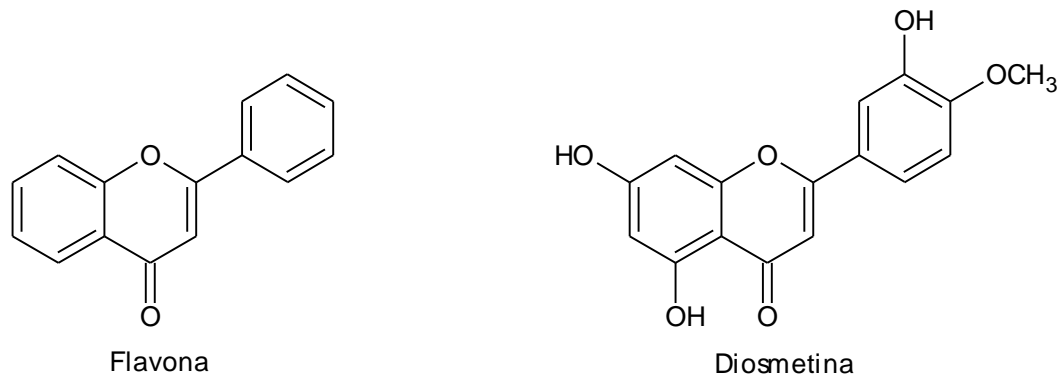


²⁹LÓPEZ, M. Op. Cit. p., 109.

Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

- c. Flavonas, como la diosmetina, posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

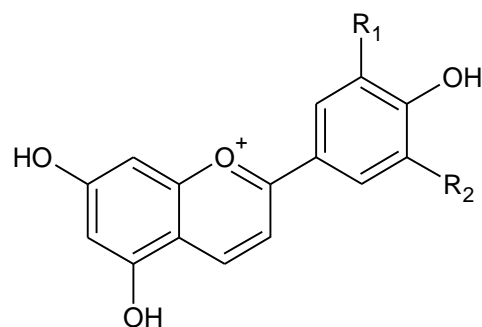
Figura 9. Estructura básica y ejemplo de una flavona



Fuente. MARTINEZ, G, (2007)

- d. Antocianidinas, tiene unido el grupo OH en la posición 3 pero además posee un doble enlace entre los carbono 3 y 4 del anillo C.

Figura 10. Estructura básica de una antocianidina

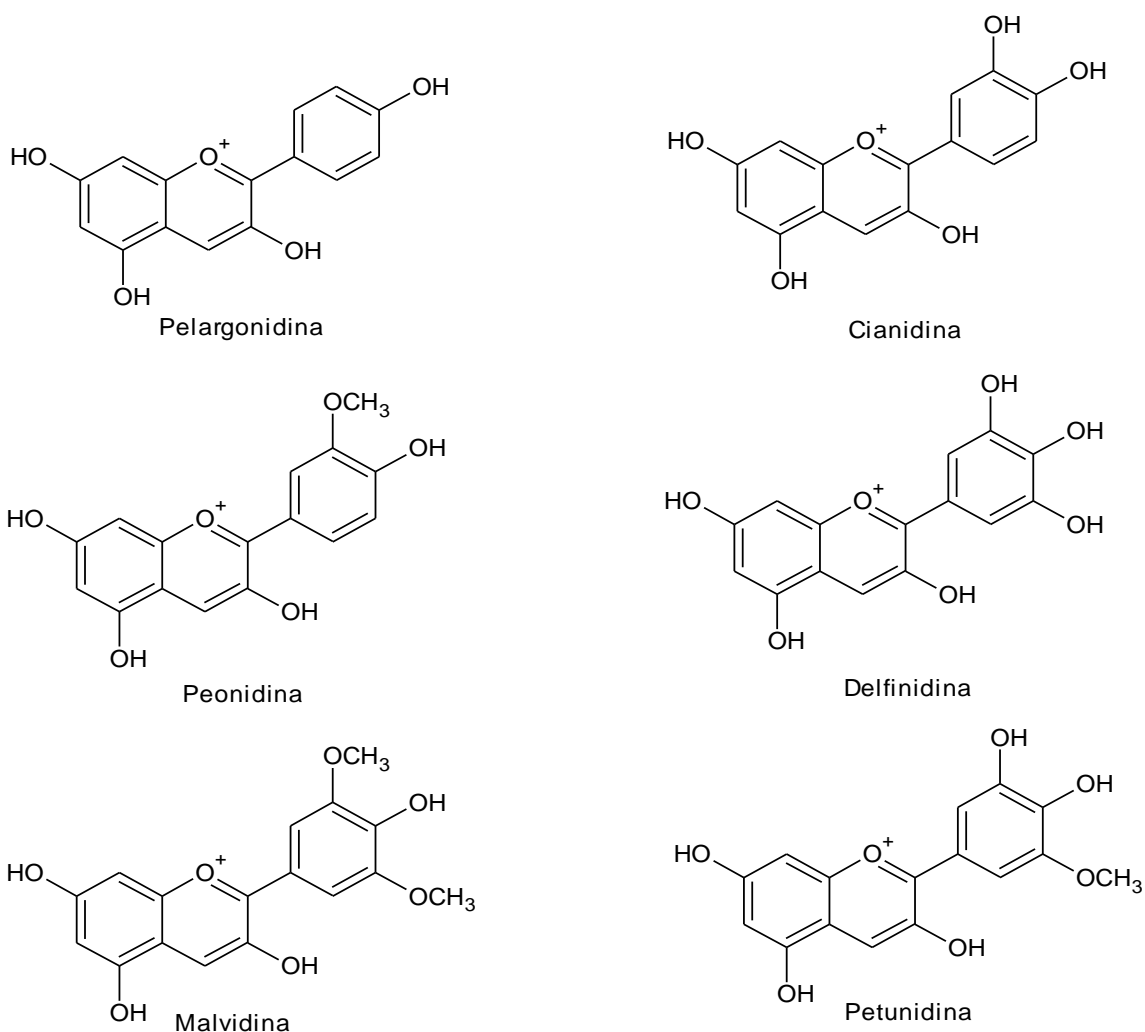


Fuente. MARTINEZ, G, 2007³⁰

Las formas más comunes de antocianidinas identificadas en alimentos son: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina, y petunidina (Figura 11)³¹.

³⁰ MARTINEZ, G. Op. Cit.p., 272.

Figura 11. Estructura de las antocianidinas naturales más importantes



Fuente REIN, (2005)³²

2.3.2 Antocianinas

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en

³¹EFFENDI, L and YAJUN, Y. Strain Improvement of Recombinant Escherichia coli for Efficient Production of Plant Flavonoids. En: Molecular pharmaceuticals. Vol. 5, No. 2 (Febr. 2008); p. 257.

³²REIN, Maarit. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Finland, 2005. Trabajo de grado. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology. p 38.

varias frutas, vegetales y cereales, y se encuentran acumulados en las vacuolas de la célula. Las antocianinas poseen diferentes funciones en la planta como son la atracción de polinizadores para la posterior dispersión de semillas y la protección de la planta contra los efectos de la radiación ultravioleta y contra la contaminación viral y microbiana³³.

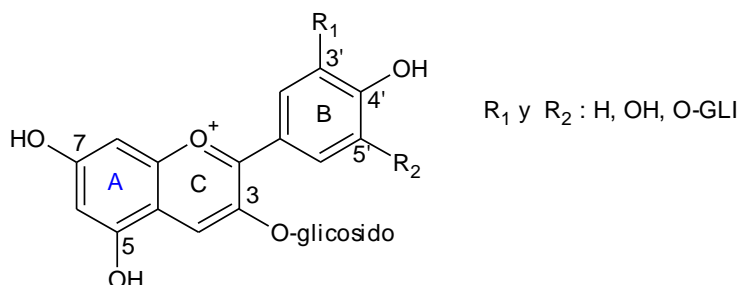
El alto interés hacia este tipo de pigmentos, se debe a su uso como colorante natural, y a sus potenciales propiedades con efectos beneficios para la salud como antioxidante, anti-inflamatorio y con propiedades pro-cardiovasculares³⁴.

Estos hechos nos permiten proponer en este proyecto la evaluación de la composición química y su actividad biológica in vitro.

2.3.2.1 Estructura de las antocianinas

Químicamente las antocianinas son glicósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio, también llamado 2-fenil-benzopirilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión (figura 12)³⁵.

Figura 12. Estructura básica de las antocianinas



Fuente POO, (2005)

Las diferencias individuales entre las antocianinas dependen del número de grupos hidroxilo, la naturaleza y número de azúcares que están unidos a la

³³GARZÓN, M. LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS. En: Acta biológica Colombiana. Vol. 13, No. 3 (feb. 2008); p. 23.

³⁴WANG, Z; WANG, P and QING, Q. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* Berry. En: Food chemistry. Vol. 125, No. 3 (Ago, 2011); p. 119.

³⁵POO, Susan. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nanofiltración. Chile, 2005. Trabajo de grado (licenciado en ciencia de los alimentos). Universidad austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de ingeniería en alimentos. p. 31.

molécula, a la posición de esa unión y la naturaleza y número de ácidos aromáticos y alifáticos unidos al azúcar³⁶.

Las clases comunes de glucósidos que se unen a la aglicona son: 3-monósido, 3-biócido y 3-triócido, así como también 3,5-diglicósido y más raramente el 3,7-diglicósido con glucosa, galactosa, arabinosa (es uno de los más frecuentes) y xilosa.

Además de la glicosilación, la introducción de moléculas aciladas es un efecto que ocurre ampliamente, los grupos comunes de acilo son los ácidos aromáticos de los cuales los más encontrados son ácidos hidroxicinámicos, p-cumárico, cafeico y ferúlico, y más raramente el hidroxibenzoico y los ácidos alifáticos como el ácido acético, malónico, succínico³⁷.

2.3.2.2 Métodos de extracción y separación de antocianinas. Los flavonoides se encuentran accesiblemente en todas las partes de la planta, por lo tanto el método de aislamiento depende tanto de la fuente de donde se desea extraer como del tipo de flavonoide que se va a analizar. En general la extracción con solventes es la técnica más utilizada, pese a que implica la co-extracción de los compuestos no fenólicos tales como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas que requieren procesos posteriores de purificación; los solventes usados para la extracción se eligen de acuerdo a la polaridad del flavonoide de interés.

En el caso de las antocianinas se utilizan solventes polares los cuales son útiles en la extracción a partir de diversos tipos de material vegetal, como hojas, tallos, raíces, semillas y frutos. Los solventes más ampliamente utilizados son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona acidificados, no obstante la extracción con metanol que contiene ácido es la más eficiente. Sin embargo se debe evitar el uso de ácidos fuertes debido a que puede descomponer las antocianinas por hidrólisis. Por este motivo, la extracción de antocianinas se realiza preferiblemente usando ácidos orgánicos como ácido acético, ácido fórmico, ácido trifluoroacético entre otros³⁸.

En cuanto a la separación de las antocianinas generalmente se utiliza cromatografía de papel o también de columna, lo cual implica el uso de resinas adsorbentes tales como, amberlita, polivinilpirrolidina (PVP), Sephadex, talco y

³⁶ MUÑOZ, Isabel; y ROJAS, Víctor. Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de vitisvinifera en aortas de rata sometidas a estrés oxidativo. Chile, 2005. Trabajo de grado (licenciado en kinesología). Universidad de Chile. Facultad de medicina. Escuela de kinesología. p 15.

³⁷ JIE, Z and CHENXU, D. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. En: Food Chemistry. Vol. 126 (Nov. 2010); p. 860.

³⁸ CASTAÑEDA, A; HERNÁNDEZ, M; HERNÁNDEZ, E and RODRÍGUEZ, A. Chemical studies of anthocyanins. En: Food Chemistry. Vol. 113 (nov. 2009); p. 868.

resinas de intercambio iónico³⁹. Asimismo cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) siendo esta la principal técnica de separación de análisis de alimentos, especialmente para antocianinas solubles en agua no volátiles, y térmicamente lábiles.

La mejor separación de antocianinas y antocianidinas se ha logrado utilizando HPLC en fase reversa (RP-HPLC)⁴⁰. Esta metodología ofrece excelentes separaciones y tiempos cortos de análisis. En la mayoría de los casos el diámetro de la partícula empaquetada se encuentra entre 3 y 10 μm . sin embargo se reportan muchos trabajos con partículas de 5 a 6 μm que ofrecen buenos resultados en términos de eficiencia y vida de la columna.

El ácido fórmico al 10 % (Peso/Volumen) es el más utilizado en columnas de fase reversa y proporciona un pH cercano a 1,9, también se puede utilizar otros ácidos como el acético, fosfórico, trifluoroacético y perclórico. Sin embargo el uso de solventes que tengan un pH mayor a 2 puede ocasionar baja reproducibilidad y un corto tiempo de vida de la columna por esta razón es recomendable utilizar columnas basadas en poliestireno, las cuales son estables en pH de 1 a 13, permitiendo su uso con fases móviles a pH cercanos en los que las antocianinas se encuentran totalmente en forma del catión flavilio⁴¹.

2.3.2.3 Cuantificación de antocianinas

Considerando al pH como uno de los principales factores del medio que afecta a la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros UV-Vis a diferentes valores de pH también varía y nos ayuda a determinar si las antocianinas están o no polimerizadas.

La concentración de las antocianinas entonces se determina con la absorbancia por el método del pH diferencia, este método se basa, en el efecto hipocromico causado por el cambio de pH y permite la estimación alternativa del contenido de antocianinas monoméricas, incluso en presencia de pigmentos polimerizados y otras interferencias.

Para la obtención de la concentración de antocianos totales se utiliza la fórmula del pH diferencial.

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH 1} - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{\lambda_{700}})_{pH 4,5}$$

³⁹HARBORNE, J; MABRI, T; and MABRI, H. THE FLAVONOIDS. 3ª. New York: chapman and hall. 1975. 1405 p.

⁴⁰ REBOLLO, S. estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Riberiro, valdeorras y ribeirasaca. España, 2007. Tesis (doctorado en ciencias químicas). Universidad de Santiago de compostela. Facultad de ciencias. Departamento de química analítica, nutrición y bromatología. p. 129.

⁴¹HOUNG, S. chromatographic analysis of anthocianins. En: journal of chromatography. Vol. 624, No. 30 (Oct. 1992); p. 230.

En donde $A\lambda_{vis-max}$ es la absorbancia en la longitud de onda máxima a pH 1 y pH 4,5 y $A\lambda_{700}$ es la lectura de absorbancia a 700 nm, tanto a pH 1 como a pH 4,5. Para calcular la concentración en la muestra original se utiliza la fórmula de antocianinas monoméricas.

$$\text{Antocininas monomericas} \left(\frac{mg}{L} \right) = \frac{(A * Pm * FD * 1000)}{\epsilon * l}$$

Donde

A = absorbancia antes calculada

FD = factor de dilución

Pm = peso molecular de la cianidina-3-glucosido (449,2 g/mol)

ϵ = absortividad molar de la cianidina-3-glucosido (26900 L/mol*cm)

l = espesor de la celda

El Pm y la ϵ usadas en la formula corresponde a la antocianina predominante en la muestra, si la muestra es desconocida, los resultados se expresan como miligramos de cianidina-3-glucosido (Cy-3-glu) en 1 litro de extracto. La concentración final de antocianinas monoméricas (mg de Cy-3-glu/100g de fruto) se calcula con base en el volumen del extracto y peso de la muestra.

Color polimérico. Mediante el uso de sistemas tampón, el empleo de un agente blanqueador, como el bisulfito de sodio y la medición por espectroscopia de UV-Vis en las longitudes de onda de 420 nm, 700 nm y a la λ de máxima absorbancia, se pueden determinar algunos índices o parámetros de color como:

- Densidad de color. expresa el color debido a antocianinas monoméricas o copolimerizadas presentes y las reacciones de oscurecimiento.
- Color polimérico. Expresa el color debido a antocianinas copolimerizadas y reacción de oscurecimiento (color resistente a la decoloración por bisulfito de sodio).
- Color por antocianinas. Expresa el color debido a antocianinas monoméricas que son rápidamente decoloradas por bisulfito de sodio.
- Porcentaje de color polimérico. Se define como la relación del color polimérico entre la densidad de color y expresa el porcentaje de color debido al material copolimerizado⁴².

Los cálculos para determinar los parámetros de color son:

⁴² LEYVA, D. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Oaxaca, 2009. Trabajo de grado (ingeniería de alimentos). Universidad tecnológica de la mixteca. p 65.

Muestra sin tratar con bisulfito de sodio

$$\text{Densidad de color (DC)} = [(A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700})] * FD$$

Muestra tratada con bisulfito de sodio

$$\text{Color polimerico(DC)} = [(A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700})] * FD$$

$$\text{Porcentaje de color polimerico (\%CP)} = \left(\frac{CP}{CD}\right) * 100$$

2.3.2.4 Métodos de caracterización de antocianinas

La caracterización de mezclas antocianicas usualmente involucra separación y recolección de cada compuesto, los pigmentos purificados pueden caracterizarse por métodos como espectroscopía de absorción UV-Vis, espectrometría de masas (MS), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y por resonancia magnética nuclear (RMN).

Actualmente, la espectroscopia UV-Vis es la técnica más utilizada debido a su simplicidad y bajo costo y porque además puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa, la técnica HPLC con detector de fotodiodos (PDA), ha sido también utilizado en la identificación y cuantificación de antocianinas, sin embargo el alto costo de compuestos de referencia y la dificultad para obtenerlos representa una desventaja en la utilización de esta técnica. Por lo que, la espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H y ^{13}C se han convertido en las técnicas preferidas para la identificación de las antocianinas⁴³.

a. Espectroscopia UV-Vis

la técnica UV-Vis puede suministrar información relevante de los aspectos estructurales de los flavonoides, es una técnica relativamente barata debido a que solo se necesita una pequeña cantidad de material puro, incluso una mancha producida por un flavonoide en cromatografía de papel contiene suficiente material para realizar un análisis espectral⁴⁴. Un ejemplo de esto es la información suministrada para las antocianinas, éste tipo de moléculas presentan dos bandas distintivas de absorción, una en la región UV (260 a 280 nm) y otra en la región visible (490 a 550 nm), adicionalmente la forma del espectro puede dar información sobre el número y la posición de sustituciones glucosídico y la

⁴³WROLSTAD, R and DURST,W. Tracking color and pigment changes in Anthocyanin products. En: Food Science & Technology. Vol. 16 (nov. 2005); p. 426.

⁴⁴MABRY, T; Markham, K; and Thomas, M. The Systematic Identification of Flavonoids. 1ª. New York: Springer-Verlag. 1970. 234 p.

presencia de acilaciones. La relación entre la absorbancia a 440 nm y la absorbancia a la $\lambda_{vis-max}$ ($A_{440}/A_{\lambda_{vis-max}}$) es casi el doble de las antocianinas con sustituciones glucosídico en la posición 3 en comparación con aquellas con las sustituciones en las posiciones 3 y 5 o la posición 5 solamente. Es decir si esta relación es cercana o mayor a 0,3, la glicosilación está en posición 3, pero si la relación es menor de 0,2, indica que la antocianina tiene dos glicosilaciones en las posiciones 3 y 5. Adicionalmente la presencia de sustituciones glucosídicos en otras posiciones (por ejemplo, 3,7-diglicosidos) pueden ser reconocidos debido a que presentan una curva espectral diferente a las que presentan las antocianinas con los patrones de sustitución común⁴⁵.

De otro lado, la presencia de acilaciones se ve reflejada en el espectro por la presencia de una tercera banda de absorción en la región de 310 a 360 nm, la relación de absorbancia a estas longitudes de onda ($A_{max-acil}/A_{\lambda_{vis-max}}$) da una estimación de la presencia de grupos de acilación de la siguiente manera, si esta relación es menor de 0,4 no hay acilación, entre 0,5 y 0,7 hay acilación. Este tipo de relaciones también se pueden presentar en términos de porcentaje (%)⁴⁶. El disolvente utilizado para la determinación del espectro afectará a la posición de las bandas de absorción, y por lo tanto se deben tener en cuenta al comparar los datos disponibles en la literatura científica.

b. Espectrometría de masas

El análisis de las antocianinas por espectrometría de masas tiene diferentes propósitos, entre ellos elucidación estructural, el estudio de las transformaciones del color rojo en el añejamiento del vino, polimerizaciones y reacciones con otros flavonoides⁴⁷.

Recientemente, las técnicas acopladas tales como HPLC-MS, APCI-MS, FAB-MS y ESI-MS se han convertido en herramientas muy poderosas para la identificación de las antocianinas⁴⁸.

En las últimas dos décadas, se han desarrollado numerosos métodos de ionización para muestras no volátiles y termodinámicamente inestable, como las antocianinas. Entre estas fuentes de ionización se encuentra FAB, ESI y MALDI, que se consideran fuentes de ionización suave, ya que causa la fragmentación muy baja y permiten determinaciones de pesos moleculares exactos. Estos

⁴⁵ GIUSTI, M and RODRIGUEZ, S. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. En: Journal of Food Science. Vol. 63, No 2 (mar. 1998); p. 221.

⁴⁶ WROSTAD, R and GIUSTI, M. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En Food Analytical Chemistry. (jun. 2001), F1.2.1.

⁴⁷ SKOUROUMOUNIS, G and HAYASAKA, Y. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 52 (nov. 2004); p. 7148.

⁴⁸ CASTAÑEDA, A; et al. Op. Cit. p., 867

métodos de ionización evitan la volatilización y posterior ionización y suministro de energía a la muestra sólida o líquida de diferentes maneras, de tal modo que haya formación directa de iones en fase gaseosa.

c. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La resonancia magnética protónica es muy utilizada para analizar estructuras de flavonoides. En un principio se utilizó para elucidar estructuras de flavonoides no polares como las isoflavonas y las flavonas metiladas o acetiladas las cuales son solubles en solventes como el cloroformo deuterado (CDCl_3) o el tetracloruro de carbono (CCl_4). Sin embargo la mayoría de los flavonoides y sus glicosidos son insolubles en estos solventes, problema que es solucionado al introducir el hexadeuterio dimetil sulfoxido (DMSO-d_6) como solvente⁴⁹.

El espectro de RMN ^1H de los flavonoides permite reconocer características estructurales importantes. Las antocianinas se pueden reconocer en sus espectros RMN ^1H por la señal en 8,9 (s, H-4) y las señales características de otros protones aromáticos.

Con la técnica RMN se han elucidado más de 620 antocianinas diferentes⁵⁰. Este método es muy valioso en la determinación de la naturaleza del azúcar sitios acilados y sustituciones. Cuando las antocianinas están puras se sigue un protocolo que describe la secuencia de experimentos de RMN (^1H , ^{13}C , CAPT, DQF-COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY y ROESY) que normalmente son suficientes para asignar la resonancia de los hidrogenos y carbonos de una antocianina. Con esta secuencia también se determina la posición de uniones entre antocianinas que están en forma de bloque⁵¹.

2.3.2.5 Estabilidad de color de las antocianinas

Las antocianinas aisladas, son altamente inestables y muy susceptibles a la degradación, su estabilidad es afectada por factores severos tales como el pH, los disolventes, la temperatura, la concentración de antocianinas, la estructura, el oxígeno, la luz, las enzimas, entre otros⁵².

⁴⁹LONGO, L and VASAPOLLO, G. Anthocyanins from bay (*Laurusnobilis* L.) berries. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 53, No. 20 (abr. 2005); p. 8063.

⁵⁰ØYVIND, M and TORGILS, F. Characterization of Anthocyanins by NMR. En: *Food Analytical Chemistry*. (2003) F1.4.1-F1.4.23

⁵¹ FROYTLOG, C and SLIMESTAD, R. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins—applied on blackcurrant (*Ribesnigrum*) fruits. En: *Journal of Chromatography*. Vol. 825, No. 1 (mar.1998); p. 89.

⁵²OVANDO, A; HERNÁNDEZ, M and RODRÍGUEZ, J. Chemical studies of anthocyanins. En: *Food Chemistry*. Vol. 113 (nov. 2008); p. 864.

a. Efectos Estructurales. Los grupos hidroxilo de la aglicona pueden estabilizar a las antocianinas, y posiblemente este efecto solo se genere bajo ciertas condiciones de pH, por ejemplo, la delfinidina-3-glucosido en metanol acidificado resulta más estable que la cianidina-3-glucosido en las mismas condiciones⁵³, pero en una solución búfer de pH 3,1 ocurre el efecto de estabilidad contrario.

En la mayoría de casos, los grupos metoxi disminuyen la estabilidad de las antocianinas. Por ejemplo, la cianidina-3-glucosido resulta más estable comparándola con la petunidina-3-glucosido. La peonidina-3-glucosido tiene un grupo metoxilo en posición 3' y presenta mayor estabilidad que la malvinidina-3-glucosido en cuya estructura se encuentran enlazados grupos metoxilo en posición 3' y 5'⁵⁴.

Entre monosacáridos, la galactosa confiere más estabilidad que la arabinosa y en general, un disacárido proporciona más estabilidad al pigmento que un monosacárido⁵⁵. Las acilaciones en los glicósidos aumenta la estabilidad de las antocianinas. A mayor número de acilaciones, las antocianinas presentan mayor estabilidad, la cual mejora si el grupo acilo enlazado al azúcar es aromático.

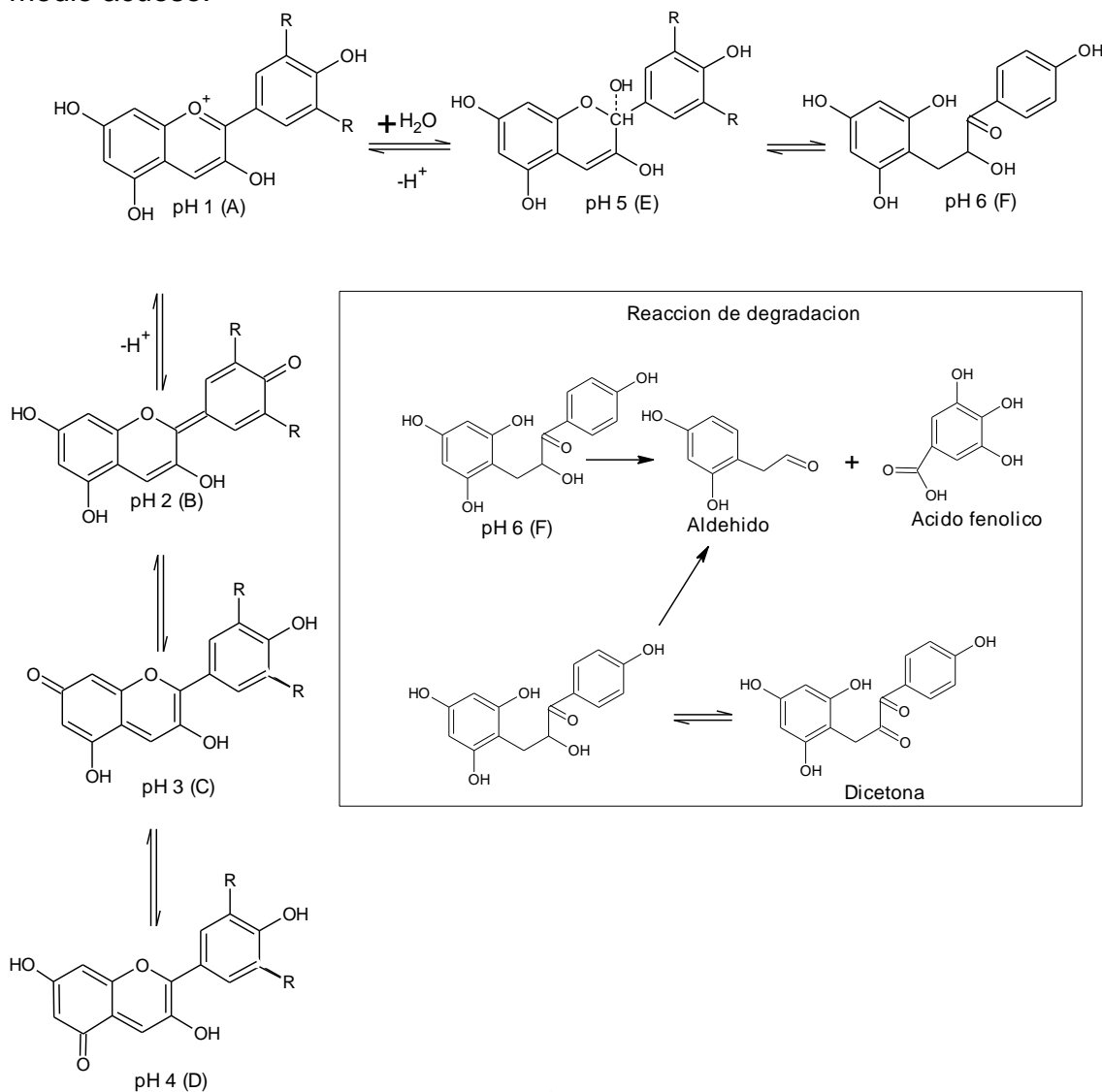
b. Efectos del pH. Las antocianinas pueden ser encontradas en diferentes formas químicas las cuales dependen del pH de la solución. A pH 1, el catión flavilio (color rojo) es la especie predominante y contribuye a los colores purpura y rojo (figura 12 A). A valores de pH entre 2 y 4 la especie quinoidal (azul) es la predominante (Figura 12B–D). A valores de pH entre 5 y 6 solamente dos especies pueden ser observadas, las cuales son la seudobase carbinol (Figura 12E) y una chalcona (figura 12F) respectivamente. A valores de pH por encima de 7, las antocianinas son degradadas, dependiendo de sus grupos sustituyentes (Figura 12, reacción de degradación). A valores de pH entre 4 y 6, coexisten cuatro formas estructurales de antocianinas el catión flavilio, la base quinoidal, la base carbinol y la chalcona. El equilibrio entre la base quinoidal y el carbinol ocurre vía el catión flavilio como se muestra en la Figura 13 en las estructuras D, A y E.

⁵³DAO, L; TAKEOKA G; EDWARDS R and BERRIOS, J. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. En: Journal agriculture food Chemistry. Vol. 46, No. 9 (Ago. 1998); p. 3567.

⁵⁴CABRITA, L and FOSSEN, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. En: Food chemistry. Vol. 63, No. 4 (abr.1998); p. 438.

⁵⁵ BROENNUM, H and FLINK, J. Anthocyanin colorants from elderberry (sambucusnigra L.), storage stability of the freeze dried product. En: Journal food technology. Vol. 20, No. 6 (Dic, 1985);p. 727.

Figura 13. Esquema de las cuatro especies en equilibrio de las antocianinas en medio acuoso.



Fuente. CASTAÑEDA, A; et al, (2009)⁵⁶.

c. Presencia de azúcar. Si bien la presencia de una función glucosa en la posición 5 de la molécula aumenta momentáneamente su estabilidad el mismo impedimento estérico de la molécula de glucosa (y la ausencia de un hidroxilo reactivo), en esta posición, imposibilitaría la intervención de este tipo de antocianinas en reacciones de cicloadición. En general los azúcares, tanto como sus productos de degradación, reducen la estabilidad de las antocianinas. En un

⁵⁶ CASTAÑEDA, A; et al. Op. Cit. p., 860

estudio hecho por Daravingas y Cain⁵⁷ todas las azúcar evaluadas (sacarosa, fructosa, glucosa, y xilosa) incrementaron la degradación de las antocianinas, comportándose todas del mismo modo. De los típicos productos de degradación de azúcar, el furfural acelera el deterioro del pigmento de antocianinas más prominentemente que el hidroxí – metilfurfural⁵⁸.

d. Efecto de la temperatura. La estabilidad de las antocianinas es afectada también por la temperatura. Con el aumento de temperatura cuando la antocianina se encuentra en un pH entre 2 y 4, ocurre una hidrólisis del enlace glicosídico, disminuyendo la estabilidad al formarse la respectiva aglicona, por lo cual también disminuye la intensidad del color⁵⁹. En general, los mismos factores estructurales, que aumentan la estabilidad de pH de las antocianinas, también incrementan su estabilidad térmica.

e. Efecto del oxígeno. Este factor degrada las antocianinas asociándose con otros factores como el pH, la temperatura y la luz. Sin embargo existe un efecto de estabilización en presencia de oxígeno cuando se disminuye el pH, dentro de los límites normales de un jugo de fruta, debido a que en estas condiciones el equilibrio entre la forma catiónica coloreada y la pseudobase incolora se desplaza hacia la estructura coloreada más estable⁶⁰.

f. Efecto de la luz. La luz afecta las antocianinas de dos formas diferentes. La luz es esencial para la biosíntesis de las antocianinas pero también acelera su degradación. Las antocianinas mantienen su color mucho mejor cuando son guardadas en la oscuridad. Algunas publicaciones muestran que una antocianina sustituida en la posición 5, es degradada por la luz en menos tiempo⁶¹.

g. Efecto de las enzimas. La desactivación de enzimas mejora la estabilidad de las antocianinas. Existen varias enzimas asociadas a la pérdida de color de las antocianinas, estas enzimas son de tipo endógenas y están presentes en la mayoría de los tejidos vegetales y generalmente han sido identificadas como

⁵⁷ DARAVINGAS, G; and CAIN, R. Thermal Degradation Of Black Raspberry Anthocyanin Pigment In Model Systems. En: Journal of Food Science. Vol. 33, No. 2 (mar. 1968); p. 139.

⁵⁸ CASASSA, F y CATANIA, C piranoantocianinos, nuevos pigmentos en los vinos tintos. En: enología. No. 3 (ago. 2006); p. 18.

⁵⁹ MACCARONE, E and RAPIARDAP. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. En: Journal food science. Vol. 50, No. 4 (Jul. 2006); p 901.

⁶⁰ ARAVENA, N y LAGOS, G. Evaluación de un extracto obtenido a partir de la fracción no exportable de mora cultivada var. BlacSatin (rubusssp.) para su posible utilización como colorante natural. Chile, 2004. Trabajo de grado (ingeniería de alimentos). Universidad del Bio-Bio. facultad de ciencias de la salud y alimentos. Escuela de ingeniería de alimentos. p. 52.

⁶¹ DELGADO, V; JIMENEZ, A and PAREDES, L. Natural pigments, carotenoids, anthocyanins, betalains-characteristic, biosynthesis, processing and stability. En: food science and nutrition. Vol. 40, No. 3 (May. 2000); p. 178.

glucosidasas o polifenol oxidasas las cuales catalizan la oxidación de compuestos fenólicos.

h. Efecto del ácido ascórbico. Investigaciones de Jackman⁶² sugieren que la degradación máxima de antocianinas ocurre bajo condiciones más favorables de oxidación del ácido ascórbico. Este ácido en presencia de oxígeno degrada las antocianinas, ya que forma peróxido de hidrógeno durante su oxidación, reacción que es acelerada por la presencia de flavonoides como la quercetina. El peróxido de hidrógeno rompe el anillo de pirilio atacando nucleofilicamente al C-2 produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina que posteriormente se destruyen o polimerizan formando precipitados de color café en las soluciones antocianicas⁶³.

i Copigmentación

La copigmentación es un fenómeno químico en el cual los pigmentos y otros compuestos orgánicos menos coloreados, o iones metálicos, forman moléculas o asociaciones complejas, generando un cambio o un incremento en la intensidad del color. En la ciencia alimenticia, este fenómeno es de gran importancia debido a que el color es uno de los factores cruciales para que un producto sea aceptable.

Los co-pigmentos son sistemas ricos en electrones π capaces de asociarse con iones flavilio, los cuales son pobres en electrones, esta asociación da protección al ataque nucleofílico del agua a la posición 2 del ion flavilio y por otras especies tales como peróxidos y dióxido de sulfuro en la posición 4. Los co-pigmentos son generalmente poco coloreados, pero cuando se mezcla con una solución antocianina, pueden aumentar la intensidad del color, produciendo un efecto hipercromico, y un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorbancia en el espectro de absorción UV-Vis hacia una longitud de onda mayor (efecto batocromico) o menor (efecto hipsocromico).

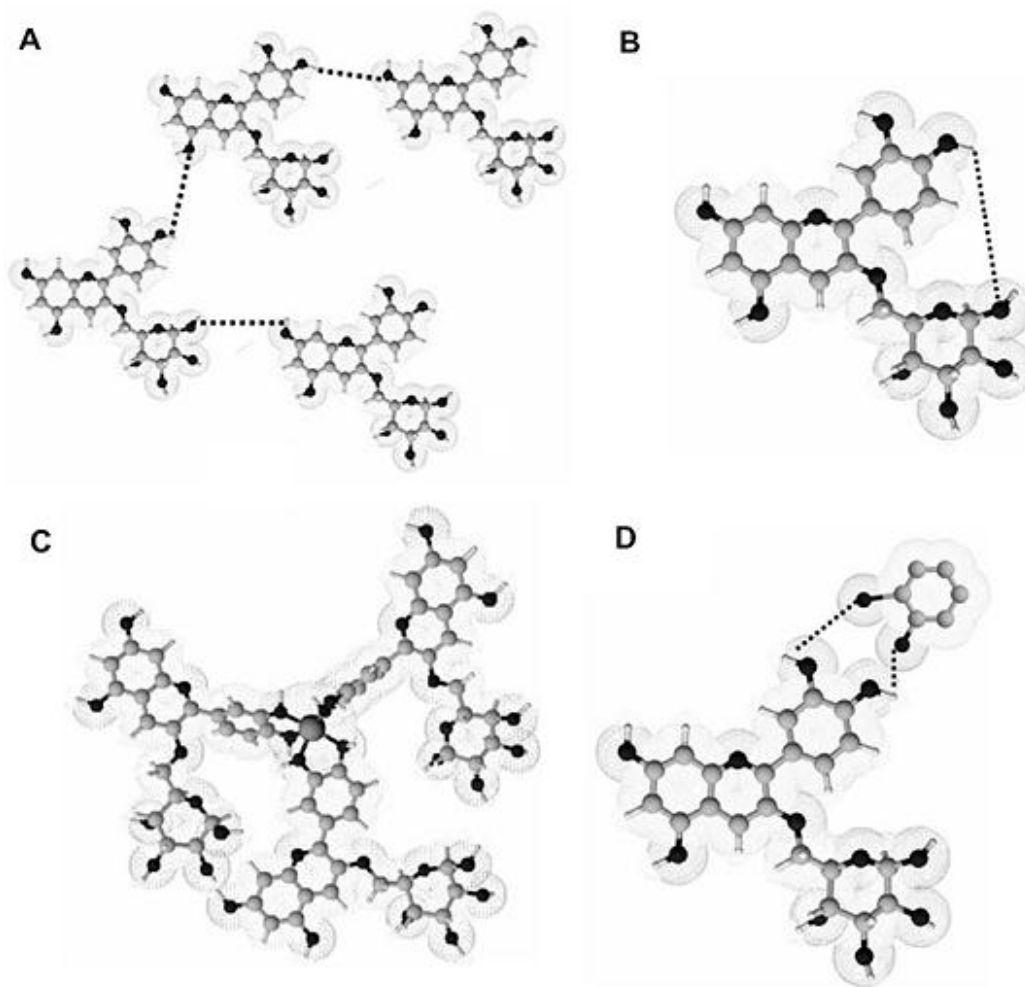
Los co-pigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, polisacáridos metales e incluso otras antocianinas. La interacción antocianina-co-pigmento puede llevarse a cabo de 5 modos diferentes dependiendo de la especie de interacción (figura 14). Si el co-pigmento es otra antocianina, existen interacciones de auto-asociación, intramoleculares e intermoleculares (figura 14) A y B, cuando la

⁶²JACKMAN, R; YADA, R; TUNG, M and SPEERS, R. Anthocynins as food colorants. En: Journal Food Biochemistry. Vol. 11, No. 3 (Sep. 1987); p. 231.

⁶³ HERNÁNDEZ, A. Estabilización de antocianinas extraídas de rosas rojas por medio de la copigmentación para su uso como colorante natural en la industria alimenticia y farmacéutica. México D.F, 2003. Trabajo de grado (licenciatura, químicofarmacobiología). Universidad de las Américas – Puebla. Departamento de biología. p. 15.

interacción es con un metal (figura A y C); finalmente en el caso más complejo, el co-pigmento puede ser una aglicona⁶⁴.

Figura 14. Interacciones antocianina-co-pigmento.



Fuente. CASTAÑEDA, A; et al, (2008)⁶⁵.

2.3.4 Capacidad antioxidante

2.3.4.1 Estrés oxidativo. Cuando el equilibrio entre radicales libres y antioxidantes se pierde en favor de los primeros, se desencadenan procesos dañinos que se asocian al desarrollo de numerosas enfermedades, lo que se denomina estrés

⁶⁴ CASTAÑEDA, A; et al. Op. Cit. p., 861.

⁶⁵ *Ibid.*, p. 863.

oxidativo, esto puede deberse a una disminución de los sistemas antioxidantes, un aumento de las especies pro-oxidantes o ambas.

2.3.4.2 Sistema antioxidante. A la permanente producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) que dañan estructuras biológicas, el organismo atenúa estos efectos deletéreos por medio de la acción de sistemas antioxidantes.

Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en pequeñas concentraciones en comparación a un sustrato oxidable, que retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato, y también estabiliza las EROS mediante la cesión de un H^+ y las convierte en compuestos no radicalarios.

Otras definiciones hablan de antioxidante como cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones comparada a las de un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato y que protege a los sistemas biológicos frente a efectos potencialmente perjudiciales tanto de procesos como reacciones que causan excesivas oxidaciones.

Existen diferentes sistemas de defensa antioxidante en el organismo. Uno de ellos está conformado por sistemas enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, siendo éstas la primera defensa contra los radicales libres que actúan neutralizando a estas especies altamente reactivas en moléculas menos dañinas para la célula. Otros sistemas, no enzimáticos, están conformados por compuestos como carotenoides, glutatión reducido y las vitaminas C y E que estabilizan las EROS o también que provocan la quelación de iones metálicos de elementos de transición como hierro y cobre, que al estar en estado reducido potencian su autooxidación y generación de anión superóxido.

Los antioxidantes aportados por la dieta disminuyen los efectos de las EROs, los alimentos que están constituidos por estas sustancias son cada vez más utilizados por las personas tanto por medio del consumo directo de vegetales y frutas que los incluyen, como también por medio del uso de fármacos. Entre los antioxidantes ingeridos por la dieta se destacan las vitaminas E y C, los betacarotenos, procianidinas, antocianinas y polifenoles⁶⁶.

2.3.5 Métodos de evaluación de la capacidad antioxidante in vitro.

2.3.5.1 Fenoles totales.

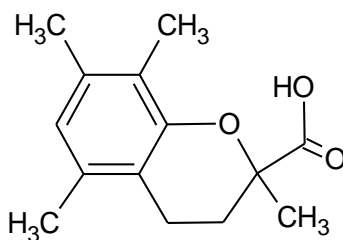
Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina y el de Folin-Ciocalteu. El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y

⁶⁶ MUÑOZ, I. Op.cit. p., 22

tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g de fruta.

2.3.5.2 Método TEAC. Actualmente el método ABTS ha sido ampliamente usado tanto para materiales biológicos, compuestos puros o extractos de plantas de naturaleza hidrófila o lipofílica. El compuesto cromógeno ABTS presenta color azul/verde con máximo de absorción a 342nm, es muy soluble en agua y químicamente estable. El radical $ABTS^{\bullet+}$ una vez generado por medio de enzimas (peroxidasa, mioglobina) o químicamente (dióxido de manganeso, persulfato potásico o ABAP [2,2'-azobis-(2-amidinopropeno) HCl], pasa a presentar nuevas características con máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm. El radical $ABTS^{\bullet+}$ es más indicado para ensayos de compuestos coloreados, como el caso de los antocianos, por presentar absorción máxima próxima a la región infrarroja (734nm) reduciendo posibilidades de interferencias de compuestos coloreados que absorben en la región del visible o compuestos resultantes de reacción secundaria. Además el radical generado químicamente (persulfato potásico) desarrollado por RE et al, fue validado por su estabilidad, reproducibilidad y por ser su economía⁶⁷.

Figura 15. Estructura de trolox



Fuente. BECERRA, et al. (2008)⁶⁸

2.3.5.3 Método DPPH. El procedimiento desarrollado por Brand-Williams utiliza como radical libre el 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo ($DPPH^{\bullet}$) de color violeta. Esta molécula se caracteriza por ser un radical estable, debido a la deslocalización de electrones sobre la molécula en su totalidad. La deslocalización provoca la

⁶⁷ KUSKOSKI, M; and ASUERO, A. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. En: ciencia y tecnología de alimentos. Vol. 24 (jun. 2004); p. 691.

⁶⁸ BECERRA, L. Op.cit. p., 49

aparición de un color violeta intenso caracterizado por la banda de absorción en una solución de etanol cerca a los 520nm.

Cuando una solución de DPPH se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno (AE), se genera la forma reducida de la molécula, cambiando su color violeta característico a un color amarillo que puede medirse a través del tiempo por medio de la absorbancia de la mezcla⁶⁹.

Con los datos de absorbancia debido a la decoloración de la solución, y utilizando diferentes concentraciones de antioxidante, se puede calcular la concentración del radical en el medio de reacción y también el porcentaje de DPPH• remanente. Con estos datos y las diferentes concentraciones se encuentra el parámetro EC₅₀ el cual indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de radical inicial a la mitad y el T_{EC50}, es decir el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario. De esta manera se puede determinar la eficiencia anti-radical el cual permite clasificar los antioxidantes y compararlos en términos de eficiencia anti-radical (EA). Cualitativamente los clasifica en: “Bajos” (EA ≤ 1x10⁻³), “Medios” (EA entre 1x10⁻³ y 5x10⁻³), “Altos” (EA entre 5x10⁻³ y 10x10⁻³) y “Muy altos” (EA > 10x10⁻³)⁷⁰.

⁶⁹ MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: Journal. Science technology. Vol. 26 (mar. 2004); p. 214.

⁷⁰ SANCHEZ, C and LARRAURI, J. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols- En: Journal of Science Food Agriculture. Vol. 78 (feb.1998); p. 274.

3. METODOLOGÍA

3.1 Equipos y reactivos. Es esta sección se muestra la lista de equipos y reactivos empleados para la realización de este trabajo.

3.1.1 Equipos

Centrifuga

Columna cromatográfica de 80 cm de largo y 3 cm de diámetro

Columna cromatográfica de 40 cm de largo x 3 cm de diámetro

Columna cromatográfica geminix C-18 (250 *10mm, 5µm)

Columna Phenomenex Luna (C18 100A, 250 x 4.6 mm)

Columna X-terraC-18 (100 mm 4.6 * mm, 3.5 µm)

Espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck

Espectrómetro Bruker avance 400

HPLC-MS Shimadzu QP2010, equipado con una columna Phenomenex Luna 5 µm C18 100A, 250 x 4.6 mm,

HPLC Waters 1525, con detector de arreglo de diodos DAD Waters 2998

Micropipetas 50-1000 µm

Papel watman N° 3

Rotaevaporador Heipolph

Termostato

Vortex

3.1.2 Reactivos

Acetato de etilo

Acetato de sodio

Acetonitrilo

Ácido ascórbico

Ácido acético glacial

Ácido clorhídrico

Ácido fórmico

Acido gálico

Ácido trifluoroacetico

ABTS

Amberlita XAD – 7 SIGMA

Butano

Citrato

Cloruro de potasio

Hexano

Metabisulfito de sodio

Metanol

Resina Lipophilic Sephadex LH-20

Reactivo de Folin

3.2. Recolección del material vegetal.

La recolección se realizó en la vereda Ipiapud del municipio de Guachucal en el departamento de Nariño. Las características del arbusto y su clasificación taxonómica, se determinaron en el herbario de la universidad de Nariño.

Se recolectó 2 Kg de fruto, que se seleccionó por el color más intenso y la firmeza que indicaron el estado maduro.

3.3 Extracción de pigmentos.

3.3.1 Preparación de la muestra. De la cantidad inicial obtenida (2Kg) se seleccionaron los mejores frutos por separación manual teniendo en cuenta parámetros como color, aroma y tamaño, hasta completar 1 kg de fruto (figura 16).

Figura 16. Fruto de Ivilan.



3.3.2 Obtención del extracto crudo del fruto. Una vez seleccionada la muestra se realizó la extracción de los pigmentos usando el método descrito por Jordheim et al⁷¹ con algunas modificaciones; es decir el fruto fue sometido a maceración química con una solución de metanol y ácido trifluoroacético (TFA) en relación 19:1; se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente (18 °C) y en oscuridad, transcurrido este tiempo se filtró y al residuo se adicionó solvente fresco, este proceso se repitió hasta decoloración total del fruto, posteriormente se mezclaron todos los filtrados y se llevó a centrifugación a 9000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se llevó a sequedad por medio de un rotaevaporador a 37 °C, al solido obtenido se le denominó extracto de Ivilan crudo (EIC).

⁷¹JORDHEIM, M. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Bergen, 2007. Tesis (postdoctor). University of Bergen. Department of chemistry. p. 82.

Como una primera aproximación de la presencia de antocianinas en el fruto de Ivilan se sometió el extracto del fruto a cambios de pH por medio de soluciones de NaOH 2N (pH >9), HCl 0,1M (pH= 1) y pH neutro.

3.4 Purificación del pigmento.

3.4.1 Separación de compuestos lipofílicos y medianamente polares. El EIC fue disuelto en 50 mL de agua y se sometió a lavados por triplicado con 20 mL de n-hexano, para eliminar compuestos lipofílicos y posteriormente con 20 mL de acetato de etilo, para eliminar compuestos medianamente polares.

3.4.2 Obtención de un extracto rico en antocianinas. El extracto acuoso parcialmente purificado (ver apartado 3.4.1), se cargó en una columna cromatográfica de 80 cm de largo y 3 cm de diámetro, empacada con amberlita XAD – 7 SIGMA (resina polar, no iónica) como fase estacionaria (figura 17). Para la elución de compuestos incoloros de baja polaridad, se utilizó 8 L de agua destilada. El extracto rico en antocianinas (que quedan retenidas en la columna) se eluyó con 1 L de solución de metanol-TFA en relación 19:1, el extracto fue concentrado a sequedad a 37 °C, al sólido obtenido se le denominó extracto de Ivilan purificado (EIP).

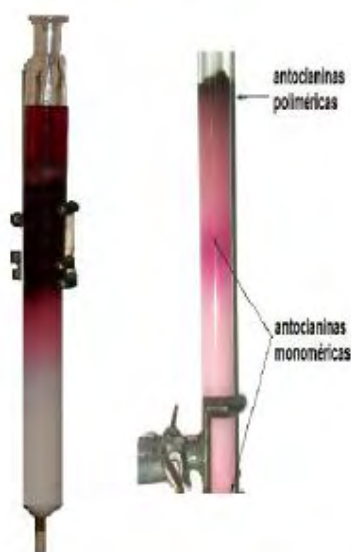
Figura 17. Separación de compuestos incoloros de baja polaridad por CC con amberlita XAD7.



3.4.3 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas. Utilizando una columna cromatográfica de 40 cm de largo x 3 cm de diámetro empacada con

una resina Lipophilic Sephadex LH-20 (figura 18) como fase estacionaria, se obtuvieron fracciones de antocianinas monoméricas y poliméricas a partir del EIP disuelto en metanol. La fracción de compuestos de bajo peso molecular (antocianinas monoméricas), se eluyeron con una mezcla de metanol/ ácido fórmico al 0,1 % en relación 1:4. La fracción de antocianinas poliméricas se eluyó con acetona /ácido fórmico al 0,1 % en relación 2:1. Para los dos casos se evaporó el solvente a sequedad a 37 °C de esta manera se obtuvo un extracto rico en antocianinas monoméricas (ERM) y un extracto rico en antocianinas poliméricas (ERP).

Figura 18. Separación de ERM y ERP por CC con sephadex.



3.4.4 Análisis por HPLC analítica. El extracto de Ivilan puro (EIP) y las fracciones separadas por Sephadex, (ERM y ERP), fueron analizados por HPLC analítica en un equipo Waters, (figura 19) con detector de arreglo de diodos DAD y equipado con una columna X-terraC-18 (100 mm 4.6 * mm, 3.5 μ m). Para el análisis fue necesario utilizar dos fases móviles, como solvente A se utilizó agua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación (87:3:10) y como solvente B agua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación (40:50:10), los cuales fueron previamente filtrados y desgasificados.

Para el acondicionamiento del sistema se dejó correr un flujo de 0,5 mL/min durante diez minutos al 100% de cada solvente. Con 1 mL de la fase móvil A se disolvieron 0,1 mg de cada una de las muestras y se filtraron con un cartucho de 0,45 μ m de diámetro de poro. Empleando un flujo de 0,8 mL/minuto, y un volumen de inyección de 20 μ L se realizó el análisis cromatográfico utilizando el gradiente mostrado en la tabla1.

Tabla N° 1. Gradiente de HPLC para la separación de antocianinas sobre columnas polimérica C18.

Tiempo (min)	Porcentaje A	Porcentaje B
0	94	6
10	80	20
20	60	40
25	50	50
30	94	6

Figura 19. Equipo HPLC Waters 1525



3.4.5 Purificación de antocianinas por HPLC preparativa. Al equipo HPLC descrito en el apartado 3.3.4 se le acoplo una columna cromatográfica geminix C-18 (250 *10mm, 5 μ m), antes de purificar las muestras se acondiciono la columna con acetonitrilo al 100% y después con una mezcla de las fase móviles A y B en relación 80:20 con un flujo de 2 mL/min durante quince minutos.

La separación de los 4 pigmentos mayoritarios presentes en el fruto de Ivilan fue realizada a partir del EIP y este se enriqueció con la fracción de ERM obtenido por sephadex. Para encontrar la mejor forma de separar los pigmentos, fue necesario realizar diferentes ensayos cambiando el gradiente de elución y el flujo.

Finalmente la separación fue realizada con elución isocrática, con una mezcla de las fases móviles A y B en relación 60:40 a un flujo de 2 mL/min y un volumen de inyección de 200 μ L de muestra a una concentración de 35 mg/mL.

3.5 caracterización del pigmento

3.5.1 Cromatografía de capa fina. El EIP fue analizado por cromatografía de capa fina usando como placa cromatográfica papel watman de 20 cm de largo x 3 cm

de ancho, como fase móvil se usó BAW una mezcla de solventes n butanol/ácido acético glacial/agua en relación 4:1:5⁷², (figura 20) a la fase móvil se le permitió un tiempo de ejecución de 6 h, luego se sacó la placa cromatográfica se dejó secar y se determinó los factores de retención.

Figura 20. Cromatografía de capa fina del EIP.



3.5.2 Caracterización por espectroscopia UV-Vis. Para la lectura de la absorbancia las antocianinas purificadas por HPLC preparativa se disolvieron en metanol-HCl al 1,0% y se realizó un barrido desde 200-800 nm (figura 21).

Figura 21. Espectrofotómetro Pharo Merck.



⁷² LOCK, O. COLORANTES NATURALES. 1ª. Lima: fondo editorial de la pontificia Universidad católica del, Perú 1997. 125 p.

3.5.3 Caracterización por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). El EIP se analizó por HPLC-MS con una columna Phenomenex Luna 5 μm C18 100A, 250 x 4.6 mm, las fases móviles y el gradiente de elución fueron los mismos empleados en la metodología de HPLC analítica (ver apartado 3.3.4). El voltaje del detector fue de 1.5 Kv, se trabajó con una Interfase electrospray (ESI), en modo positivo y un rango de masa de 100-1500

3.5.4 Determinación del espectro RMN ^1H de las antocianinas mayoritarias. Para verificar la estructura de las antocianinas mayoritarias separadas por HPLC tipo preparativa estas fueron analizadas por RMN ^1H , sin embargo este análisis solo fue posible realizarlo para los pigmentos 1, 2 y 4, (numeración asignada por el orden de elución) el pigmento 3 no fue posible analizarlo por esta técnica por la poca cantidad de muestra obtenida durante la separación.

3.6 Cuantificación de antocianinas

3.6.1 Antocianinas monoméricas. El contenido de antocianinas monoméricas en los extractos de EIC y EIP se determinó por espectroscopia UV-Vis con el método del pH diferencial, para esto se prepararon soluciones de igual concentración (0,5% p/v) de cada uno de los extractos a pH1 y a pH 4,5 que se ajustaron con soluciones de KCl/HCl (0,025 M) y $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ (0,4 M) respectivamente.

La solución a pH 1 se utilizó para determinar la longitud de onda de máxima absorción y el factor de dilución (FD) adecuado de tal forma que las mediciones sigan la ley de Beer.

Aplicando el FD antes calculado a cada una de las muestras, se midió la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck. Las medidas se realizaron por triplicado y la cantidad de antocianinas fue expresada como equivalentes de cianidina-3-glucosido/100 g de fruto.

3.6.2 Antocianinas poliméricas. El contenido de antocianinas poliméricas en los extractos de EIC y EIP se determinó por medio del método del pH sustractivo, para esto se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente una solución de KCl/HCl (0,025 M) a pH 1, se utilizaron las concentraciones, factores de dilución y longitudes de onda de máxima absorbancia calculados en la metodología de pH diferencial (ver apartado 3.5.1). Se transfirieron 2,8 mL de muestra diluida en 2 tubos de ensayo, al primer tubo se le adicionó 0,2 mL de metabisulfito de sodio al 40 % en agua y al segundo tubo se le agregó 0.2 mL de agua destilada. Pasados 15 minutos se midieron las absorbancias a 420 nm, a la

longitud de onda de máxima absorción y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck. La metodología se realizó por triplicado⁷³.

3.7 Determinación de la estabilidad

La estabilidad de las antocianinas fue evaluada a los extractos EIC y EIP y se tuvieron en cuenta variables como pH, temperatura, luz y presencia de aire y se determinó de acuerdo a la metodología realizada por Janna y Khairul 2006⁷⁴ así: para la degradación de las antocianinas frente al almacenamiento a diferentes pH, se prepararon soluciones de los extractos a pH 3 y 5 que se ajustaron utilizando soluciones búfer de citrato y acetato de sodio, posteriormente se almacenaron a temperatura de 4 °C y temperatura ambiente (± 18) en ausencia y presencia de aire y en ausencia y presencia de luz para esta última condición se usó un bombillo marca Phillips de 60 Vatios, todas las muestras expuestas a la luz se dispusieron a la misma distancia del bombillo de tal manera que se encontraran expuestas a las mismas condiciones. La degradación térmica de las antocianinas fue evaluada a 80 °C a pH 3 y pH 5, para esto se usó un termostato (figura 22) en el que se colocó las diferentes muestras que se sometieron a calentamiento a 80 °C durante diferentes tiempos, para detener el calentamiento en el tiempo determinado, se usó un baño de hielo.

Debido a dificultades previstas en el desarrollo de este análisis al combinar los factores, se prescindió algunos de ellos es decir a 4 °C no se realizó experimentos en presencia de luz debido a la dificultad de instalar en un refrigerador una fuente de luz constante, además los ensayos se realizaron en ausencia de aire; de igual forma los análisis a 80 °C se limitaron solamente con variación de pH, en presencia de aire y luz, debido a que cuando se utilizan altas temperaturas es imposible llevar a cabo la experiencia en ausencia de aire y luz.

⁷³WROSTAD, R; and GIUSTI, M. Op. Cit.p., f. 1.2.7

⁷⁴JANNA, O; and KHAIRUL, A. Anthocianin stability studies in tibouchinasemidecandra. En: journal of biochemistry and molecular biology. Vol. 101 (feb.2007); p. 1642.

Figura 22. Estabilidad térmica a 80°C.



3.8 Capacidad antioxidante in vitro

3.8.1 Fenoles totales. El contenido fenólico de los extractos EIC y EIP se determinó con el método de Folin Ciocalteau. Para esto se prepararon soluciones de los extractos de igual concentración (11.000 ppm).

En un balón aforado de 10 mL se adicionaron 0,1 mL de la solución a analizar y 0,5 mL de reactivo de Folin; después de 30 segundos y antes de 8 minutos se adiciono 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20 % p/v, se aforó a 10 ml con agua destilada y se dejó reposar durante 2 horas en baño maría a 24 °C. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura de absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck (figura 21). De igual manera se realizó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/ 100 g de fruta. El análisis se desarrolló por triplicado.

3.8.2 Método ABTS. Con este método se estudió la actividad antioxidante de las soluciones de EIC y EIP y de las cuatro fracciones obtenidas por HPLC preparativa. Se generó el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ tras la reacción de 192,21 mg de ABTS con 33.30 mg de persulfato potásico llevándolos a un volumen aforado de 50mL, se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia cercano a 1 en una longitud de máxima absorción de 734 nm.

Se tomó 3 mL de la solución de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ y se agregó 30 μL de la solución a estudiar. Se agitó con Vortex durante 1 minuto y luego de 6 minutos de reposo, se

leyó la absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Pharo Merck (figura 21).

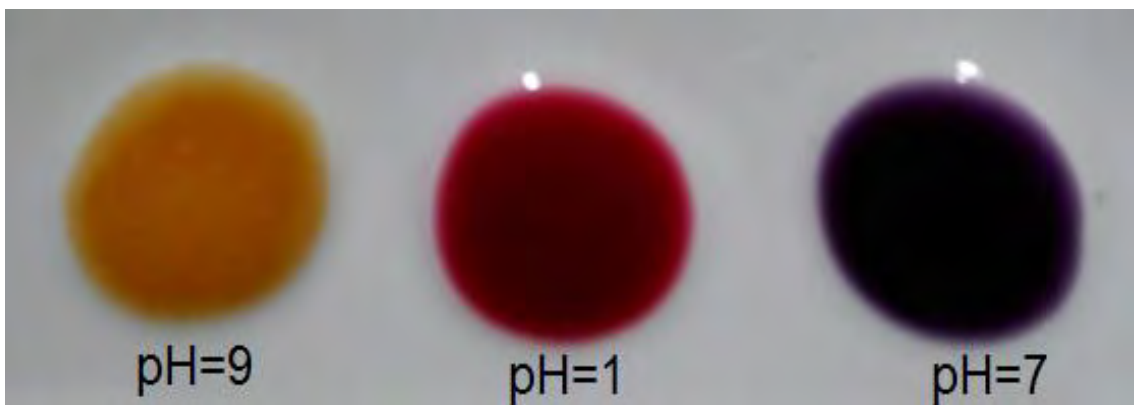
Se realizó una curva de calibración con soluciones de Trolox a concentraciones de 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2 mM siguiendo la metodología antes descrita. Los resultados se expresaron en μmol de trolox/g de fruta. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico, la metodología se desarrolló por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Ensayos preliminares

La variación de color de las antocianinas por los cambios de pH se tuvo en cuenta como una primera aproximación de la presencia de este tipo de pigmentos en el fruto de Ivilan, los resultados muestran que el extracto de este fruto a pH neutro conservó su color natural, en medio ácido cambió a color rojo brillante y, un color amarillo fue observado en medio básico (figura 23), indicando la presencia de este tipo de pigmentos.

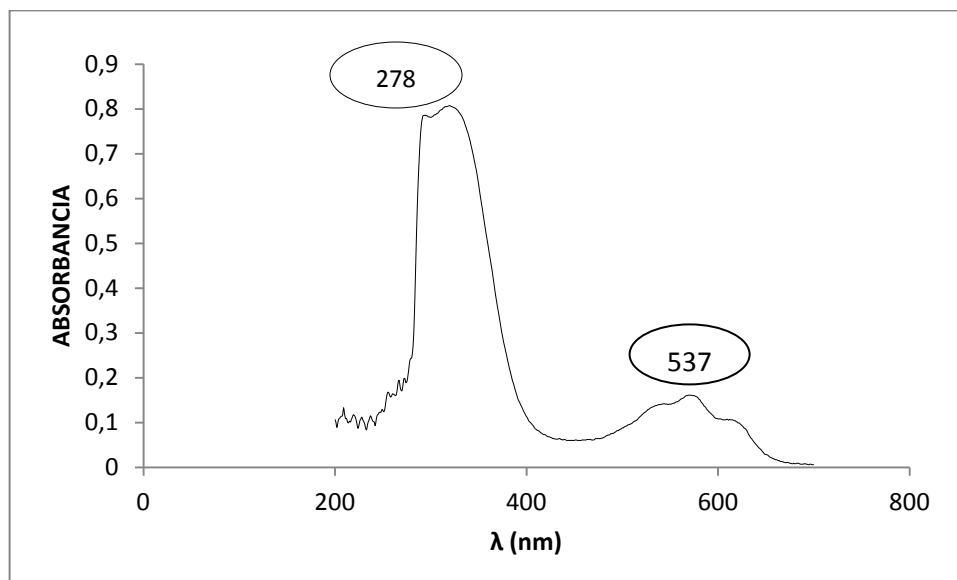
Figura 23. Variación del color respecto al pH del extracto de Ivilan



Otra característica importante de los pigmentos antocianicos es su espectro de absorción, el cual presenta dos bandas distintivas una en la región UV (260 a 280 nm), determinada por la conjugación del anillo A y otro en la región visible (490 a 550nm) determinada por la conjugación del anillo B (figura 12).

El perfil del espectro UV-Vis (figura 24), del extracto crudo en solución ácida (HCl en MeOH), muestra la presencia de dos señales, una en la región UV (278 nm) y la otra en la región Vis (537 nm), confirmando la presencia de antocianinas en este fruto.

Figura 24. Espectro UV-Vis del extracto de Ivilan



4.2 Métodos de purificación

Los métodos de extracción propuestos hasta ahora no son selectivos de las antocianinas, ya que son capaces de co-extraer una gran cantidad de otros compuestos, como azúcares o ácidos orgánicos⁷⁵. En consecuencia, fue necesario aplicar técnicas de purificación con el fin de aislar los compuestos de interés.

Las cantidades que se obtuvieron después de cada etapa de purificación de los diferentes extractos se muestran en la tabla 2.

Tabla N° 2. Cantidades de los diferentes extractos.

Peso inicial fruto (g)	Peso del EIC ^a (g)	Peso del EIP ^b (g)	Peso del ERM ^c (g)	Peso del ERP ^d (g)
1000	250	65	32	11

^aextracto de Ivilan crudo, ^bextracto de Ivilan purificado, ^cextracto de Ivilan rico en antocianinas monoméricas, ^dextracto de Ivilan rico en antocianinas poliméricas

4.3 separación e identificación de antocianinas

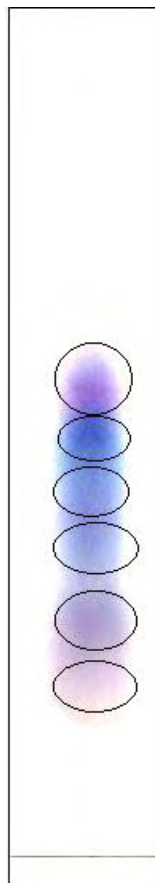
⁷⁵COUTINHO, M and QUADRI, M. Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage). En: Science and Technology. Vol. 39, No. 16 (feb. 2004); p. 387.

4.3.1 Cromatografía de capa fina (TLC). El extracto de Ivilan puro (EIP), analizado por esta técnica muestra seis bandas cromatográficas (figura 25) que sugieren la presencia del mismo número de antocianinas. En la tabla 3 se presentan los factores de retención para cada uno de estas señales.

Tabla N° 3. Factores de retención para las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan

Banda	Rf experimental
1	0,08
2	0,13
3	0,41
4	0,45
5	0,60
6	0,91

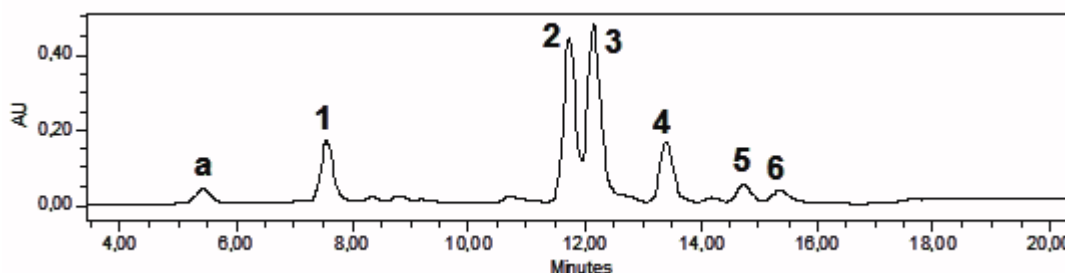
Figura 25. Cromatografía de capa fina de las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.



4.3.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). En el proceso de análisis de este tipo de compuestos por cromatografía líquida, normalmente se usa un sistema en fase reversa, en este trabajo se utilizó como fase estacionaria C18 u ODS (octadecilsilano), este tipo de fases se obtienen por derivatización de una superficie de sílice con un reactivo silano-alifático de cadena larga de 18 átomos de carbono.

En la figura 26 se observa el perfil cromatográfico HPLC-DAD obtenido a λ 520 nm, para el extracto EIP, tomado bajo las condiciones mencionadas anteriormente (ver apartado 3.3.4)

Figura 26. Perfil cromatográfico del EIP.



En el perfil cromatográfico del extracto se observan seis señales, sus tiempos de retención y sus áreas relativas se muestran en la tabla 4. Estos resultados evidencian cierta concordancia con el número de manchas observadas por TLC, sin embargo, se observa una banda adicional (pico a), con un porcentaje de área relativa muy bajo.

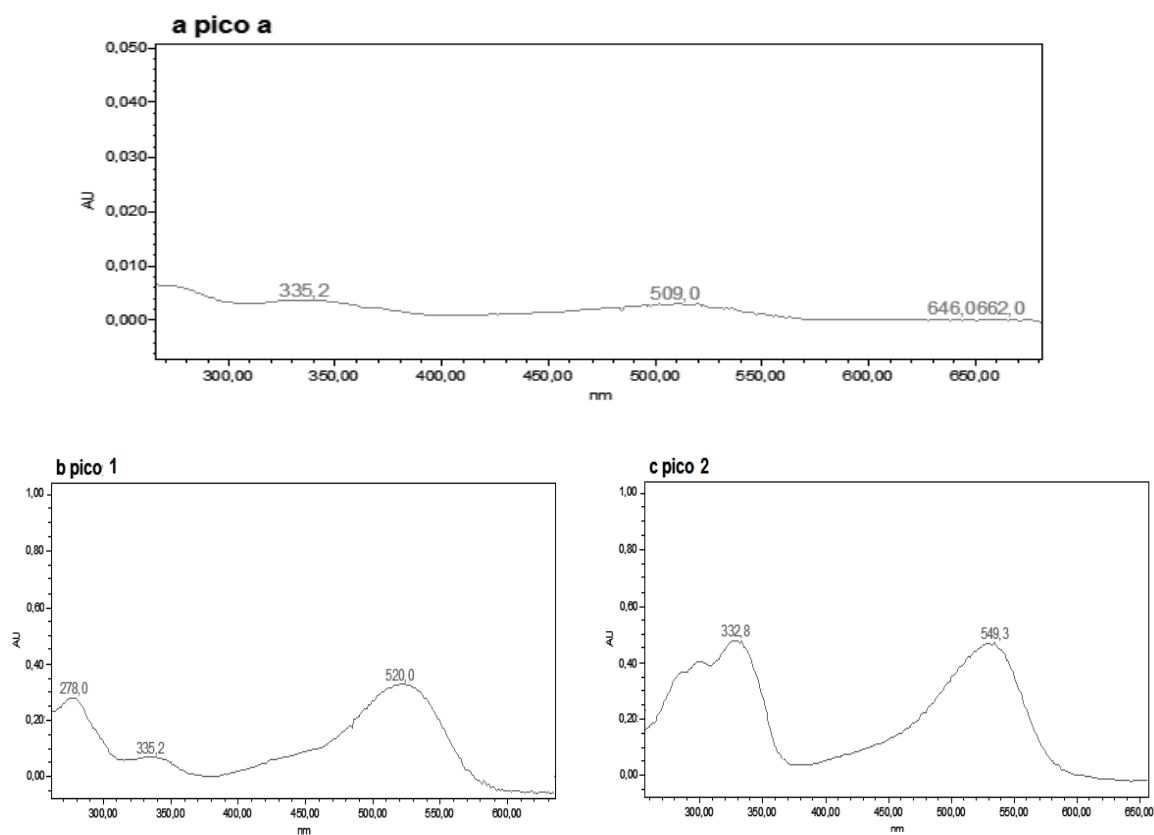
Tabla N° 4. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan

Pico	Tr experimental (min)	Tr teórico (min)	% Area	Posible compuesto
a	5,30	---	2,08	No identificada
1	9,24	---	12,28	No identificada
2	11,90	12,5	31,02	Delfinidina-3-monoglucosido-p-coumarato
3	12,54	---	33,44	No identificada
4	13,20	14,9	12,72	Cianidina 3-glicosido
5	14,68	---	4,28	No identificada
6	15,76	15,5	4,18	Cianidina-3-acetilglucosido

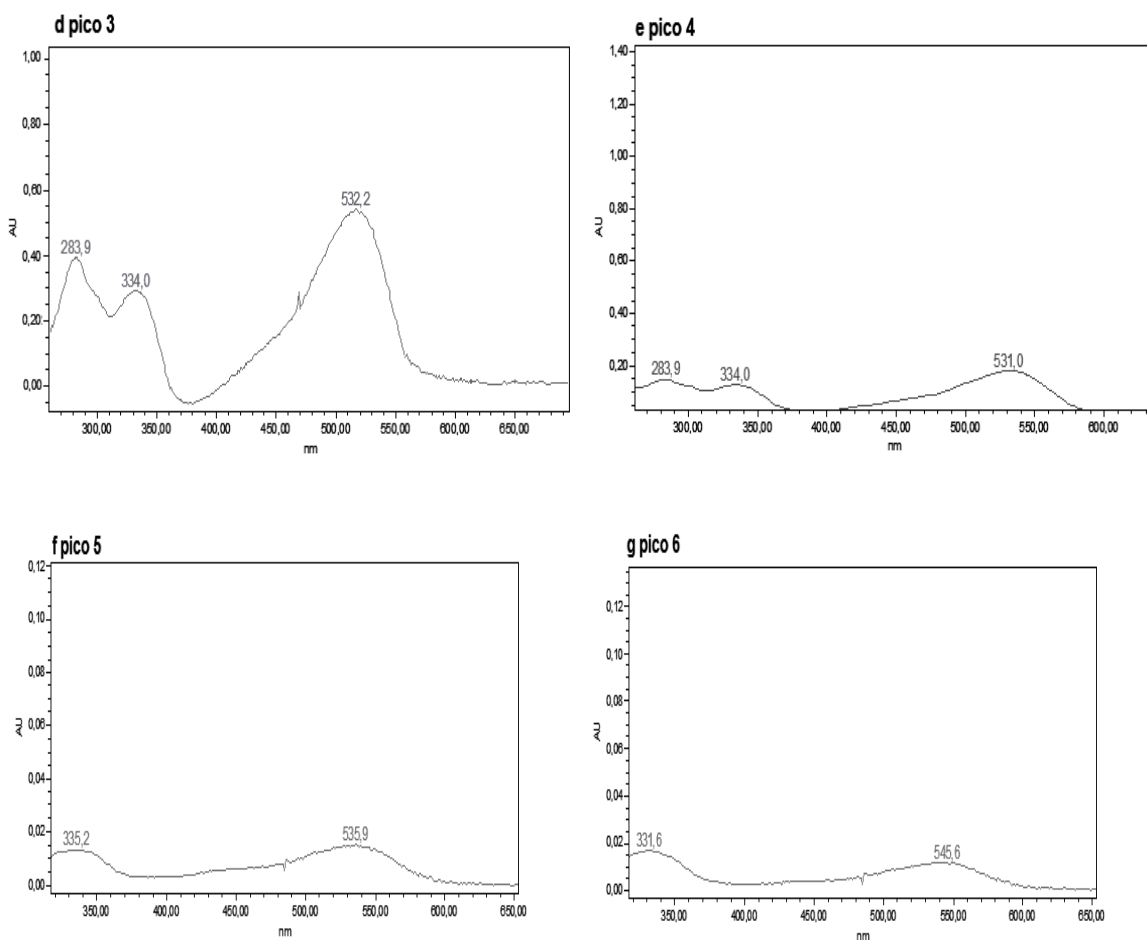
Para las señales 2, 4 y 6 (tabla 4) se encontraron tiempos de retención similares reportados en la literatura obtenidos bajo las mismas condiciones empleadas en el presente trabajo indicando la posible identidad de estos compuestos, sin embargo los valores Tr reportados para los posibles compuestos 2 y 3 son un poco mayores lo que sugiere la presencia de más de un azúcar o grupos acilo que pudieran aumentar la polaridad de los compuestos disminuyendo también los tiempos de retención.

En los espectros Vis, tomados on line en el sistema cromatográfico, se observan bandas entre 480 – 550 nm, características para las antocianinas. Es evidente una muy baja señal en esta región, para el primer compuesto que eluye de la columna (pico a), esto sugiere que se trata de un compuesto antociánico tipo polímero, los cuales presentan estas características⁷⁶.

Figura 27. Espectros de absorción UV-Vis de las antocianinas contenidas en el fruto de Ivilan.



⁷⁶ WROSTAD, R; and GIUSTI, M. Op. Cit. p., f. 1.2.7

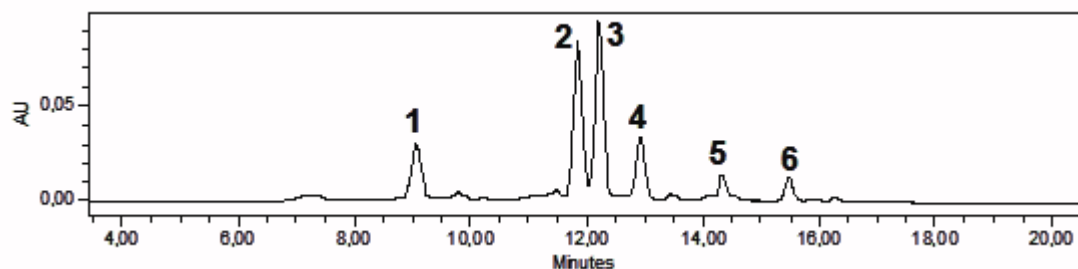


Con el propósito de simplificar el extracto anteriormente analizado por HPLC, este extracto se fraccionó mediante cromatografía en columna (CC), usando como fase estacionaria Sephadex. Los extractos recolectados en este proceso fueron, ERM (Extracto de antocianinas monoméricas) y ERP (extracto de antocianinas poliméricas). Estos extractos igualmente fueron analizados por HPLC de tipo analítico. Al comparar el perfil cromatográfico del EIP (figura 26) con el cromatograma del ERM (figura 28 a) se observa que el primer pico que eluye en el extracto EIP (pico a) no aparece en el extracto ERM, y esta señal se observa claramente incrementada en el perfil de ERP (figura 28 b), esto corrobora la hipótesis propuesta, esta señal es generada por compuestos de tipo polimérico, que requieren un estudio diferente al de este trabajo.

Es evidente también que en el perfil cromatográfico del extracto ERP (figura 28 b), se observan trazas de antocianinas monoméricas, esto sugiere el uso de una columna más larga con el fin de que, bajo las mismas condiciones, se logre una mayor separación de estas dos fracciones.

Figura 28. Perfil cromatográfico de los diferentes extractos obtenidos por CC con Sephadex.

a. Perfil cromatográfico del ERM



b. Perfil cromatográfico del ERP.

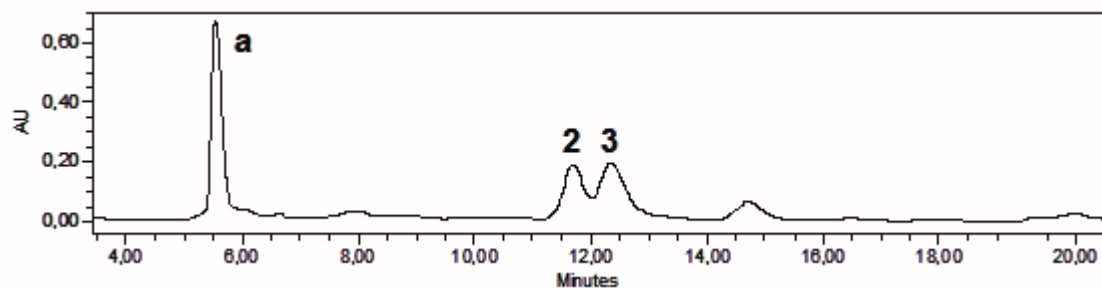


Tabla N° 5. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el ERM

Pico	Tr (min)	% Area
1	9,268	12,78
2	11,914	31,05
3	12,545	33,85
4	13,213	13,23
5	14,691	4,98
6	15,781	4,11

Tabla N° 6. Tiempos de retención y porcentaje de área para las antocianinas contenidas en el ERP

Pico	Tr (min)	% Area
a	5,308	88,78
2	11,918	5,37
3	12,549	5,85

Al comparar los tiempos de retención para cada uno de los picos en los diferentes análisis por cromatografía analítica (tablas 4, 5 y 6), se observa que son muy semejantes, lo que se esperaba ya que los tres análisis se realizaron en las mismas condiciones, razón por la cual estos resultados indican la reproducibilidad del método.

La similitud en los tiempos de retención de los compuestos fraccionados mediante la CC (tablas 5 y 6), indica claramente que el fruto de Ivilan está constituido principalmente por antocianinas de tipo monomérico.

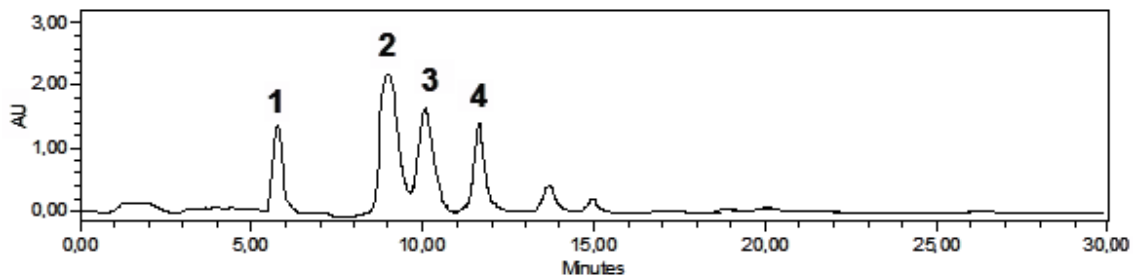
4.3.3 Separación de antocianinas mayoritarias por HPLC preparativa: Con el propósito de obtener los diferentes compuestos en estado relativamente puro, el extracto rico en antocianinas monoméricas (35 mg/ml) se sometió a cromatografía HPLC en modo preparativo, para ello se evaluaron diferentes condiciones de separación en modo isocrático (ver tabla 7). Finalmente se encontró la condición 2 como la más conveniente en el proceso de separación (ver tabla 7). En un tiempo de 16 min se lograron separar las antocianinas 1 a 4 (figura 29).

Tabla N° 7. Ensayos para determinar los % de solvente y el flujo adecuado para la separación de las antocianinas 1 a 4 por HPLC preparativa

ensayo	% solvente		flujo
	A ^a	B ^b	
1	60	40	1mL/min
2	60	40	2mL/min
3	70	30	1mL/min
4	70	30	2mL/min
5	80	20	1mL/min
6	80	20	2mL/min

^aagua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación (87:3:10), ^bagua, acetonitrilo y ácido fórmico en relación (40:50:10)

Figura 29. Perfil cromatográfico de la separación de las antocianinas mayoritarias por HPLC en modo preparativo.



4.3.4 Espectroscopia UV-Vis. Las cuatro fracciones puras obtenidas por HPLC preparativa se disolvieron en metanol-HCl al 1,0% y se determinó el perfil del espectro UV-Vis para cada una. Los espectros con su respectiva longitud de onda de máxima absorbancia en el visible se muestran en las figuras 30 a 33

Figura 30. Espectro UV-Vis de la antocianina 1

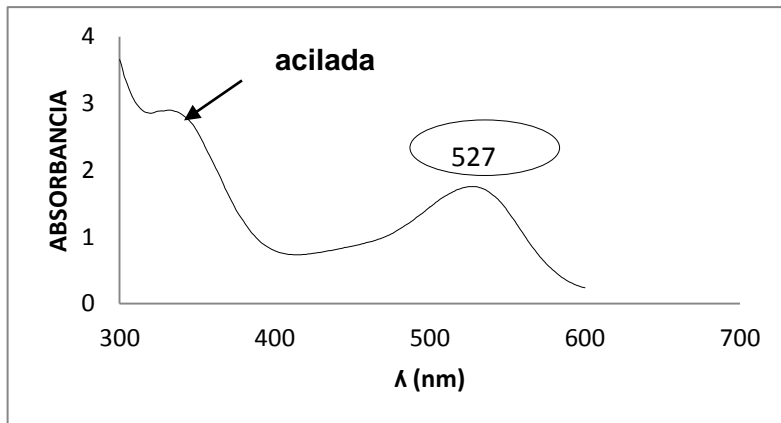


Figura 31. Espectro UV-Vis de la antocianina 2

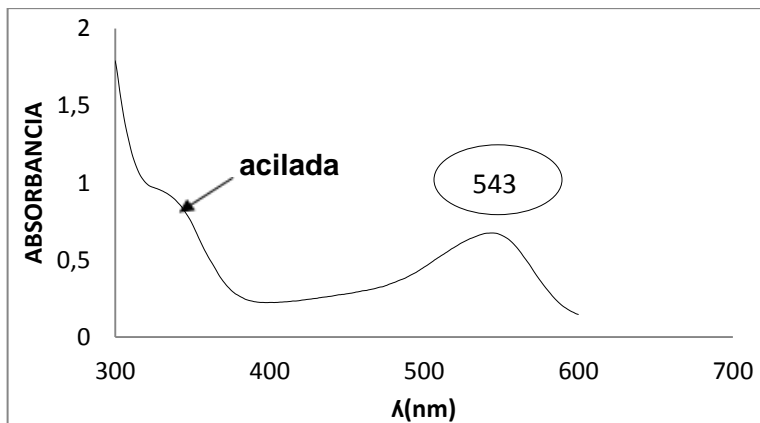


Figura 32. Espectro UV-Vis de la antocianina 3

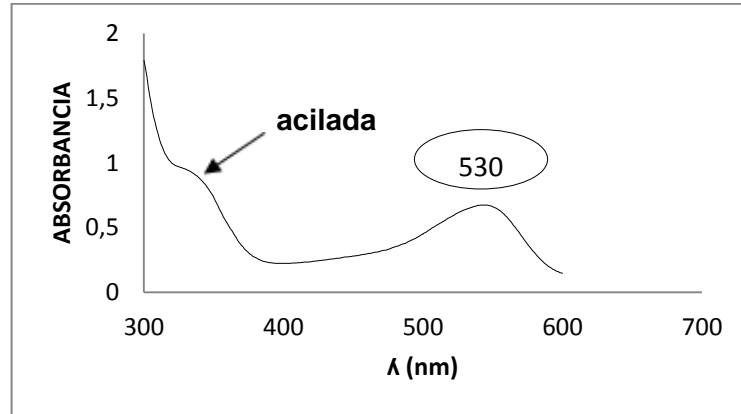
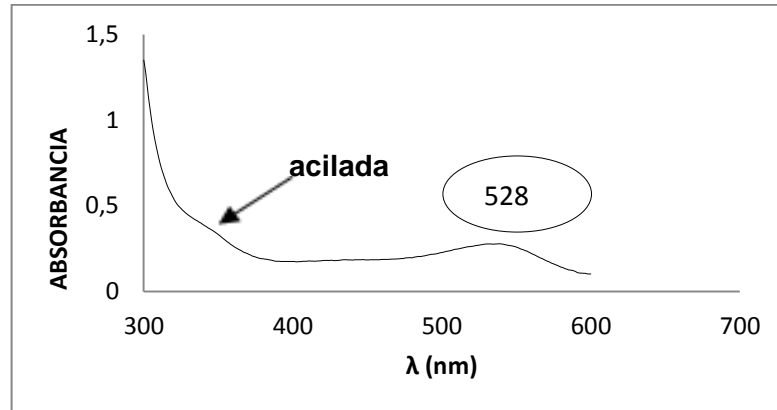


Figura 33. Espectro UV-Vis de la antocianina 4



A partir de los espectros UV-Vis de los diferentes pigmentos mayoritarios presentes en el fruto tomados bajo las condiciones anteriormente mencionadas se pueden, mediante relaciones de absorbancia, deducir algunas características estructurales de cada uno de los compuestos. En la tabla 8 se presentan estos resultados.

Tabla N° 8. Parámetros espectroscópicos para las antocianinas obtenidas por HPLC preparativa.

pico	A_{440}/A_{vis}	A_{acil}/A_{max}
1	33,320	68,251
2	22,360	66,462
3	32,805	67,352
4	32,453	61,261

Como se mencionó anteriormente (ver apartado 2.3.2.4.a) una relación A_{440}/A_{vis} entre 20-35 %, sugiere una glicosidación en la posición 3 de la aglicona y la

presencia de absorción entre 300-360 nm, con valores de $A_{\text{acil}}/A_{\text{max}}$ entre 50-70 % evidencia la presencia de grupos acilo. Estos resultados muestran que todos los compuestos 1-4, presentan no solo sustitución en la posición 3 sino también poseen grupos acilo.

4.3.5 Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). El acoplamiento HPLC/MS se ha utilizado satisfactoriamente en diversas aplicaciones⁷⁷. La espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI/MS) ha emergido como una poderosa técnica para la caracterización de biomoléculas y es la técnica de ionización más versátil que existe hoy en día⁷⁸.

ESI/MS ofrece ventajas en términos de sensibilidad y capacidad para el análisis de un gran número de compuestos termolábiles, altamente polares y no volátiles⁷⁹. Esta técnica ha sido usada para la caracterización de antocianinas en diferentes extractos⁸⁰ debido a que se producen los fragmentos típicos correspondientes a las antocianidinas y demás residuos de azúcares o grupos acilo presentes en las muestras⁸¹.

Los resultados obtenidos aplicando esta técnica (HPLC-MS), para el análisis del extracto EIP muestran que el perfil cromatográfico (figura 34) es semejante al perfil obtenido por HPLC analítica (figura 26), aunque aumentaron los tiempos de retención, debido a las diferencias en las condiciones de análisis.

⁷⁷ Merken, H and M Beecher. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography. En: Journal agricultural Food chemistry. Vol. 48, No. 3 (Mar. 2000); p. 579.

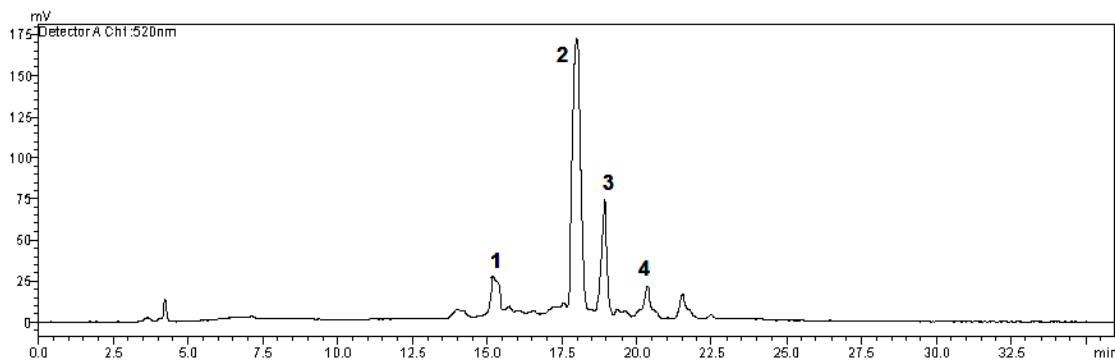
⁷⁸ SNYDER, P. Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 4ª. California: Editorial American Chemical Society. 1996. P.368.

⁷⁹ CARERI, M; MANGIA, A and MUSCI, M. Overview of applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. En: Journal chromatography. Vol. 794 (abr. 1998); p. 283.

⁸⁰ GIUSTI, M; RODRIGUEZ, S and WROLSTAD, R. Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives. En: Journal agricultural and Food chemistry. Vol. 47 (jul. 1999); p. 4631-4637

⁸¹ SANTACRUZ, L. ANÁLISIS QUÍMICO DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS SILVESTRES COLOMBIANOS. Bogotá, 2011. Tesis (Maestría en Ciencias Químicas). Universidad nacional de Colombia, facultad de ciencias, departamento de química. p. 52.

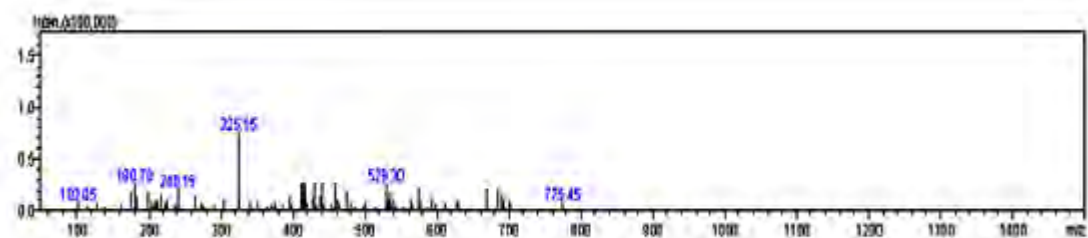
Figura 34. Perfil cromatográfico HPLC-MS



El análisis de los espectros de masas de los pigmentos 1-4, muestra las siguientes características:

Señal 1. El peso molecular de este pigmento fue establecido con base en la señal a 775u del espectro ESI (figura 35). El ión en m/z 529 se origina posiblemente por la pérdida de una unidad de ramnosa (146u) y un grupo acilo succinico (100u). El ion en m/z 325 sugiere la presencia de la vitisin B de la peonidina, habiendo pérdida de una masa molecular de 204u, que corresponde a una unidad de acetilglucosilo

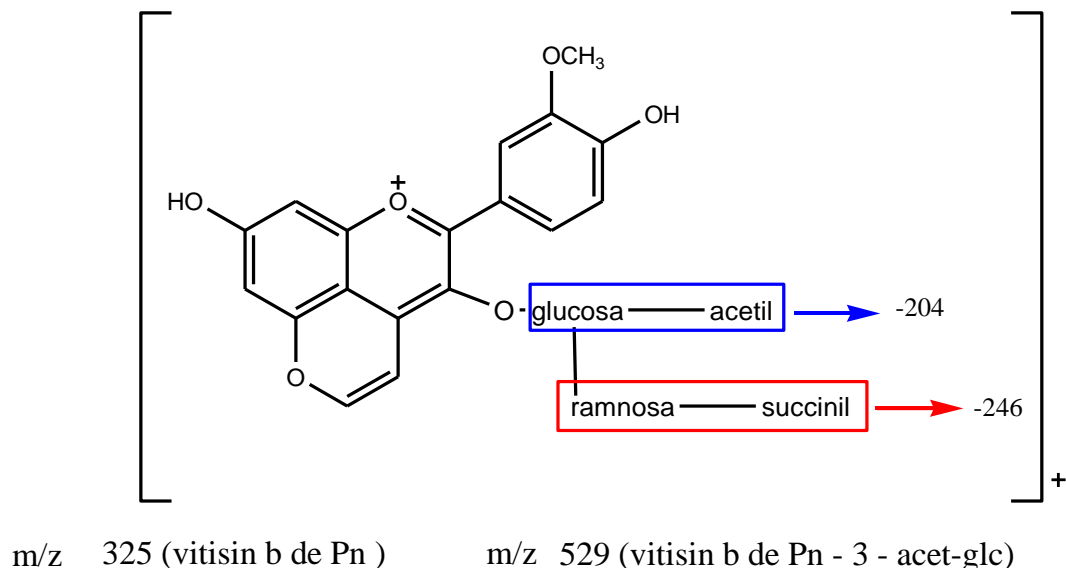
Figura 35. Espectro de masas de la señal 1



Posiblemente este compuesto es una pirano antocianina o vitisin B, un pigmento derivado de los antocianos monómeros que se caracterizan por poseer un anillo de pirano adicional que está fusionado con el esqueleto del antociano⁸², por lo que se concluye que la señal 1 podría corresponder a Vitisin b-3-(succinil) ramnosa-(acetil) glucosido (figura 36). Sin embargo con la información adquirida, aun no se puede proponer una estructura específica para este pigmento.

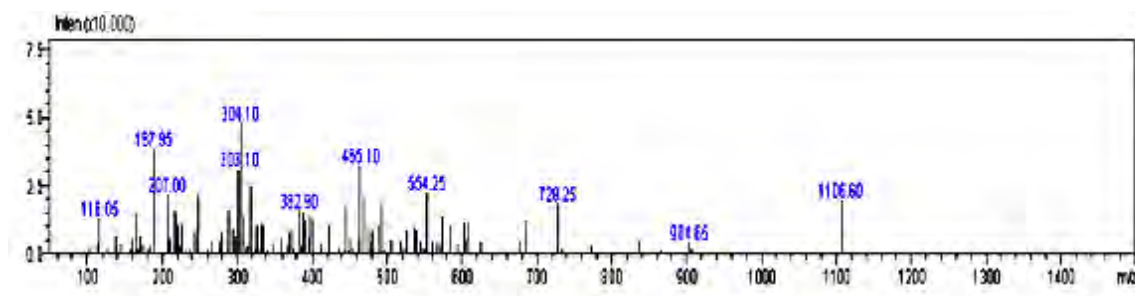
⁸² GUTIÉRREZ, I. Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxycinámicos en el color del vino tinto. En: Revista de enología. Vol. 1, No. 81 (jun. 2007); p. 79.

FIGURA 36. Estructura básica pigmento 1



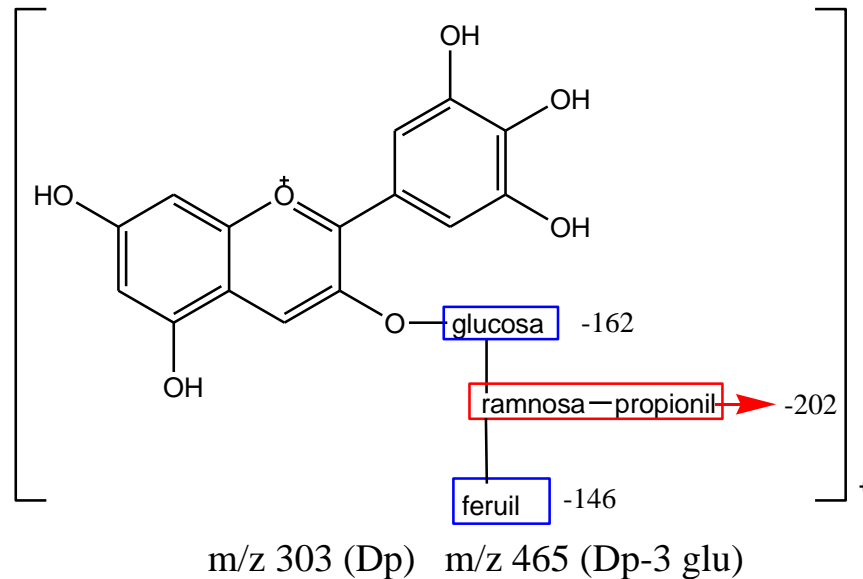
Señal 2. El peso molecular de esta antocianina fue establecido con base en la señal a 1106u del espectro ESI (figura 37). El ión en m/z 904 posiblemente se origina por la pérdida de una unidad de ramnosa (146u) y un grupo acilo propionico (56u). El ion en m/z 728 sugiere la pérdida de un grupo acilo ferúlico (176u). Los iones de fragmentación a m/z 465 y a m/z 303 sugieren la presencia de una delphinidina, habiendo pérdida de una masa molecular de 162, que corresponde a la eliminación de una unidad de glucosa.

Figura 37. Espectro de masas de la señal 2



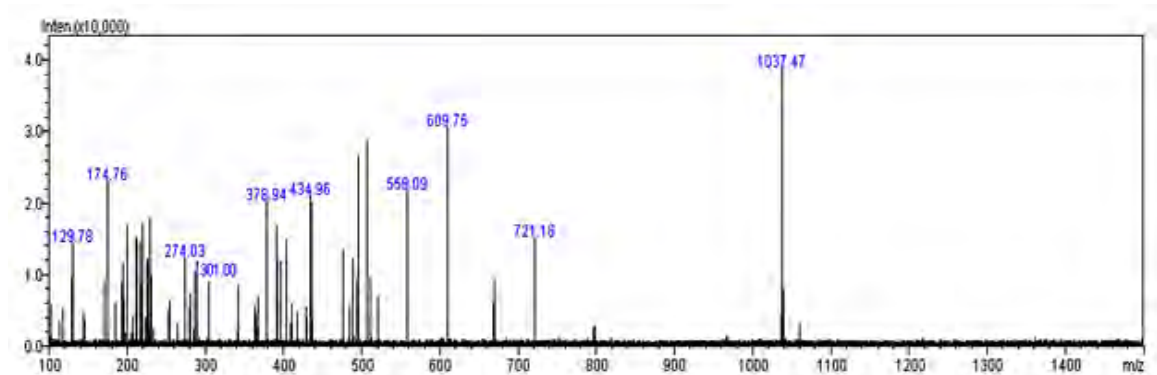
De esta forma este pigmento puede postularse como un derivado de la delphinidina, con dos unidades de azúcar y dos grupos acilo en su estructura (figura 38). Sin embargo con la información obtenida, aun no se puede proponer una estructura específica para este pigmento.

FIGURA 38. Estructura básica pigmento 2



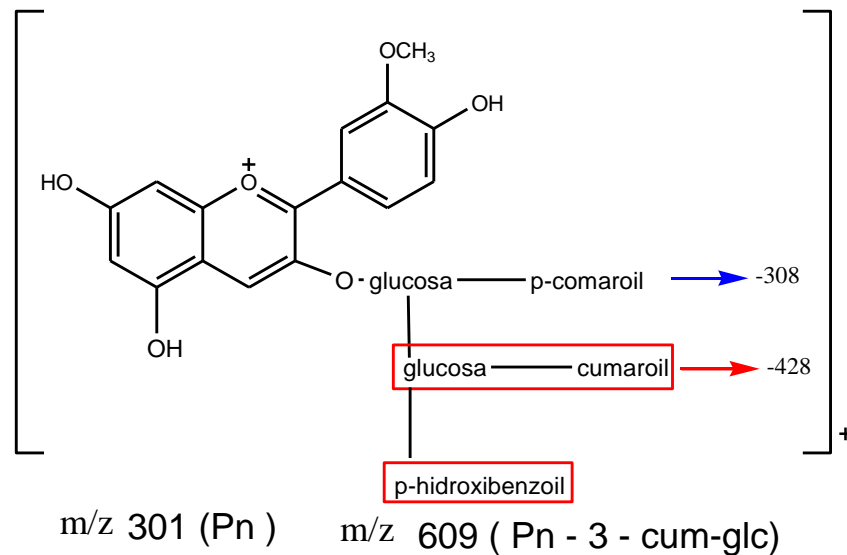
Señal 3. El peso molecular de esta antocianina fue establecido con base en la señal a 1037u del espectro ESI (figura 39). El ión en m/z 609 se origina posiblemente por la pérdida de una unidad de glucosa (162u) y dos grupos acilo; p-cumárico (146u) y p-hidroxibenzoico (120u). El ión en m/z 301 sugiere la presencia de una unidad de peonidina, habiendo pérdida de una masa molecular de 308, que corresponde a la ruptura de una cumaroil glucosa,

Figura 39. Espectro de masas de la señal 3



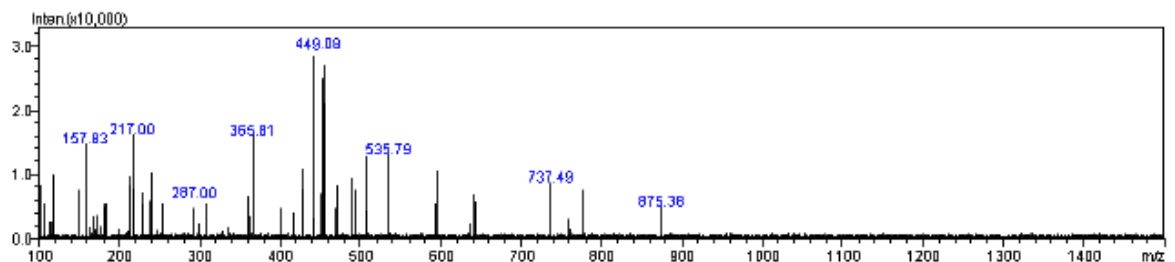
Por lo anterior se concluye que la señal 3 podría corresponder a una antocianina cuya aglicona es la peonidina con dos azúcares y tres grupos acilo peonidina-3-(cumaroil) glucosa-(cumaroil) (p-hidroxibenzoil) glucosido (figura 40). Sin embargo con la información obtenida, aun no se puede proponer una estructura específica para este pigmento.

FIGURA 40. Estructura básica pigmento 3



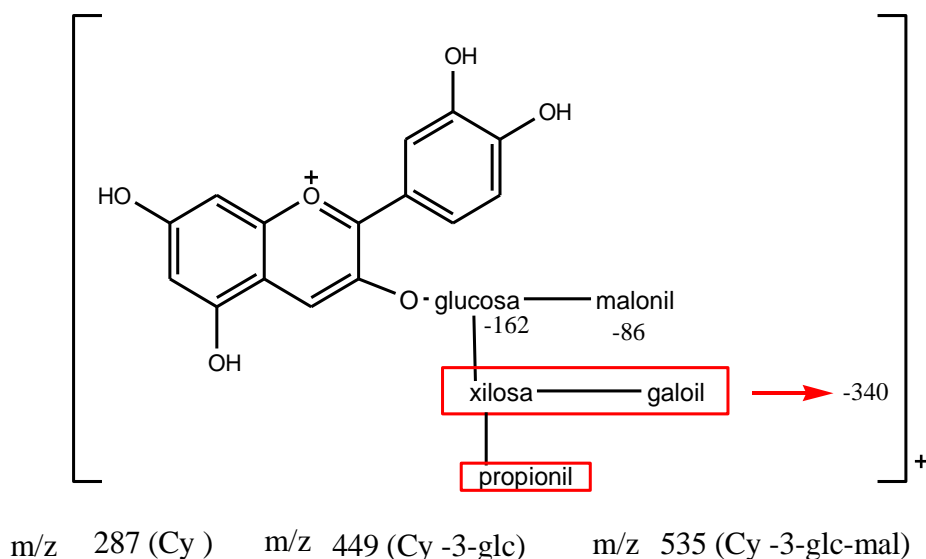
Señal 4. El peso molecular de esta antocianina fue establecido con base en la señal a 875u del espectro ESI (figura 41), el ión en m/z 535 posiblemente se origina por la pérdida de una unidad de xilosa(132) y dos grupo acilo; propionico (56u) y gálico (152u),el ión en m/z 449 posiblemente se origina por la pérdida de un grupo acilo malonil (86u), finalmente el ion a m/z 287 sugiere la presencia de una cianidina, habiendo pérdida de una masa molecular de 162u, que corresponde a la ruptura de una unidad de glucosa (162u).

Figura 41. Espectro de masas de la señal 4



Por lo anterior se concluye que la señal 4 podría corresponder a una antocianina cuya aglicona es la cianidina con dos azúcares y tres grupos acilo: cianidina-3-(galoi) (propionil)-xilosa-(malonil) glucosido (figura 42). Sin embargo con la información obtenida, aun no se puede proponer una estructura específica para este pigmento.

FIGURA 42. Estructura básica pigmento 4



Estos resultados muestran cierta concordancia con los resultados obtenidos del análisis por HPLC al EIP (tabla 4) para los compuestos 2 y 4, si bien estos pigmentos no son exactamente iguales a los reportados si coinciden con la aglicona, además confirman el hecho de que estos compuestos contienen en su estructura más de un azúcar y más de un grupo acilo (ver apartado 4.3.2).

4.3.6 Espectro RMN ^1H . Los datos espectrales de RMN ^1H para el pigmento 1 (tabla 9), confirman a la peonidina como aglicona, la ausencia de la señal para el protón de la posición 4 de la aglicona y la presencia de dos señales para los protones de los carbonos 11 y 12 de la estructura pirano (figura 43), uno en 4,28 ppm como triplete y otro a 7,34 ppm como un singlete, sugieren que este pigmento es una pirano antocianina o también llamada vitisin b. Es evidente también la presencia de 2 azúcares por las señales características de dos protones anoméricos, el primero aparece en la región de 5,27 ppm (tabla 9), identificado para el azúcar unido a la aglicona (azúcar 1, figura 43), como un doblete, con una constante de acoplamiento de 8,73 Hz, valor característico de la configuración β de la glucosa⁸³ y como se ha mencionado en el apartado 4.3.4 según la relación A_{440}/A_{max} este azúcar está unida a la posición 3 de la aglicona.

El segundo protón anomérico aparece en la región de 5,02 ppm como un doblete, identificado para el azúcar 2, con una constante de acoplamiento de 3,85 Hz, valor característico de la configuración α para este azúcar⁸⁴, además la presencia de

⁸³ISHIKAWA, T; and KONDO, T. An acylated anthocyanin from the blue petals of *Salvia uliginosa*. En: Journal of Sciences, phytochemistry. Vol. 52, No. 3 (oct. 1999); p. 518.

⁸⁴Ibid., p. 519

un doble triplete correspondiente a un grupo metilo en la región de 1,80 ppm para el protón del carbono 6''' sugiere que el azúcar 2 posiblemente sea la ramnosa.

El desplazamiento a campo bajo de los protones de los carbonos 2'' y 6'' (4,18 y 4,40 ppm respectivamente) de la glucosa (azúcar 1) comparados con la literatura (3,64 y 3,91 respectivamente), indican que posiblemente sus OH están unidos a otro azúcar o a grupos acilo. Teniendo en cuenta que un azúcar afectaría el desplazamiento químico a campo bajo en menor medida que un grupo acilo es posible que el azúcar 2 está unido a la posición 6'' de la glucosa y que un grupo acilo está unido en posición 2'' del azúcar 1, por lo tanto su desplazamiento a campo bajo; (4,18 ppm) posiblemente sea por la presencia del grupo acetil cuyo singlete CH₃CO aparece a 2,32 ppm⁸⁵.

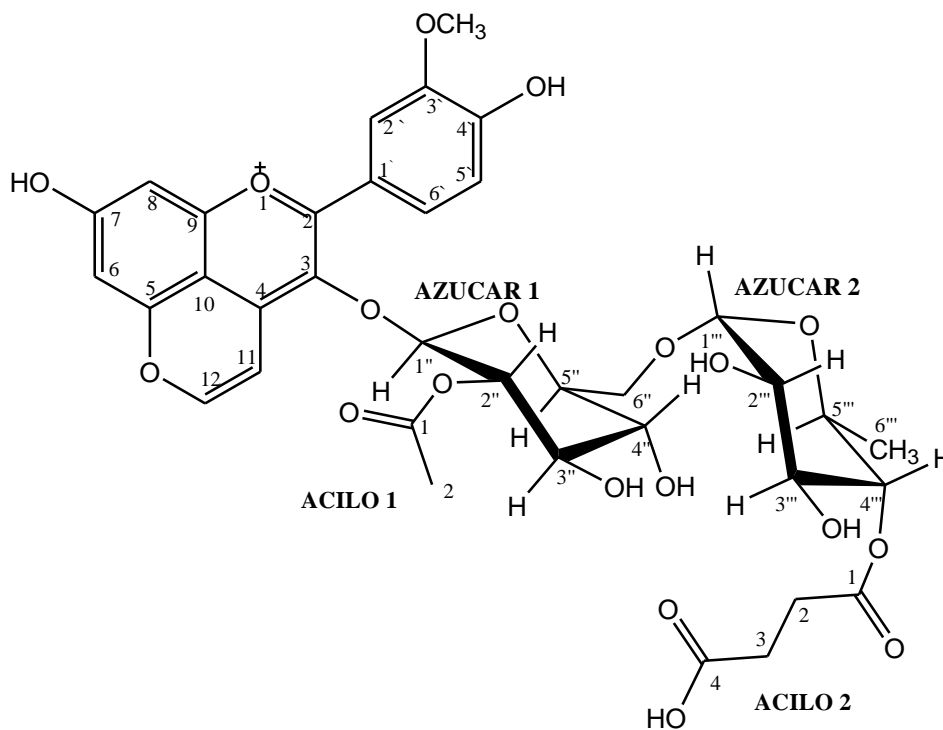
El desplazamiento a campo bajo para el protón del carbono 4''' del azúcar 2 (3,51 ppm) comparado con la literatura (3,41 ppm), indica que el OH de este carbono está unido a un grupo acilo (succínico) la presencia de este grupo se evidencia por la señal (singlete) a 2.53 ppm⁸⁶.

Los resultados obtenidos en RMN ¹H, junto con los datos espectroscópicos y los resultados obtenidos por HPLC-MS permiten sugerir que el pigmento 1 corresponde a la vitisin b de la peonidina-3-O-(6''-O-succinil- α ramnosa)-O-acetil-β glucosido, figura 43.

⁸⁵ FOSSEN, T; and ANDERSEN, M. Anthocyanins from maize (*zea mays*), and reed canarygrass (*phalaris arundinacea*). En: journal agricultural and food chemistry. Vol. 5, No. 49 (sep. 2001); p. 2319.

⁸⁶ GUTIÉRREZ, I. Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. En: Revista de enología. Vol. 1, No. 81 (oct. 2007); p. 79.

Figura 43. Estructura de la Vitisin b de la peonidina-3-O-(6''-O-succinil- α ramnosa)-O-acetil- β glucosido



Así mismo los datos espectrales de RMN ^1H para el pigmento 2 (tabla 9), confirman a la delphinidina como aglicona, es evidente también la presencia de 2 azúcares por las señales características de dos protones anoméricos, el primero aparece en la región de 5,48 ppm (tabla 9), identificado para el azúcar unido a la aglicona (azúcar 1, figura 44), como un doblete, con una constante de acoplamiento de 7,87 Hz, valor característico de la configuración β de la glucosa; y como se ha mencionado en el apartado 4.3.4 según la relación A_{440}/A_{max} este azúcar está unida a la posición 3 de la aglicona.

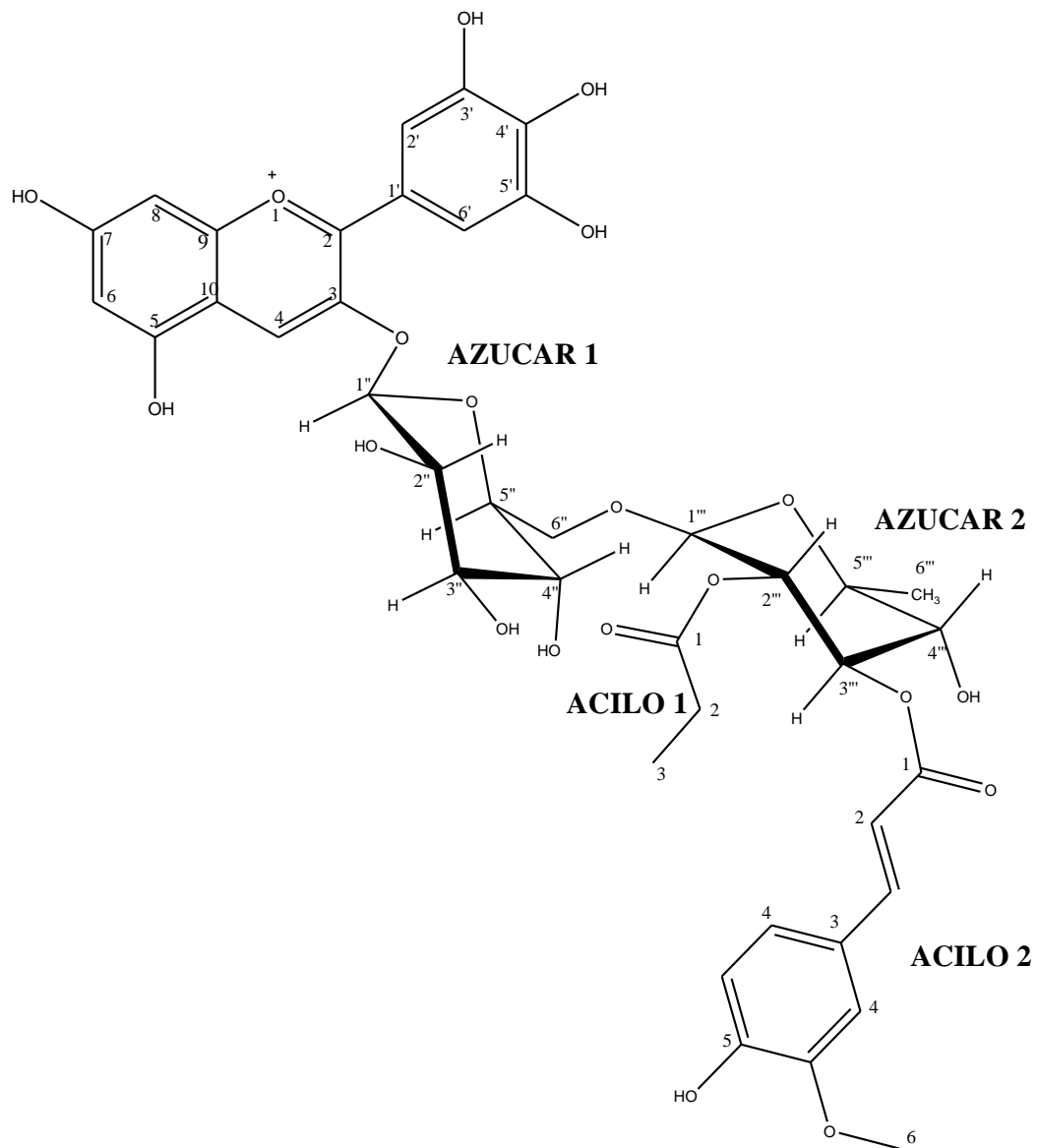
El segundo protón anomérico aparece en la región de 4,81 ppm como un doblete, identificado para el azúcar 2, con una constante de acoplamiento de 7,39 Hz, valor característico de la configuración β para este azúcar, además la presencia de un multiplete correspondiente a un grupo metilo en la región de 1,23 ppm para el protón del carbono 6''' sugiere que el azúcar 2 posiblemente sea la ramnosa.

Además el desplazamiento a campo bajo del protón 6'' de la glucosa (3,78 ppm) comparado con la literatura (3,69 ppm), indica que posiblemente el OH de este carbono puede estar unido a un segundo azúcar (ramnosa). A su vez el desplazamiento a campo bajo para los protones del carbono 4''' y 6''' del azúcar 2 (3,75 ppm y 1,23 ppm, respectivamente) comparados con la literatura (3,75 ppm y 391 ppm, respectivamente) sugiere que posiblemente los OH de estos carbonos

pueden estar unidos a dos grupos acilo (ferulico y propionico), la presencia de estos grupos se evidencia por las señales características (tabla 9)⁸⁷.

Los resultados obtenidos en RMN ¹H, junto con los datos espectroscópicos y los resultados obtenidos por HPLC-MS permiten sugerir que el pigmento 2 corresponde a la delfinidina-3-O-((feruilil) (propionil)- β ramnosa)-O- β glucosido, figura 44.

Figura 44. Estructura de la delfinidina-3-O-((feruilil) (propionil)- β ramnosa)-O- β glucosido



⁸⁷ Ibid., p. 2319

De igual manera los datos del espectro protónico del pigmento 4 (tabla 9), confirman que la aglicona es una cianidina y que una de las azúcares unidas a esta es la glucosa (azúcar 1), debido a que presenta señales características como la del protón anomérico como un doblete a 5,48 ppm, con una constante de acoplamiento alta (7,74 Hz) indicando una configuración β para esta azúcar, y como se ha mencionado en el apartado 4.3.4 según la relación A_{440}/A_{max} este azúcar está unido a la posición 3 de la aglicona, también se puede confirmar la presencia de otra azúcar por la señal de un segundo protón anomérico como un doblete a 5,30 ppm con una constante de acoplamiento alta (7,71 Hz) indicando una configuración β característica de xilosa (azúcar 2)⁸⁸.

Adicionalmente el desplazamiento a campo bajo de los protones del carbono 4'' y 6'' de la glucosa (3,53 ppm y 5,89 ppm, respectivamente), comparado con la literatura (3,43 ppm y 4,65 ppm respectivamente) indican que posiblemente los OH de estos carbonos pueden estar unidos a un segundo azúcar o a grupos acilo, teniendo en cuenta que un azúcar desplazaría en menor medida que un grupo acilo es posible que la xilosa (azúcar 2) este unido a la posición 4'' de la glucosa (azúcar 1) y que un grupo acilo podría estar unido en posición 6'' del azúcar 1, por lo tanto su desplazamiento a campo bajo; (5,89 ppm) posiblemente sea por la presencia del grupo acilo (malónico), la presencia de este grupo se evidencia por la señal (multiplete) a 3,42 ppm⁸⁹.

A su vez el desplazamiento a campo bajo para los protones del carbono 2''' y 3''' del azúcar 2 (3,31 ppm y 3,56 ppm, respectivamente) sugiere que posiblemente los OH de estos carbonos pueden estar unidos a otros dos grupos acilo (gálico y propionico), la presencia de estos grupos se evidencia por las señales singlete a 7,05 ppm para el galoil y las señales singlete y doblete a 1,19 y 1,91 ppm respectivamente para el propionil (tabla 9)⁹⁰.

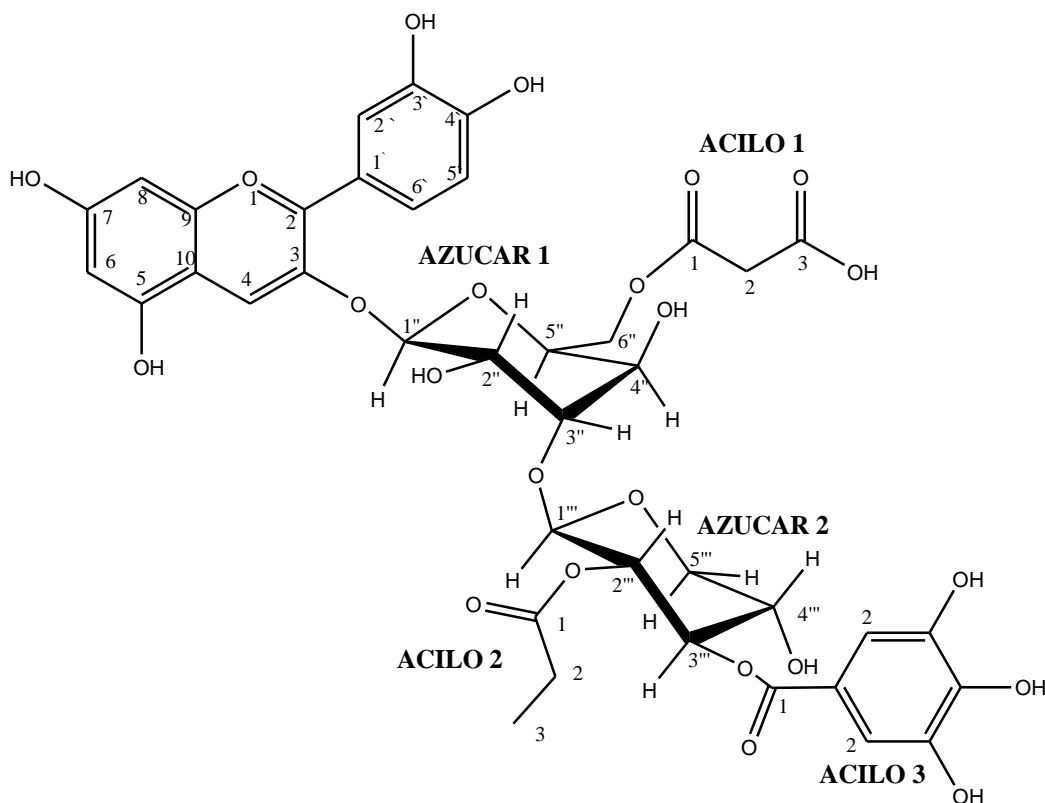
Los resultados obtenidos en RMN 1H , junto con los datos espectroscópicos y los resultados obtenidos por HPLC-MS permiten sugerir que el pigmento 4 corresponde a la cianidina-3-O-((galoil) (propionil)- α xilosa)-O-malonil- β glucosido, figura 45.

⁸⁸ OYVIND, M and ANDERSEN, M. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *synadenium grantii* (Euphorbiaceae). En: phytochemistry. Vol. 71 (abr. 2010); p.1558.

⁸⁹ FOSSEN, T; and ANDERSEN, M. Op. Cit. p., 2319

⁹⁰ Ibid.,p. 2319

Figura 45. Estructura de la cianidina-3-O-((galoil) (propionil)- α xilosa)-O-malonil- β glucosido



Como se mencionó en el apartado 3.4.4, el pigmento 3 no fue posible analizarlo por RMN ^1H por la poca cantidad de muestra obtenida durante las separación, además se debe aclarar que las estructuras que se propone son tentativas, para una identificación completa de los azucares, grupos acilo y su posición, es necesario un análisis de RMN en 2D (TOCSY) y NOESY con el cual se puede obtener una ubicación espacial de los protones, análisis que no se realizó en esta investigación, debido a la poca cantidad de antocianinas obtenidas en la separación por HPLC tipo preparativa y por falta de recursos económicos.

Tabla No 9. Desplazamientos químicos de RMN¹H de tres antocianinas mayoritarias del fruto de Ivilan en CD₃OD/TFA_d (19:1)⁹¹

protones	1,δ	Ref. ^a	2,δ	Ref. ^b	4,δ	Ref. ^c
Aglicona	Peonidina		Delfinifina		Cianidina	
H4	---	8,96s	8,22s	8,96s	8,33s	8,90s
H6	6,16s	6,67s	6,66s	6,62s	6,68s	6,74s
H8	6,80d	6,94s	7,02s	6,88s	6,95s	6,95s
H2'	8,01s	8,13s	7,69s	7,77s	7,55s	8,07s
H5'	6,89d	7,07s	---	---	7,09s	7,08s
H6'	8,26s	8,23s	7,88s	7,79s	8,26s	8,3s
OCH ₃	3,75s	3,99s				
Pirano						
H11	7,34s	7,54s				
H12	4,28t	4,83t				
3-O-glucosa						
H1''	5,27d	5,33d	5,48d	5,33d	5,48d	5,36d
H2''	4,18m	3,64m	nd	3,62dd	3,79sa	3,79d
H3''	3,58dd	3,58m	3,57m	3,55m	3,54s	3,58s
H4''	3,41dd	3,45m	3,59sa	3,43dd	3,53s	3,43m
H5''	3,83dd	3,60m	3,67m	3,67m	3,84sa	3,88s
H6''	4,40d	3,91d	3,78s	3,69d	5,89m	4,65d
O-ramnosa						
H1'''	5,02d	4,73d	4,81d	4,93d		
H2'''	3,91m	3,86m	4,38d	4,35m		
H3'''	3,78m	3,71m	nd	4,02m		
H4'''	3,51m	3,41m	3,75d	3,66m		
H5'''	nd	3,65m	3,86d	3,73m		
H6'''	1,80dt	1,23m	1,23m	1,17m		
Xilosa						
H1''''					5,30d	4,81d
H2''''					3,31sa	3,28d
H3''''					3,56sa	3,43d
H4''''					nd	3,52d
H5''''					3,80sa	3,76d
grupo propionil						
H2			0,80sa	1,16s	1,19s	1,16s
H3			1,91d	2,39s	1,91d	2,39s
Grupo feruil						

⁹¹ WROLSTAD, R. Handbook of food analytical chemistry 1ª. United States of America: John Wiley. 2005. p.211.

H2			6,81d	6,79dd		
H3			6,50d	6,75d		
H4			6,45d	5,98d		
H5			7,28sa	7,22d		
OCH ₃			3,70sa	3,83d		
Grupo malonil						
H2					3,42m	3,44m
Grupo galoil						
H2					7,05s	7,06s
Grupo acetil						
H2	2,32s	2,18s				
Grupo succinil						
H2 y H3	2,53s	2,76s				

S singlete, d doblete, dd doble doblete, dt doble triplete, m multiplete, nd no identificado

4.4 Cuantificación de los extractos obtenidos

4.4.1 Determinación de antocianinas monoméricas. El contenido de antocianinas monoméricas fue determinado por el método del pH diferencial. Debido a que no se han realizado estudios de elucidación estructural de las antocianinas mayoritarias en el fruto de Ivilan, la cantidad de antocianinas presentes en este fruto se expresó como mg de cianidina-3-glucosido/ 100g de fruto.

Las antocianinas experimentan una transformación reversible de sus estructuras cambiando su pH, el catión flavilio de color rojo (forma oxonio) predominante a pH 1, se transforma a una pseudobase incolora (forma hemiacetal) a pH 4,5 (figura 13); que se manifiesta en un cambio en la absorbancia. El pH diferencial es un método basado en esta reacción y permite una medición rápida y precisa de las antocianinas monoméricas aun en presencia de pigmento degradado polimerizado, o en presencia de cualquier otro compuesto interferente⁹².

En la tabla 10 se muestran los datos de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción a pHs 1 y 4,5, utilizados para calcular la concentración de antocianinas monoméricas para los diferentes extractos.

Tabla N° 10. Absorbancias para los EIC y EIP a diferentes pHs

Replica	ABS λ_{526} (EIC)		ABS λ_{527} (EIP)	
	pH1	pH4,5	pH1	pH4,5
1	0,285	0,139	0,347	0,163
2	0,289	0,139	0,349	0,168

⁹²WROSTAD, R; and GIUSTI, M. Op. Cit. p., F1.2.6.

3	0,283	0,138	0,349	0,173
Promedio	0,286	0,139	0,348	0,168
DES EST	0,003	0,001	0,001	0,005
CV	1,069	0,416	0,331	2,976

Estas concentraciones se determinaron usando la fórmula del pH diferencial y la fórmula de las antocianinas monoméricas (ver apartado 2.3.2.3), en la primera fórmula, la diferencia en la absorción de los pigmentos a la $\lambda_{vis-max}$, (526 y 527nm para EIC y EIP respectivamente) es proporcional a la concentración de las antocianinas monoméricas únicamente, ya que las antocianinas degradadas o polimerizadas se resisten al cambio de color independientemente del pH, la diferencia en la absorción de los pigmentos a 700nm se utilizó para eliminar el error producido por la turbidez.

Tabla N° 11. Contenido de antocianinas monoméricas para los EIC y EIP

Antocianinas monoméricas totales ^a			Antocianinas monoméricas totales ^b	
Replica	Extracto EIC	Extracto EIP	Extracto EIC	Extracto EIP
1	476,516	582,746	95,303	116,550
2	479,551	585,781	95,910	117,160
3	473,481	588,816	94,700	117,770
Promedio	476,516	585,781	95,303	117,156
DES EST	3,035	3,035	0,607	0,607
CV	0,6	0,6	0,637	0,518

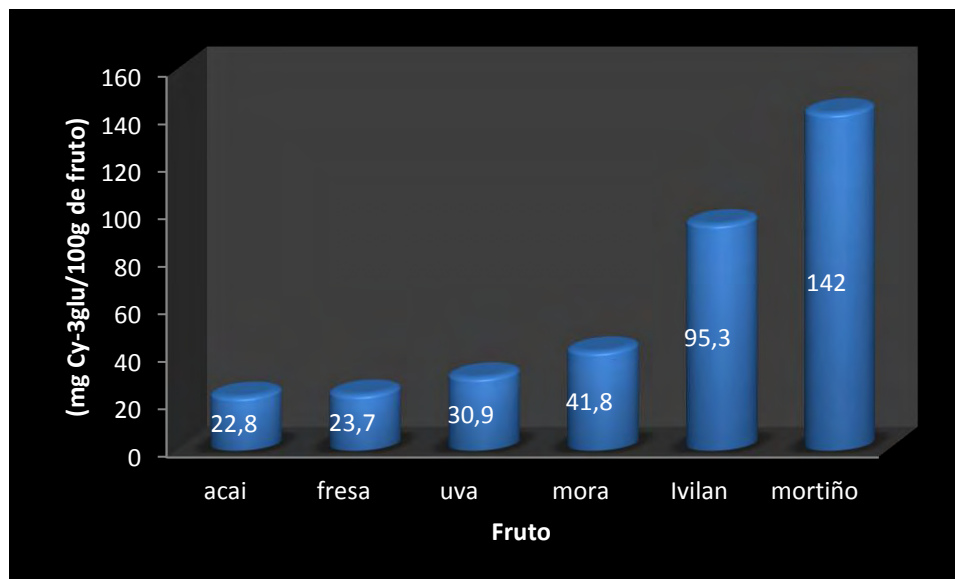
^amg de Cy-3-glu/L de extracto, ^bmg de Cy-3-glu/100g de fruto

De acuerdo con la tabla 11 se puede observar un alto contenido de antocianinas monoméricas en ambos extractos sin embargo, este contenido es mayor para el EIP, lo que se esperaba ya que esta fracción está libre de azúcares, compuestos lipofílicos y ácidos orgánicos separados durante la refinación, obteniendo de esta manera un extracto con mayor concentración de antocianinas en comparación con el EIC.

En comparación con otras frutas (gráfica 1), el contenido de antocianinas monoméricas expresado mg de Cy-3-glu/100g de fruto, para el fruto del Ivilan

(95,3 ± 0,6) fue un poco menor a la del mortiño (142,0 ± 2,4)⁹³, sin embargo fue mayor al del acaí (22,8 ± 0,8), la fresa (23,7 ± 2,3), la uva (30,9 ± 0,5) y la mora (41,8 ± 0,8)⁹⁴, lo que indica que el fruto de livilan es una fuente importante de antocianinas de gran interés como posible aditivo natural en la industria alimenticia.

Grafica N° 1. Comparación del contenido de antocianinas monoméricas en diferentes frutos.

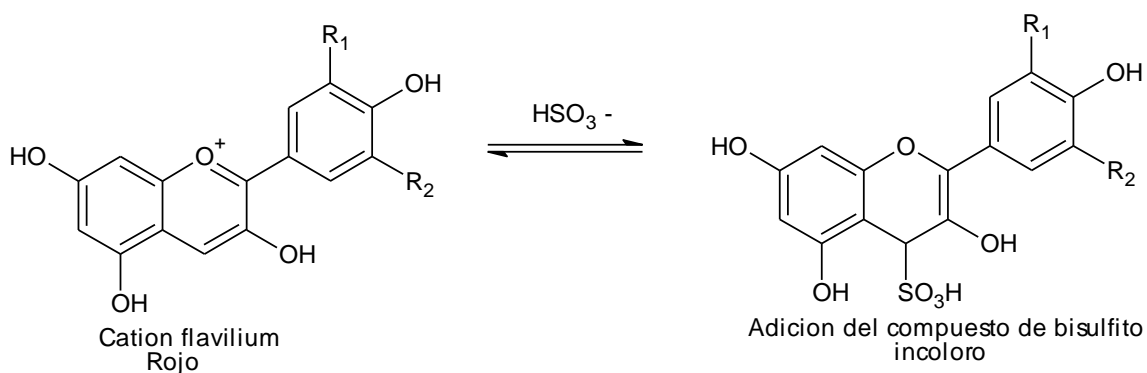


4.4.2 Determinación de antocianinas poliméricas. El contenido de antocianinas poliméricas se determinó por el método del pH sustractivo, este método se basa en la reacción que sufren las antocianinas monoméricas al combinarse con bisulfito de sodio para formar un compuesto incoloro (figura 46), y a la resistencia que presentan los pigmentos antocianicos poliméricos a la decoloración por el uso de este agente blanqueador; de esta manera la absorbancia a la $\lambda_{vis-max}$ a 420nm se debe únicamente a las antocianinas poliméricas.

⁹³ PORTILLO, Dairo; y VILLACRÉZ, José. Op. Cit. p. 80

⁹⁴ KUSKOSKI, M; and ASUERO, A. Op. Cit. p. 691.

Figura 46. Reacción de las antocianinas con bisulfito para formar compuestos incoloros.



Fuente. WROLSTAD, R; et al, (2005)⁹⁵

Tabla N° 12. Absorbancias para los EIC y EIP a las $\lambda_{vis-max}$

Replica	Absorbancia λ_{526} (EIC)		Absorbancia λ_{527} (EIP)	
	A ^a	B ^b	A ^a	B ^b
1	0,301	0,005	0,243	0,045
2	0,296	0,006	0,249	0,043
3	0,295	0,006	0,242	0,043
Promedio	0,297	0,005	0,244	0,043
DES EST	0,003	0,0005	0,003	0,001
CV	1,081	0,101	1,547	2,644

^a muestra tratada con agua, ^b muestra tratada con metabisulfito de sodio

En la tabla 12 se muestran los datos de absorbancia a la $\lambda_{vis-max}$ para el EIC y para el EIP tratados con metabisulfito de sodio y H₂O; usados para calcular, el color polimérico, la densidad de color y el % de color polimérico (ver tabla 13). Estos parámetros de color se calcularon según las formulas descritas para estos en el apartado 2.3.2.3

Tabla N° 13. Contenido de antocianinas poliméricas para los EIC y EIP

Replica	Densidad de color		Color polimérico		% de color polimérico	
	Extracto EIC	Extracto EIP	Extracto EIC	Extracto EIP	Extracto EIC	Extracto EIP

⁹⁵Ibid., F1.2.3.

1	80,200	66,200	6,400	13,800	7,786	20,846
2	80,000	64,600	6,200	13,200	7,75	20,433
3	78,800	65,000	6,500	13,400	7,614	20,615
Promedio	80,333	65,267	6,367	13,467	7,717	20,632
DES EST	1,724	0,833	0,153	0,306	0,091	0,207
CV	2,100	1,300	2,400	2,300	1,173	1

Los valores obtenidos para la densidad de color y el color polimérico indican una baja contribución al color de los diferentes extractos debido a las antocianinas poliméricas.

El contenido de antocianinas poliméricas expresado en % de color polimérico para el EIC y el EIP, corresponde a 7,717 % ($\pm 0,091$) y 20,632 % ($\pm 0,207$) respectivamente, el primer valor coincide con los valores publicados en la literatura científica en la que para extractos de frutas y vegetales no procesados ni almacenados el porcentaje de color polimérico es usualmente menor al 10 %⁹⁶, sin embargo para el EIP este valor aumenta casi al triple de lo usual debido a que en la purificación por cromatografía en columna XAD aumenta la concentración de antocianinas poliméricas aumentando también la estabilidad del color del extracto, ya que este tipo de antocianinas (poliméricas) no muestran un cambio pronunciado reversible del color con los cambios de pH característico de las antocianinas monoméricas⁹⁷. No obstante la capacidad antioxidante puede verse disminuida de manera considerable con respecto a las antocianinas monoméricas por lo tanto el bajo contenido de antocianinas poliméricas indican que los dos extractos antocianicos tendrán una buena capacidad antioxidante.

4.5 Estudio de la estabilidad de los extractos

A pesar de las ventajas que las antocianinas ofrecen como posibles sustitutos de los colorantes artificiales, su incorporación a matrices alimenticias o productos farmacéuticos y cosméticos son limitadas, esto debido a su baja estabilidad durante el procesamiento y almacenamiento. Es conocido que este tipo de pigmentos son inestables frente a factores como altas temperaturas, presencia de oxígeno, presencia de luz y cambios en el pH⁹⁸.

⁹⁶ WROSTAD, R; and GIUSTI, M. Op. Cit. p., f. 1.2.7

⁹⁷ Ibid., F1.2.3.

⁹⁸ CISNEROS, L and CEVALLOS, B. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. En: Food Chemistry. Vol. 86 (Ago. 2004); p. 72.

En este trabajo se evaluó la estabilidad del extracto de Ivilan crudo (EIC) y del extracto de Ivilan purificado (EIP) a una concentración de 10 % p/v, frente a factores como, almacenamiento a pH 3 y pH 5 a temperatura ambiente (TA), en presencia y ausencia de aire (PA, AA), y en presencia y ausencia de luz (PL, AL). La combinación de estas variables se muestra en la tabla 14.

Tabla N° 14. Convención utilizada para las muestras almacenadas a diferentes condiciones.

Combinación de variables	Notación de la muestra	
	EIC	EIP
TA, PA, PL	1A	2A
TA, PA, AL	1B	2B
TA, AA, PL	1C	2C
TA, AA, AL	1D	2D

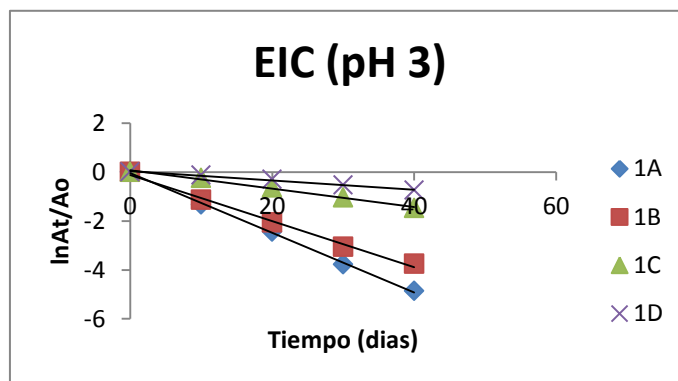
El proceso de degradación de las antocianinas, bajo las condiciones dadas en la tabla 14, se ajustó a una cinética de primer orden (gráfica 2). La constante de la velocidad de reacción (k) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el tiempo necesario para degradar el 50% de la antocianina, se calculó por medio de las siguientes ecuaciones:

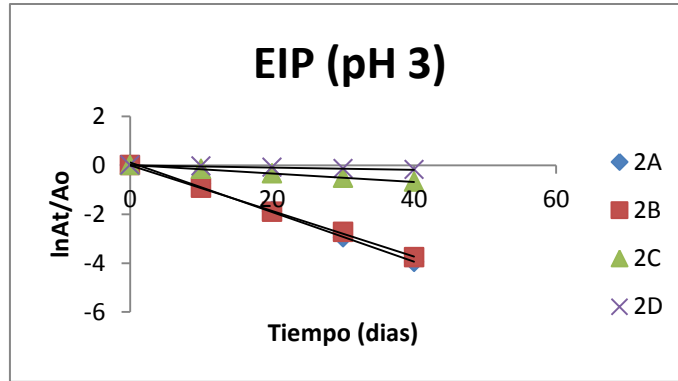
$$\ln(A_t/A_0) = -k * t \quad ; \quad t_{1/2} = -\ln 0,5 / k$$

Donde A_0 es la absorbancia inicial de la solución a la longitud de onda de máxima absorbancia y A_t corresponde a la absorbancia después de tiempo t de incubación.

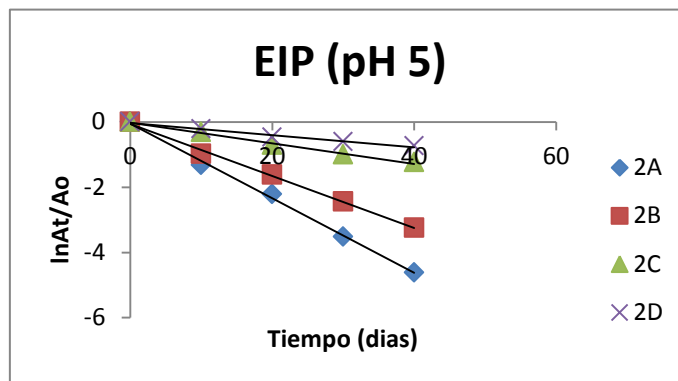
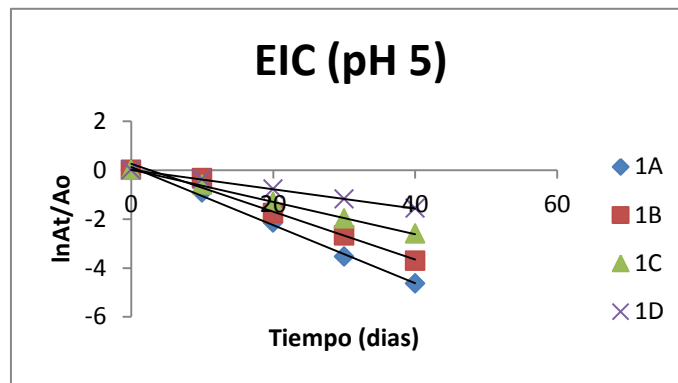
Grafica N°2 .Degradación de las antocianinas contenidas en el EIC y en el EIP almacenadas a diferentes condiciones.

a. Almacenamiento a pH 3





b. Almacenamiento a pH 5



Las constantes de velocidad y los tiempos de vida media obtenidos para el EIC y el EIP, se muestran en la tabla 15

Tabla N° 15. Parámetros cinéticos de la degradación de antocianinas del EIC y EIP a diferentes condiciones de almacenamiento.

EXTRACTO	pH	MUESTRA	-K (días) ⁻¹	t ½ (días)
EIC	3	1A	0,117	6,923
		1B	0,094	7,372
		1C	0,037	18,729
		1D	0,019	36,473
EIP	3	2A	0,101	6,862
		2B	0,093	7,451
		2C	0,017	40,765
		2D	0,004	173,250
EIC	5	1A	0,120	5,873
		1B	0,100	7,144
		1C	0,066	10,500
		1D	0,040	17,780
EIP	5	2A	0,114	6,080
		2B	0,080	8,772
		2C	0,031	22,354
		2D	0,0200	38,500

Es claro que en las dos condiciones de pH (pH 3 y pH 5), tanto el extracto crudo (EIC) como el extracto puro (EIP), muestran un mayor tiempo de vida media cuando se almacenan en ausencia de aire, esto indica el efecto nocivo del oxígeno sobre las antocianinas presentes en este tipo de disoluciones.

Un análisis más detallado de estos datos permiten establecer que la luz igualmente incide sobre la degradación de las antocianinas (condición C y D), aunque su efecto es menor que el observado con respecto al oxígeno (condición A y B). Se han encontrado investigaciones que han mostrado este mismo efecto de la luz, es decir existen antocianinas susceptibles a la degradación fotoquímica⁹⁹.

Es claro además que, bajo las dos condiciones de pH, en ausencia de aire y luz, el extracto de Ivilan purificado (EIP, condición D) presenta la mayor estabilidad (t ½: 173,3 días), lo que sugiere que la matriz inicial que acompaña al EIC posee compuestos con efectos prooxidantes que pueden degradar las antocianinas.

También es indudable que el pH influencia en gran medida la estabilidad de este tipo de extractos, siendo éstos más estables a bajo pH (pH 3: condición 2D, tiempo de vida media 173,3 días, pH 5: condición 2D, tiempo de vida media 38,5 días).

⁹⁹CISNEROS, L; et al. Op. Cit. p., 73.

La estabilidad de las antocianinas por efecto de la temperatura del EIC y del EIP se evaluó a 4 °C y 80 °C a pH 3 y a pH 5 para ambos extractos, la notación utilizada se muestra en la tabla 16, donde el numero indica el tipo de extracto es decir, 1 para el EIC y 2 para el EIP y la letra indica el valor del pH, de esta manera la letra E indica pH 3 y la letra F indica pH 5.

Debido dificultades metodológicas expuestas anteriormente (ver apartado 3.6), para la degradación a 4 °C no se realizaron ensayos en presencia de aire y luz; asimismo los análisis a 80 °C se limitaron solamente con variación de pH, en presencia de aire y luz.

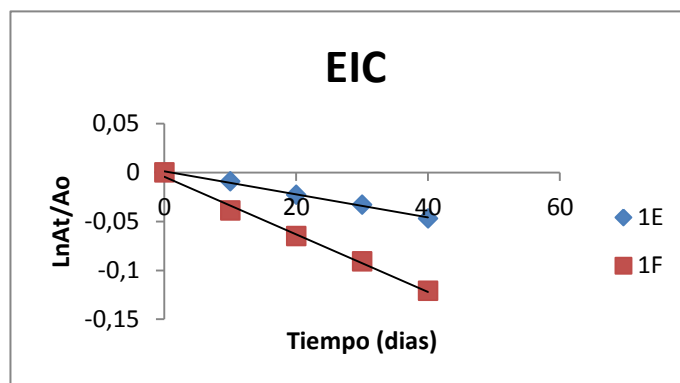
Tabla N° 16. Convención utilizada para la degradación térmica.

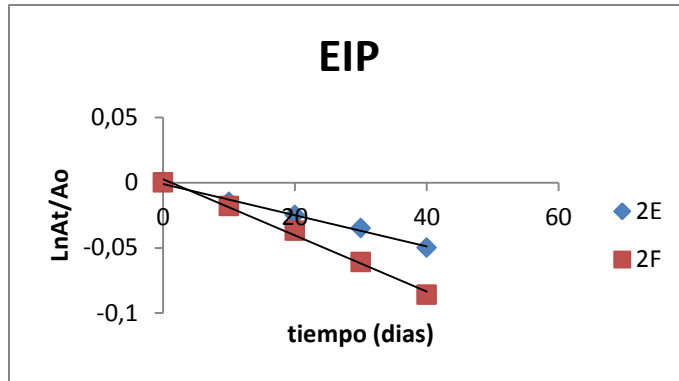
EXTRACTO	pH	MUESTRA
EIC	3	1E
EIC	5	1F
EIP	3	2E
EIP	5	2F

La degradación de los pigmentos durante el almacenamiento a 4 °C y a 80 °C siguió una cinética de primer orden para los dos extractos y para los dos valores de pH (grafica3).

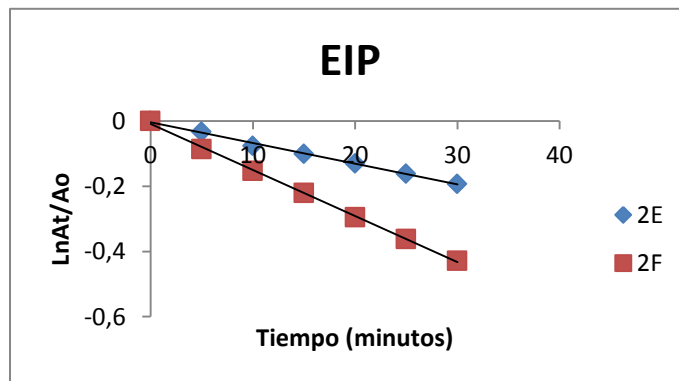
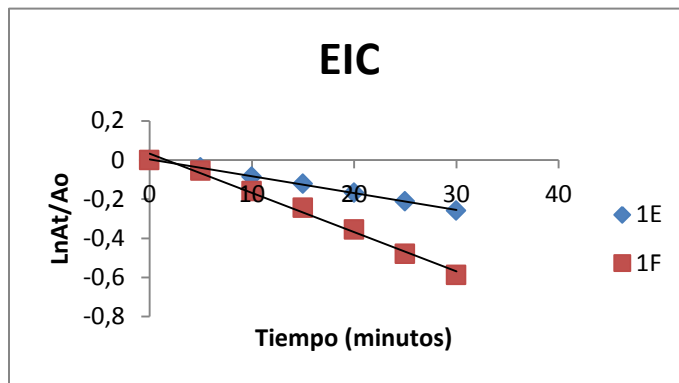
Grafica N° 3. Degradación térmica de las antocianinas contenidas en el EIC y en el EIP a pH 3 y pH 5.

a. Degradación a 4°C





b. Degradación a 80°C



La tabla 17 muestra las constantes de degradación y los tiempos de vida media para los dos extractos almacenados a 4°C y 80°C a diferentes pHs.

Tabla N° 17. Parámetros cinéticos de la degradación térmica de antocianinas del EIC y EIP.

TEMPERATURA	MUESTRA	-K(tiempo) ⁻¹	t _½ (tiempo)
4°C	1E	0,001 ^a	693 ^a
	1F	0,003 ^a	231 ^a
	2E	0,001 ^a	693 ^a
	2F	0,002 ^a	346 ^a
80°C	1E	0,008 ^b	87 ^b
	1F	0,020 ^b	35 ^b
	2E	0,006 ^b	115 ^b
	2F	0,014 ^b	49 ^b

^a días, ^b minutos

Los resultados muestran que tanto el extracto crudo (EIC) como el extracto puro (EIP) son más estables a bajas temperaturas (4 °C), asimismo es evidente que el factor que más afecta la estabilidad es el pH inclusive, en presencia de compuestos presentes en la matriz inicial que al parecer a 4 °C no interfieren en la degradación de las antocianinas, es por eso que para los dos condiciones (muestras 1E y 2E) se obtuvieron los mismos resultados.

De igual manera los resultados muestran que el extracto EIP es más estable a 80 °C que el extracto EIC, confirmando que en la solución acuosa del extracto EIC existen compuestos que afectan la estabilidad de la muestra. Es claro también que las soluciones son más estables frente al incremento de temperatura cuando se encuentran a bajo pH. Comúnmente, comportamientos estructurales que conducen a incrementar la estabilidad al pH, también conducen a incrementar la estabilidad térmica¹⁰⁰.

4.6 Capacidad antioxidante

4.6.1 Determinación de fenoles totales. El contenido fenólico para los EIC y EIP se determinó con el método de Folin Ciocalteu, que se fundamenta en la reacción de oxidación que sufren los compuestos fenólicos en presencia del reactivo de Folin, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico (H₃HW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀) que se reduce, por acción de fenoles en una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W₈O₂₃) y de molibdeno (Mo₈O₂₃) que presentan un máximo de absorción a 730 nm, y se cuantifica por espectrofotometría con base a una curva patrón de ácido gálico.

¹⁰⁰ AGUILERA, M. caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo ficus carica variedad misión, cultivado en ciudad Lerdo Durango. México. D. F, 2009 Tesis (doctorado en ciencias con acentuación en alimentos). universidad autónoma de león. Facultad de ciencias biológicas. p. 35.

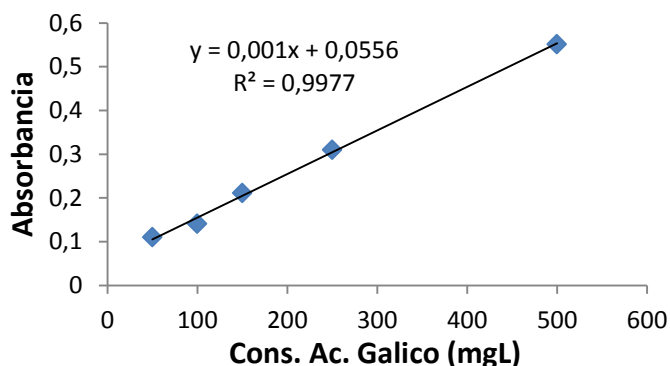
Tabla N° 18. Resultados de la prueba de Folin aplicada a patrones de ácido gálico

Concentración de ácido gálico ^a	Absorbancia ^b
50	0,11 ±0,007
100	0,141 ±0,004
150	0,211 ± 0,005
250	0,31 ±0,013
500	0,551 ±0,015

^a ppm, ^b DS de tres replicas

La tabla 18 muestra los resultados por triplicado de la prueba de Folin Ciocalteau en 5 patrones de ácido gálico, utilizados para realizar la curva de calibración (grafica 4) el coeficiente de correlación cercano a uno indica la buena linealidad de la gráfica.

Grafica N° 4. Curva de calibración de ácido gálico.



Con la ecuación de la recta se obtuvo el contenido total de fenoles para los dos extractos (EIC y EIP), los valores encontrados se muestran en la tabla 19 y se expresan como miligramos de ácido gálico por gramo de fruta este contenido fue mayor para el EIC ($155,3 \pm 0,58$), en comparación con el EIP ($120,0 \pm 1$), esto se debe a que en la primera fracción puede haber una mezcla de compuestos fenólicos diferentes a las antocianinas que se eliminaron durante el proceso de purificación.

Tabla N°19. Fenoles totales para los EIC y EIP

Extracto	Replica	Fenoles totales ^a
EIC	1	155
	2	155
	3	156
	Promedio	155,333
	DE EST	0,580
	CV	0,372
EIP	1	119
	2	121
	3	120
	Promedio	120
	DE EST	1
	CV	0,833

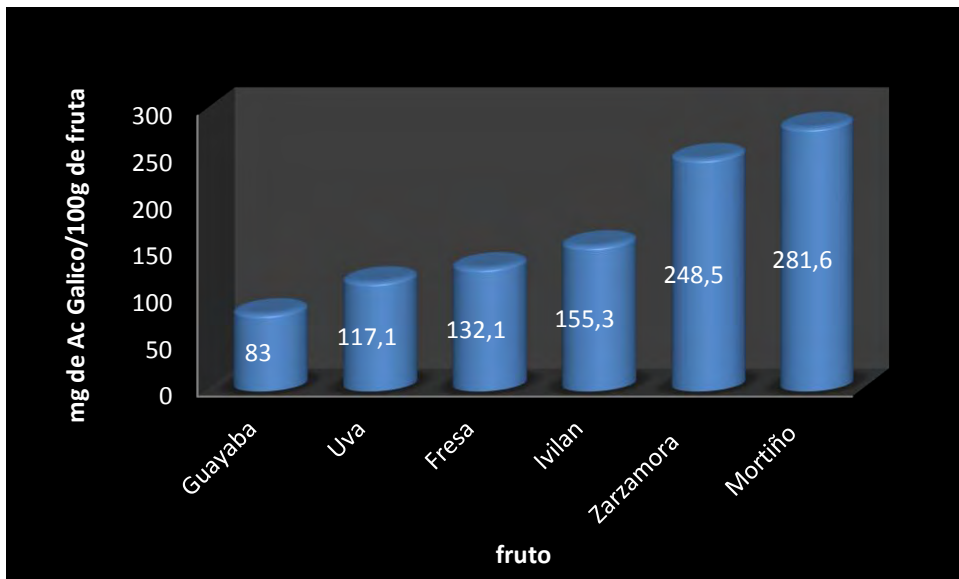
^amg ácido gálico/ 100 g de fruta

Al comparar el contenido de fenoles totales presentes en el fruto de Ivilan respecto a otros frutos reportados en la literatura, en los que las mediciones se hicieron con el mismo método y en las mismas condiciones (grafica 5), se observa que, el extracto de Ivilan contiene un elevado contenido de fenoles totales (155,3 mg/100 g de fruta), al igual que la fresa (132,1 mg/100 g de fruta), mientras que la uva (117,1 mg/100 g de fruta) y la guayaba (83 mg/100 g de fruta)¹⁰¹, muestran contenidos más bajos, aunque también elevados, sin embargo el contenido fenólico del Ivilan no supera al de la Zarzamora (248,5 mg/100 g) de fruta ni al mortiño (281,6 mg/100 g de fruta).

El elevado contenido de fenoles en el fruto del Ivilan es un factor importante que puede incidir en la medición de la actividad antioxidante de este fruto.

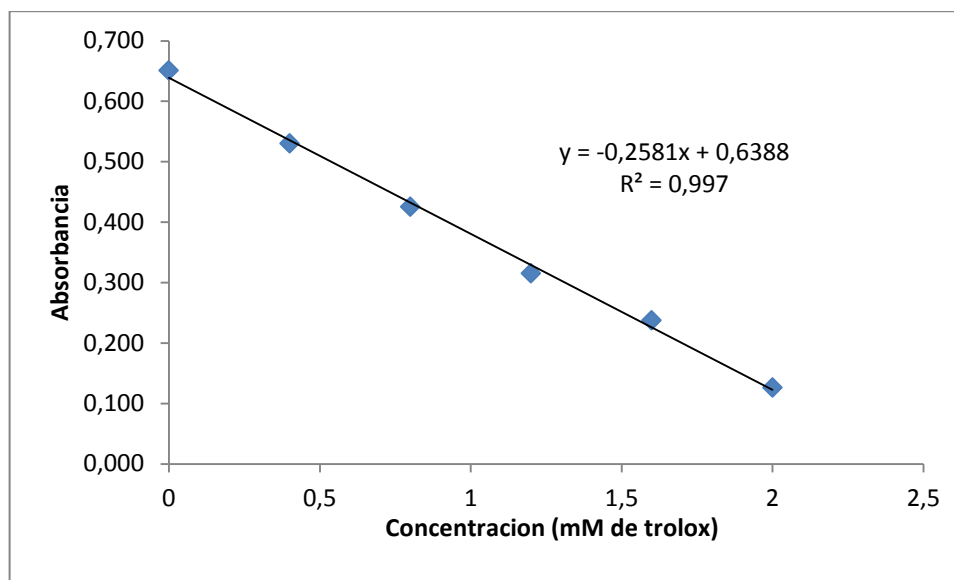
¹⁰¹KUSKOSKI, M; ASUERO, A. Op. Cit p., 728

Grafica N° 5. Comparación del contenido de fenoles totales del Ivilan con otros frutos.



4.6.2 Método TEAC. Para cuantificar la capacidad antioxidante de cada muestra por el método TEAC, se empleó una curva de calibración con patrones de trolox realizada con los datos promedio de tres replicas (gráfica 6). La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS al reaccionar con el antioxidante.

Grafica N° 6. Degradación térmica de las antocianinas contenidas en el EIP almacenadas a pH 5



Después de obtener la curva de calibración de patrones de trolox, se realizaron las mediciones espectrofotométricas de los extractos EIC, EIP y de las cuatro antocianinas mayoritarias separadas por HPLC preparativa, cada medición se realizó por triplicado (tabla 20).

Tabla N° 20. Resultados de la prueba ABTS para los diferentes extractos y las antocianinas puras.

Replica	Absorbancia Extractos		Absorbancia Antocianinas puras			
	EIC	EIP	1	2	3	4
1	0,421	0,492	0,481	0,234	0,356	0,34
2	0,417	0,493	0,445	0,21	0,379	0,361
3	0,419	0,495	0,453	0,202	0,375	0,334
promedio	0,419	0,493	0,460	0,215	0,370	0,345
DE EST	0,002	0,002	0,019	0,017	0,012	0,014
CV	0,005	0,003	0,041	0,077	0,033	0,041

Interpolando los valores obtenidos (tabla 20) en la curva de calibración (grafica 6) se calcularon los valores TEAC para cada uno de los extractos y para cada una de las antocianinas puras (tabla 21), la funcionalidad del método se comprobó utilizando un patrón de ácido ascórbico.

Tabla N° 21. Resultados de TEAC en los diferentes extractos y en el patrón de ácido ascórbico.

Muestra	TEAC
EIC	8,500 ($\pm 0,078$) ^a
EIP	5,607 ($\pm 0,060$) ^a
Antocianina 1	0,691 ($\pm 0,073$) ^b
Antocianina 2	1,638 ($\pm 0,065$) ^b
Antocianina 3	1,039 ($\pm 0,048$) ^b
Antocianina 4	1,136 ($\pm 0,055$) ^b
Ácido ascórbico	0,970 ($\pm 0,010$) ^c

^a μmol de trolox/g de fruto, ^b μmol de trolox/g de extracto, ^c mM de trolox

El valor de capacidad antioxidante TEAC obtenido para el ácido ascórbico ($0,968 \pm 0,01$), fue similar al reportado por Re ($1,05 \pm 0,02$)¹⁰², indicando la buena funcionalidad del método. Los valores obtenidos para el EIC y el EIP (tabla 21) muestran que el extracto de mayor capacidad antioxidante fue el EIC lo que se esperaba en contraste con los resultados de los fenoles totales ya que en el proceso de purificación posiblemente se eliminaron fenoles u otros compuestos que ejercen algún efecto sinérgico en el extracto disminuyendo así su capacidad antioxidante.

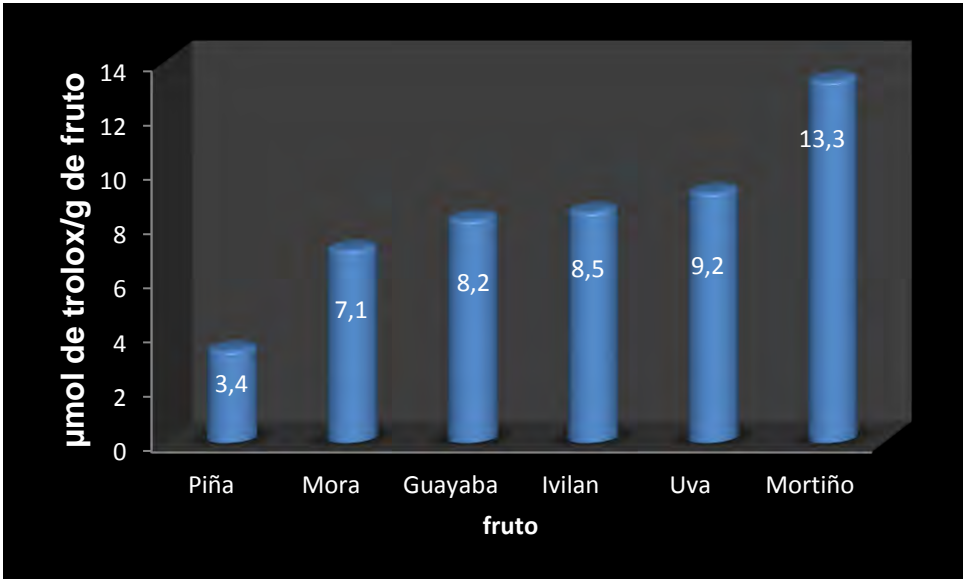
En cuanto a la capacidad antioxidante de las antocianinas puras (tabla 21), los resultados muestran que la antocianina 2 presenta mayor actividad antioxidante seguida de la 4, 3 y por último la 1.

En comparación con otros frutos (grafica 7), el valor TEAC para el fruto de Ivilan ($8,50 \pm 0,07$) fue mayor que el reportado para la piña ($3,4 \pm 0,3$), mora ($7,1 \pm 0,2$), guayaba ($8,2 \pm 0,4$), aunque fue menor que el de la uva ($9,2 \pm 0,2$)¹⁰³ y el mortiño ($13,3 \pm 0,4$) indicando que como alimento este fruto aporta grandes beneficios para la salud.

¹⁰² RE, R and PELLEGRINI, N. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free radicals biology and Medicine. Vol. 9, No. 10 (may. 1999); p. 1235.

¹⁰³ KUSKOSKI, M; ASUERO, A. Op. Cit. p., 729

Grafica N° 7. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del fruto de Ivilan con otros frutos



CONCLUSIONES

Se pudo establecer que en el extracto de Ivilan puro., EIP (fracción retenida en la resina), el contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas fue superior al encontrado en el extracto crudo., EIC (fracción soluble en metanol), esto sugiere una buena eficiencia en el proceso de purificación del extracto.

En cuanto al contenido de fenoles totales, este fue mayor en el EIC que en el EIP. Estos resultados evidencian que existen compuestos fenólicos incoloros que se eliminan durante el proceso de purificación de la fracción coloreada. Se debe resaltar además que el contenido de fenoles totales del fruto de Ivilan es superior al encontrado en frutos como la fresa, la uva, la guayaba (datos obtenidos en las mismas condiciones).

Mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas, espectroscopia UV-Vis fue posible identificar los cuatro pigmentos mayoritarios la Vitisin b de la peonidina-3-O-(6''-O-succinil- α ramnosa)-O-acetil- β glucosido (antocianina 1), la delphinidina-3-O-((feruillil) (propionil)- β ramnosa)-O- β glucosido (antocianina 2), un derivado de la peonidina con dos azúcares y dos grupos acilo p-cumaroil y un grupo acilo p-hidroxibenzoico (antocianina 3), y la cianidina-3-O-((galoil) (propionil)- α xilosa)-O-malonil- β glucosido (antocianina 4).

Con respecto a los estudios cinéticos, se concluye que el proceso de degradación de este tipo de extractos sigue una cinética de primer orden. Evaluando aspectos como el tiempo de vida media y las constantes de degradación, fue evidente que el pH es el parámetro que más influye en el proceso de degradación de EIC y EIP. El EIP almacenado a pH3, en presencia de luz y aire, fue más resistente a la degradación que el EIC almacenado bajo las mismas condiciones, se puede concluir también que en el EIC pueden existir compuestos que hacen a este extracto menos estable que el EIP y además que los dos extractos se degradan menos cuando se almacenan a 4°C.

En cuanto a la actividad antioxidante se concluye que el extracto con mayor capacidad para capturar el radical ABTS (método TEAC) fue el EIC, esto está en concordancia con su mayor contenido de fenoles, que de acuerdo con la literatura científica se usan como antioxidantes. La mayor capacidad antioxidante de la antocianina 2, está relacionada con la estructura del anillo B, es conocido que grupos hidroxilo en posición orto, como es el caso de las agliconas delphinidina y cianidina de los pigmentos 2 y 4, presentan una mayor eficiencia para capturar radicales libres.

RECOMENDACIONES

Se recomienda purificar mayor cantidad de muestra con el fin de confirmar inequívocamente por resonancia magnética nuclear (^{13}C -RMN, HSQC, HMQC, NOESY, TOCSY) la estructura completa de los pigmentos aislados. Uno de los métodos alternativos con los que se purifica una mayor cantidad de muestra, en corto tiempo, es la cromatografía en contracorriente.

Es de gran interés no solo evaluar otros métodos para medir la capacidad de captura radical *in vitro* (DPPH, ORAC, peroxidación lipídica etc), sino también, implementar análisis a nivel *in vivo*, esto con el fin de conocer con mayor certeza las propiedades nutraceuticas del fruto de Ivilan.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILERA, M. caracterización y estabilidad de las antocianinas de higo ficus carica variedad misión, cultivado en ciudad Lerdo Durango. México. D. F, 2009 Tesis (doctorado en ciencias con acentuación en alimentos). universidad autónoma de león. Facultad de ciencias biológicas. p. 151.

ARAVENA, N y LAGOS, G. Evaluación de un extracto obtenido a partir de la fracción no exportable de mora cultivada var. Blac Satin (rubusssp.) para su posible utilización como colorante natural. Chile, 2004. Trabajo de grado (ingeniería de alimentos). Universidad del Bio-Bio. facultad de ciencias de la salud y alimentos. Escuela de ingeniería de alimentos. p. 82.

BECERRA, Liliana; y Daza, Fredy. Estabilidad y capacidad antioxidante de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (Hyeronimamacrocarpa). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p 87.

BERMUDEZ, M and LARROSA, M. Up-regulation of tumor suppressor carcino embryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 in human colon cancer Caco-2 cells following repetitive exposure to dietary levels of a polyphenol-rich chokeberry juice. En: Journal of Nutritional Biochemistry. Vol. 18 (may. 2007); p. 259–271.

BRIDLE, P and TIMBERLAKE, C. Anthocyanins as Natural Food colours- selecte aspects. En: Food chemistry. Vol.58, No. 1 (Feb. 1997); p. 103-109

BROENNUM, H and FLINK, J. Anthocyanin colorants from elderberry (sambucus nigra l.), storage stability of the freeze dried product. En: Journal food technology. Vol. 20, No. 6 (Dic. 1985); p. 725–733.

CABRITA, L and FOSSEN, T. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. En: Food Chemistry. Vol. 63, No. 4 (abr.1998); p. 435-440.

CAO, G and SOFIC, E. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids. En: Structure- activity relationships, Free Radical Biology and Medicine. Vol. 22, No. 5 (jun. 1997); p. 749-760.

CARERI, M; MANGIA, A and MUSCI, M. overview of applications of liquid chromatography-mass spectrometry interfacing systems in food analysis: naturally occurring substances in food. En: Journal Chromatography. Vol. 794 (abr. 1998); p. 263-297

CASASSA, F y CATANIA, C piranoantocianinos, nuevos pigmentos en los vinos tintos. En: enología. No. 3 (ago. 2006); p. 1-20.

CASTAÑEDA, A; HERNÁNDEZ, M; HERNÁNDEZ, E; and RODRÍGUEZ, A. Chemical studies of anthocyanins. En: Food Chemistry. Vol. 113 (nov. 2009); p. 859–871.

CISNEROS, L and CEVALLOS, B. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. En: Food Chemistry. Vol., 86 (Ago. 2004); p. 69–77.

CHUN, Y and HEE, W. Corn Husk as a Potential Source of Anthocyanins. En: Journal agricultural and food chemistry. Vol. 56 (mar.2008); p. 11413–11416

COUTINHO, M and QUADRI, M. Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage). En: Science and Technology. Vol. 39, No. 16 (feb. 2004); p. 3769–3782.

DA COSTA, C and Horton, D. Analysis of anthocyanins. En: foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. vol. 2, No. 881 (jul. 2000); p. 403-410

DAO, L; TAKEOKA G; EDWARDS R and BERRIOS J. Improved method for the stabilization of anthocyanidins. En: Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 46, No 9 (Ago. 1998); p. 3564-3569.

DARAVINGAS, G and CAIN, R. Thermal Degradation Of Black Raspberry Anthocyanin Pigment In Model Systems. En: Journal of Food Science. Vol. 33, No. 2 (Mar. 1968); p. 138–142.

DELGADO, V; JIMENEZ, A y PAREDES, L. Natural pigments, carotenoids, anthocyanins, betalains- characteristic, biosynthesis, processing and stability. En: food science and nutrition. Vol. 40, No. 3 (May. 2000); p. 173-289.

Departamento de Nariño, Informe Departamental de Evaluación del Desempeño de la Gestión Municipal, período 2005, San Juan de Pasto, 2006, p. 107.

EFFENDI, L and YAJUN, Y. Strain Improvement of Recombinant Escherichia coli for Efficient Production of Plant Flavonoids. En: Molecular pharmaceuticals. Vol. 5, No. 2 (Febr. 2008); p. 257–265.

FOSSSEN, T; and ANDERSEN, M. Anthocyanins from maize (*zea mays*), and reed canarygrass (*phalaris arundinacea*). En: Journal agricultural and food chemistry. Vol. 5, No. 49 (sep. 2001); p. 2318-2319.

FROYTLOG, C and SLIMESTAD, R. Combination of chromatographic techniques for the preparative isolation of anthocyanins –applied on blackcurrant (*Ribes nigrum*) fruits. En: Journal of Chromatography. Vol. 825, No. 1 (mar. 1998); p. 89–95.

GARZÓN, M. LAS ANTOCIANINAS COMO COLORANTES NATURALES Y COMPUESTOS BIOACTIVOS. En: Acta biologica colombiana. Vol. 13 No. 3 (feb. 2008); p. 27 – 36.

GIUSTI, M and RODRIGUEZ, S. Anthocyanin pigment composition of red radish cultivars as potential food colorants. En: Journal of Food Science. Vol. 63, No. 2 (mar. 1998); p. 219-224.

GIUSTI, M and WROLSTAD, R. acylated anthocyanin from edible sources and their applications in food. En: Biochemical engineering journal. Vol. 14, No. 3 (jun. 2003); p.217-225

GIUSTI, M. M; RODRIGUEZ, S and WROLSTAD, R. Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives. En: Journal. agricultural. Food chemistry. Vol. 47 (jul. 1999); p. 4631-4637

GUTIÉRREZ, I. Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. En: Revista de enología. Vol., 1, No. 81 (oct. 2007); p. 77-83

HARBORNE, J; MABRI, T; and MABRI, H. THE FLAVONOIDS. 3ª. New York: chapman and hall. 1975. 1204 p.

HERNÁNDEZ, A. Estabilización de antocianinas extraídas de rosas rojas por medio de la copignacion para su uso como colorante natural en la industria alimenticia y farmacéutica. México D.F, 2003. Trabajo de grado (licenciatura, químicofarmacobiología). Universidad de las Américas – Puebla. Departamento de biología. p. 37.

HOUNG, S. chromatographic analysis of anthocyanins. En: journal of chromatography. Vol. 624, No. 30 (Oct. 1992); p. 221-234.

ISHIKAWA, T; and KONDO, T. An acylated anthocyanin from the blue petals of *Salvia uliginosa*. En: Journal of Sciences, phytochemistry. Vol. 52, No. 3 (oct. 1999); p. 517-521.

JACKMAN, R; YADA, R; TUNG, M and SPEERS, R. Anthocynins as food colorants. En: Journal Food Biochemistry. Vol. 11, No. 3 (Sep. 1987); p. 201–247.

JANNA, O and KHAIRUL, A. Anthocianin stability studies in tibouchina semidecandra. En: journal of biochemstry and molecular biology. Vol. 101 (feb. 2007); p. 1640–1646.

JIE, Z and CHENXU, D. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild Lycium ruthenicum Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. En: Food Chemistry. Vol. 126 (Nov. 2010); p. 859–865.

JIMENEZ, Juan; y Villareal, John. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilon (*Hyeronimamacrocarpa*). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 103.

JORDHEIM, M. Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms. Bergen, 2007. Tesis (postdoctor). University of Bergen. Department of chemistry. p. 85.

KASIPONG, K and PONGSAGON, P. Anthocyanin Composition of Wild Bananas in Thailand. En: Journal agricultural and food chemistry. Vol. 56 (jun. 2008); p. 10853–10857

KIRCA, A and OZKAN, M. Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars. En: Food Chemistry. Vol. 97, No 4 (Ago. 2006); p. 598-605

KUSKOSKI, M and ASUERO, A. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. En: Ciencia tecnología y alimentos. Vol. 24 (jun. 2004); p. 691-693.

LEYVA, D. Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante en licores y fruto de mora. Oaxaca, 2009. Trabajo de grado (ingeniería de alimentos). Universidad tecnológica de la mixteca. p 80.

LIANG, L and CAO, S. Thermal Degradation Kinetics of Three Kinds of Representative Anthocyanins Obtained from Blood Orange. En: Agricultura Sciences in China. Vol. 10 (abr. 2011); p. 642-649.

LOCK, O. COLORANTES NATURALES. 1ª. Lima: fondo editorial de la pontificia Universidad católica del, Perú 1997. 252 p.

LONGO, L and VASAPOLLO, G. Anthocyanins from bay (*Laurus nobilis* L.) berries. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 53, No. 20 (abr. 2005); p. 8063–8067

- LÓPEZ, M. Flavonoides. En: OFFARM. Vol. 21, No. 4 (Abr. 2002); p. 108-113.
- MABRY, T; Markham, K; and Thomas, M. The Systematic Identification of Flavonoids. 1ª. New York: Springer-Verlag. 1970. 354 p.
- MACCARONE, E and RAPISARDAP. Estabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. En: Journal food science. Vol. 50, No. 4 (Jul. 2006); p 901–904.
- MARTINEZ, G. Los flavonoides. Propiedades y acciones antioxidantes. En: Nutrición hospitalaria. Vol.17, No. 6 (Ago. 2007); p. 271-278.
- MARTÍNEZ, J and ZAMBRANO, H. Estabilidad de antocianinas en Jugo y Concentrado de Agraz (*Vaccinium meridionale* Sw). En: Revista Facultad nacional de agronomía, Medellín. Vol. 64, No. 1 (mar. 2011); p. 6015-6022
- MERKEN, H and BEECHER, M. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography. En: Journal agricultural Food chemistry. Vol. 48, No. 3 (Mar. 2000); p. 577-599
- MIGUEL, G. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory Activities. En: Journal of Applied Pharmaceutical Science. Vol., 06 (jun. 2011); p. 7-15.
- MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. En: Journal science and technology. Vol. 26 (mar. 2004); p. 211-219
- MUÑOZ, Isabel; y ROJAS, Víctor. Determinación de la capacidad protectora de antocianinas de un extracto de vitis vinifera en aortas de rata sometidas a estrés oxidativo. Chile, 2005. Trabajo de grado (licenciado en kinesiología). Universidad de Chile. Facultad de medicina. Escuela de kinesiología. p 37.
- OYVIND, M and ANDERSEN, M. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *synadenium grantii* (Euphorbiaceae). En: phytochemistry. Vol. 71 (abr. 2010); p.1558-1563.
- ØYVIND, M; TORGILS, F. Characterization of Anthocyanins by NMR. En: Food Analytical Chemistry. (jun. 2003) F1.4.1-F1.4.23
- OVANDO, A; HERNÁNDEZ, M and RODRÍGUEZ, J. Chemical studies of anthocyanins. En: Food Chemistry. Vol. 113 (nov. 2008); p. 859–871.
- PIÑEIRO, Z. Desarrollo de nuevos métodos de extracción para el análisis de compuestos de interés enológico. Puerto Real, 2005, Tesis (doctorado en ciencias químicas). Universidad de Cádiz. Departamento de química analítica. p. 284.

POO, Susan. Concentración de Antocianinas en Jugo de Cranberries (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) mediante Nanofiltración. Chile, 2005. Trabajo de grado (licenciado en ciencia de los alimentos). Universidad austral de Chile. Facultad de ciencias agrarias. Escuela de ingeniería en alimentos. p 71.

PORTILLO, Dairo; y VILLACRÉZ, José. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*vaccinium floribundum* H.B.K.). Trabajo de grado (química). Pasto, 2008, Trabajo de grado (química). Universidad de Nariño. Facultad de ciencias exactas y matemáticas. Departamento de química. p. 128.

RAMÍREZ, R and QUIÑONES, W. perfil cromatográfico de las antocianinas presentes en algunos frutos colombianos. En: scientia et technica. Vol. 13, No. 033 (may. 2007); p. 274-276

RE, R and PELLEGRINI, N. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. En: Free radicals biology and Medicine Vol., 9, No 10 (may, 1999); p. 1231-1237

REBOLO, S. estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, valdeorras y ribeirasacra. España, 2007. Tesis (doctorado en ciencias químicas). Universidad de Santiago de compostela. Facultad de ciencias. Departamento de química analítica, nutrición y bromatología. p. 201.

REIN, Maarit. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. Finland, 2005. Trabajo de grado. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Applied Chemistry and Microbiology. p 68.

RUFINO, M and ALVES, R. Free radical scavenging behavior of ten exotic tropical fruits extracts. En: Food Research International. Vol. 44, No. 7 (ago. 2011); p. 2072-2075

SALDAÑA, M. Efecto de la Copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (*Prunus domestica*). México D.F, 2004, Trabajo de grado (Licenciatura en Quimicofarmacobiología). Universidad Las Américas. Escuela de ciencias. Departamento de Química y Biología. P.123.

SANCHEZ, C and LARRAURI, J. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols- En: Journal of Science Food Agriculture. Vol.78 (feb. 1998); p. 270-276.

SANTACRUZ, L. ANÁLISIS QUÍMICO DE ANTOCIANINAS EN FRUTOS SILVESTRES COLOMBIANOS. Bogotá, 2011. Tesis (Maestría en Ciencias Químicas). Universidad nacional de Colombia, facultad de ciencias, departamento de química. p. 106.

SCHWARZ, M and HILLEBRAND, S. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of the anthocyanin. En: Biochemical engineering journal. Vol. 14, No. 3 (jun. 2003); p. 179-189

SCORDINO, M and PASSERINI, A. Adsorption of flavonoids on resins. En: Journal agricultural and Food chemistry. Vol. 52, (may. 2004); p. 1965-1972

SPEDES, C and HAFIDI, M. Antioxidant and cardioprotective activities of phenolic extracts from fruits of Chilean blackberry *Aristotelia chilensis* (Elaeocarpaceae), Maqui. En: Food Chemistry. Vol. 107 (ago. 2008); p. 820–829

SEYIN, C and ELIK, A. Phytochemical accumulation and antioxidant capacity at four maturity stages of cranberry fruit. En: Scientia Horticulturae. Vol. 117 (May. 2008); p. 345–348.

SKOUROUMOUNIS, G and HAYASAKA, Y. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 52 (nov. 2004); p. 7144–7151.

SNYDER, P. Biochemical and Biotechnological Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry. 4^a. California: Editorial American Chemical Society. 1996. 678p.

WANG, Z; WANG, P and QING, Q. Anthocyanin composition and content of the *Vaccinium uliginosum* Berry. En: Food Chemistry. Vol. 125, No. 3 (Ago. 2011); p. 116–120.

WROLSTAD, R . Handbook of food analytical chemistry 1^a. United States of America: John Wiley. 2005. 591 p.

WROLSTAD, R and DURST, W. Tracking color and pigment changes in Anthocyanin products. En: Food Science & Technology. Vol. 16 (nov. 2005); p.423–428.

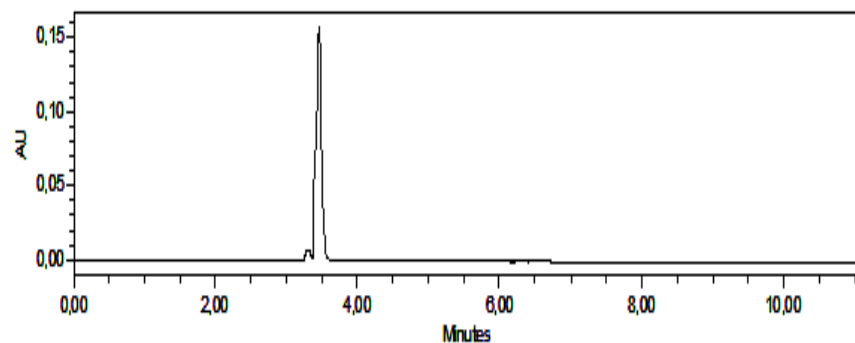
WROSTAD, R and GIUSTI, M. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En Food Analytical Chemistry. (jun. 2001), F1.2.1- F1.2.9.

ZHENG, J and CHENXU, D. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. En: Food Chemistry. Vol. 126 (abr. 2011); p. 859–865.

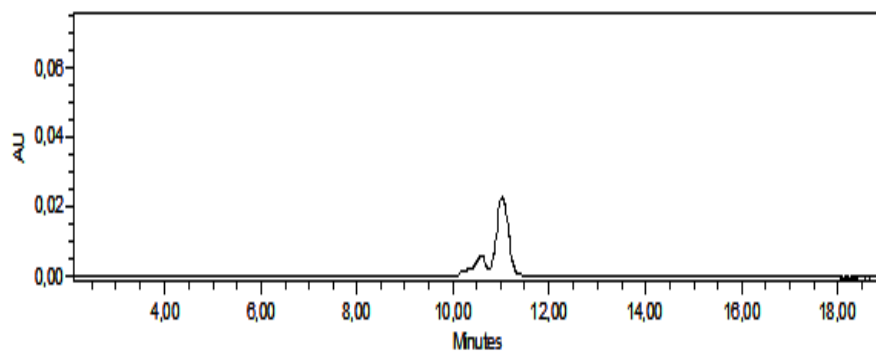
ANEXOS

Anexo A. Cromatogramas de las antocianinas mayoritarias separadas por HPLC tipo preparativo a 520nm

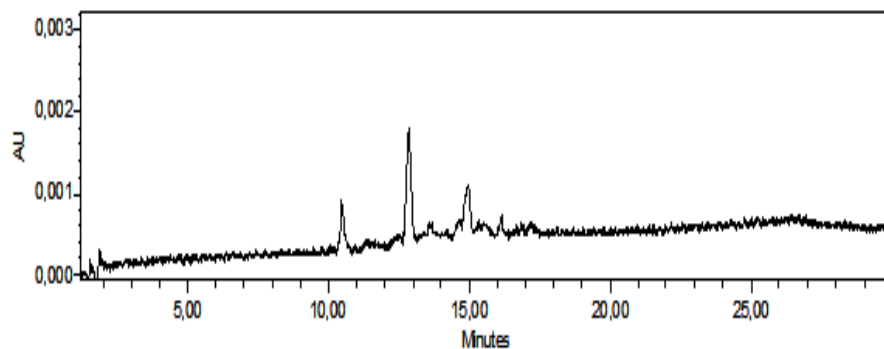
a. antocianina 1



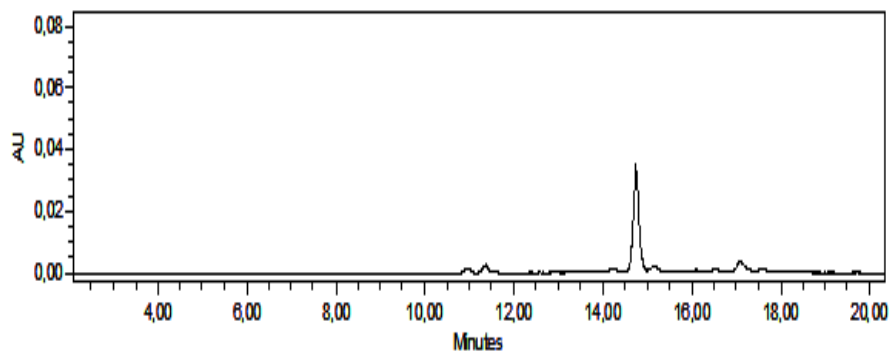
b. antocianina 2



c. antocianina 3

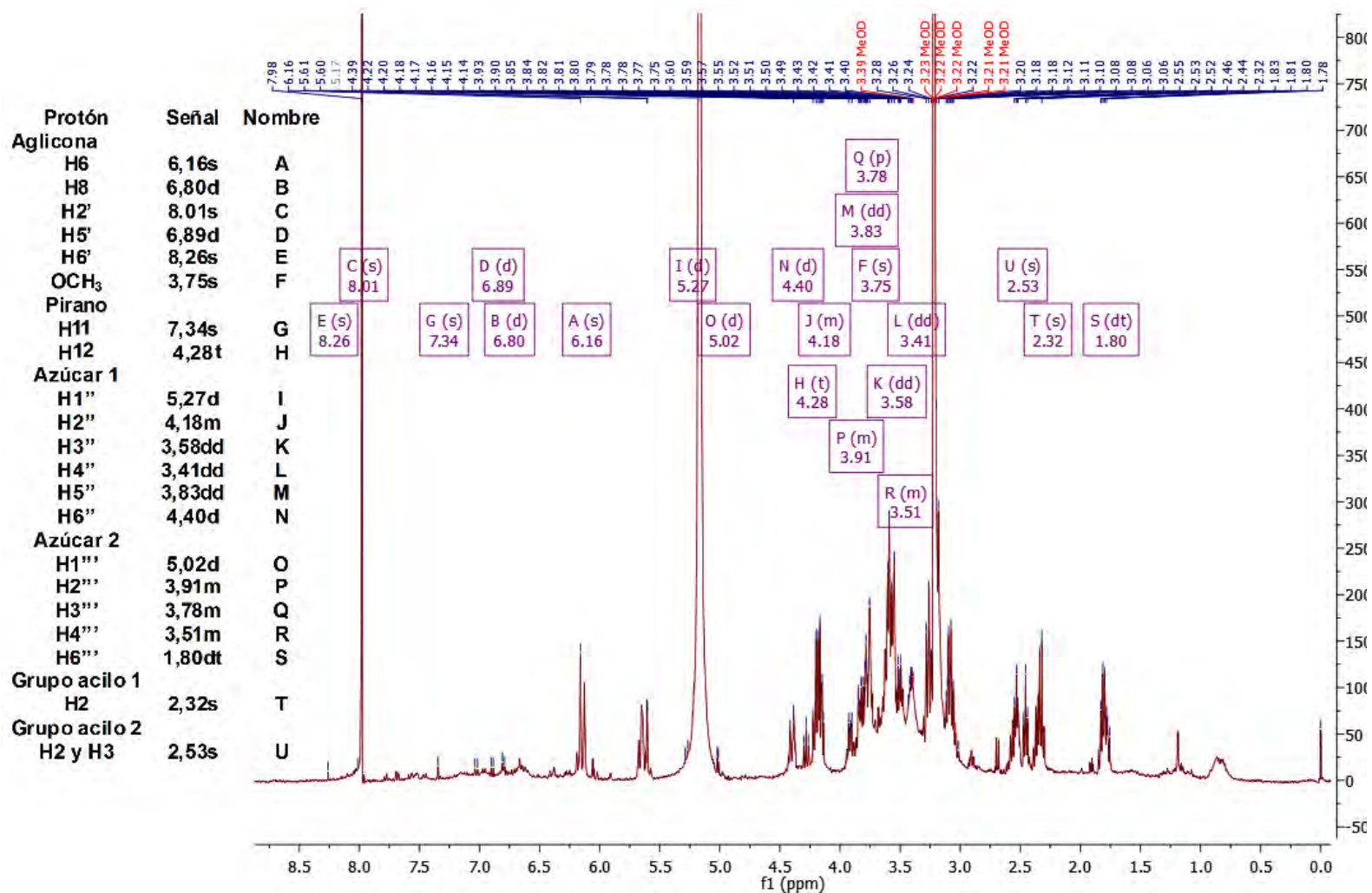


D. Antocianina 4

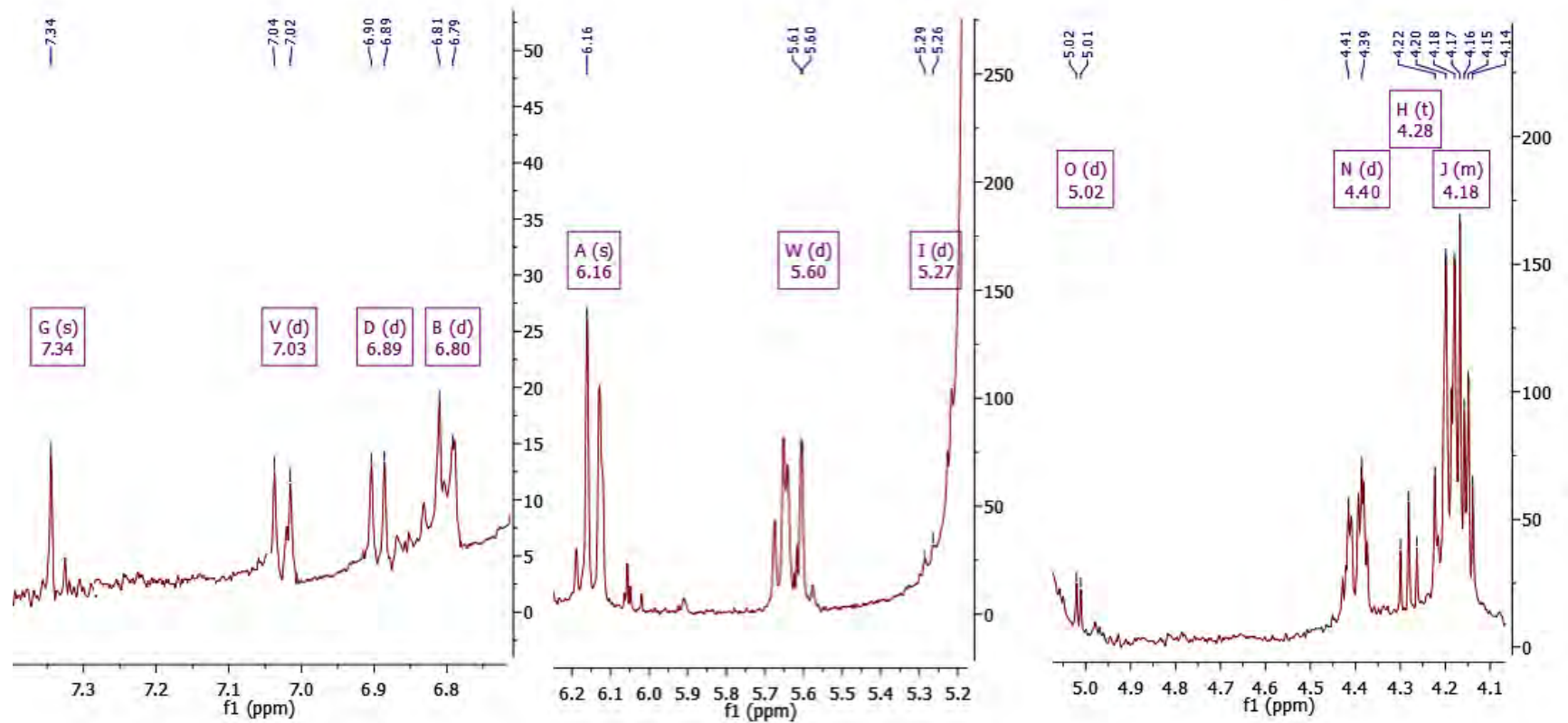


Anexo B. espectros RMN ¹H de las antocianinas mayoritarias

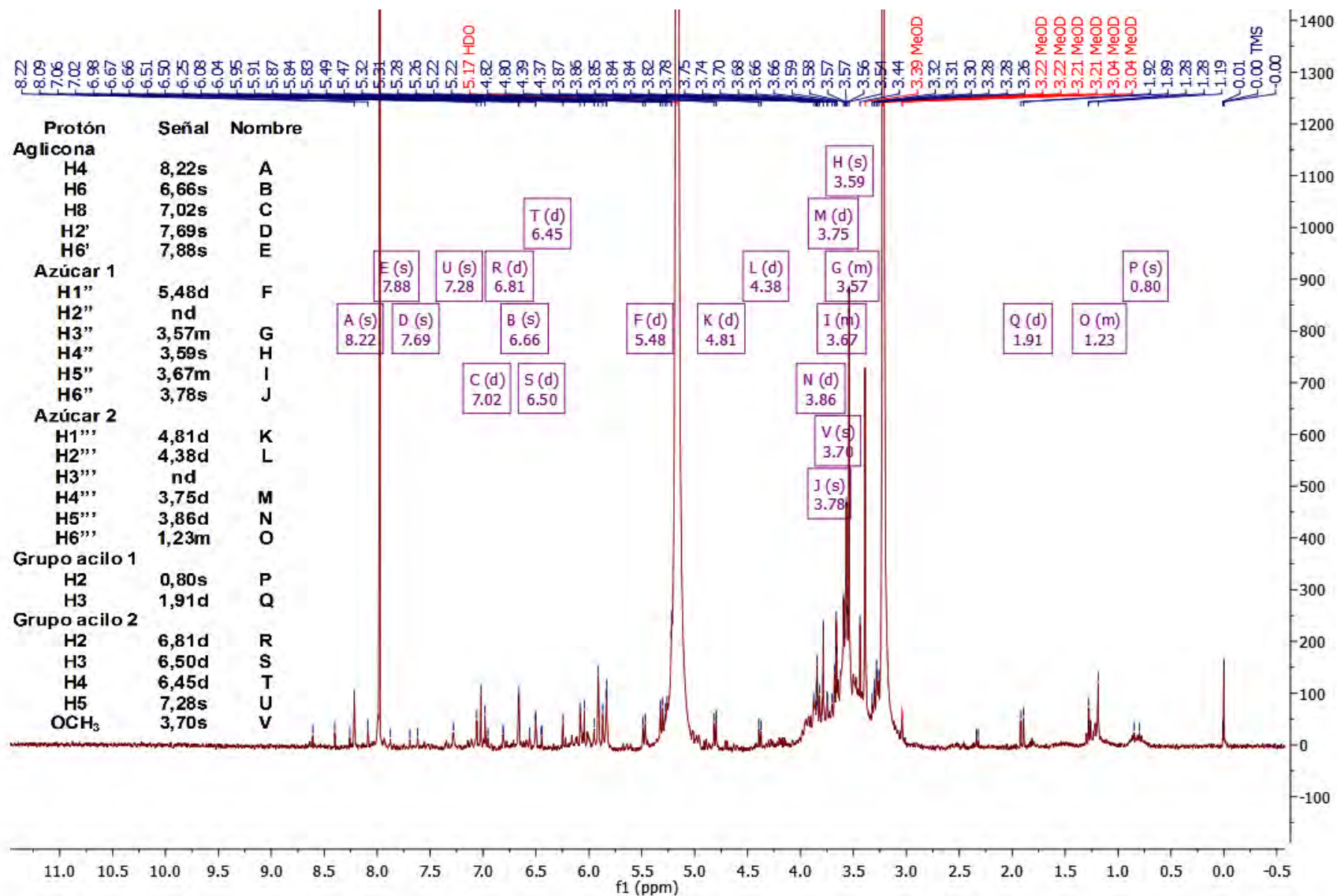
a. Espectro RMN ¹H del pigmento 1



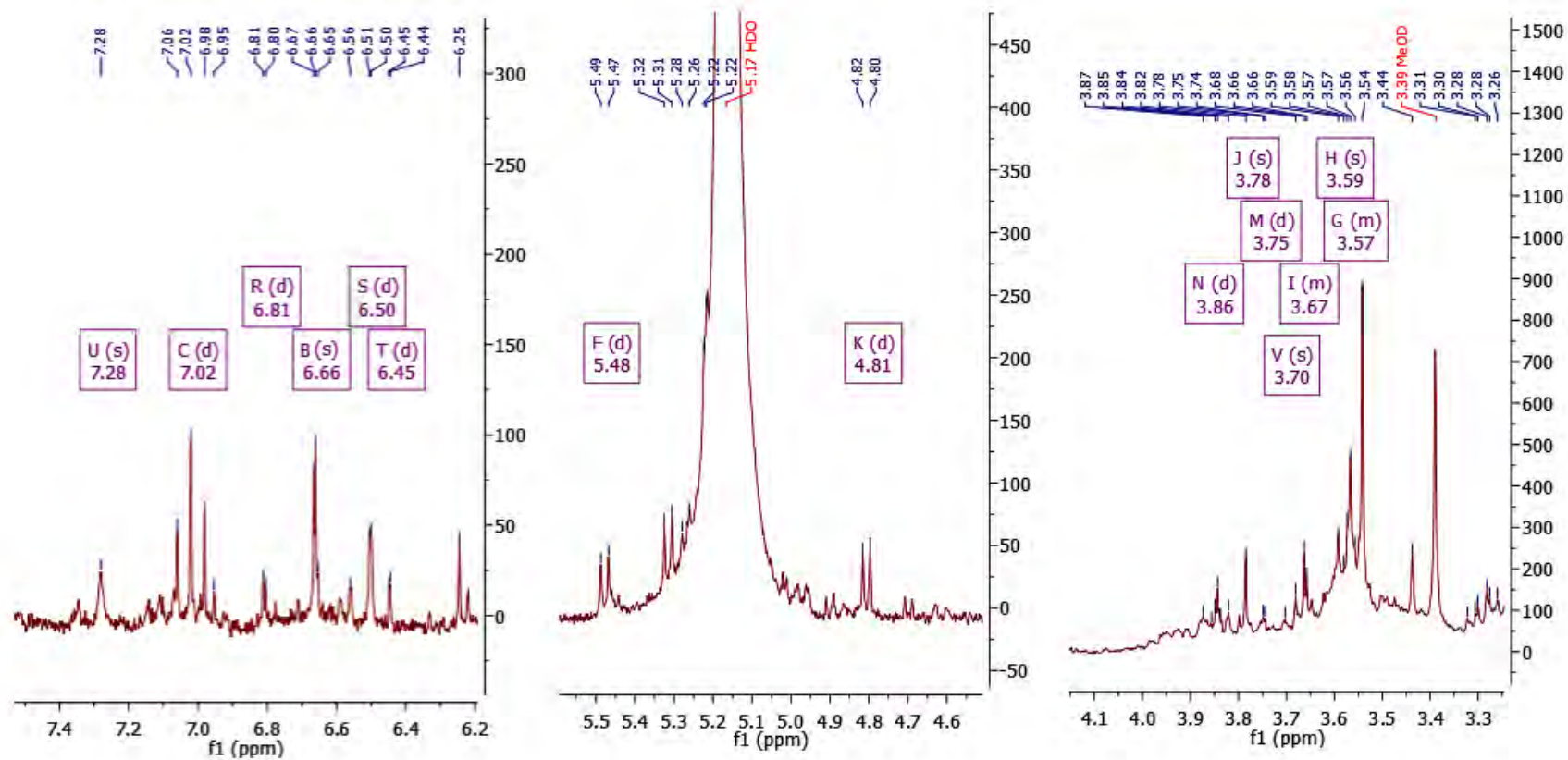
b. expansiones del espectro RMN ^1H del pigmento 1



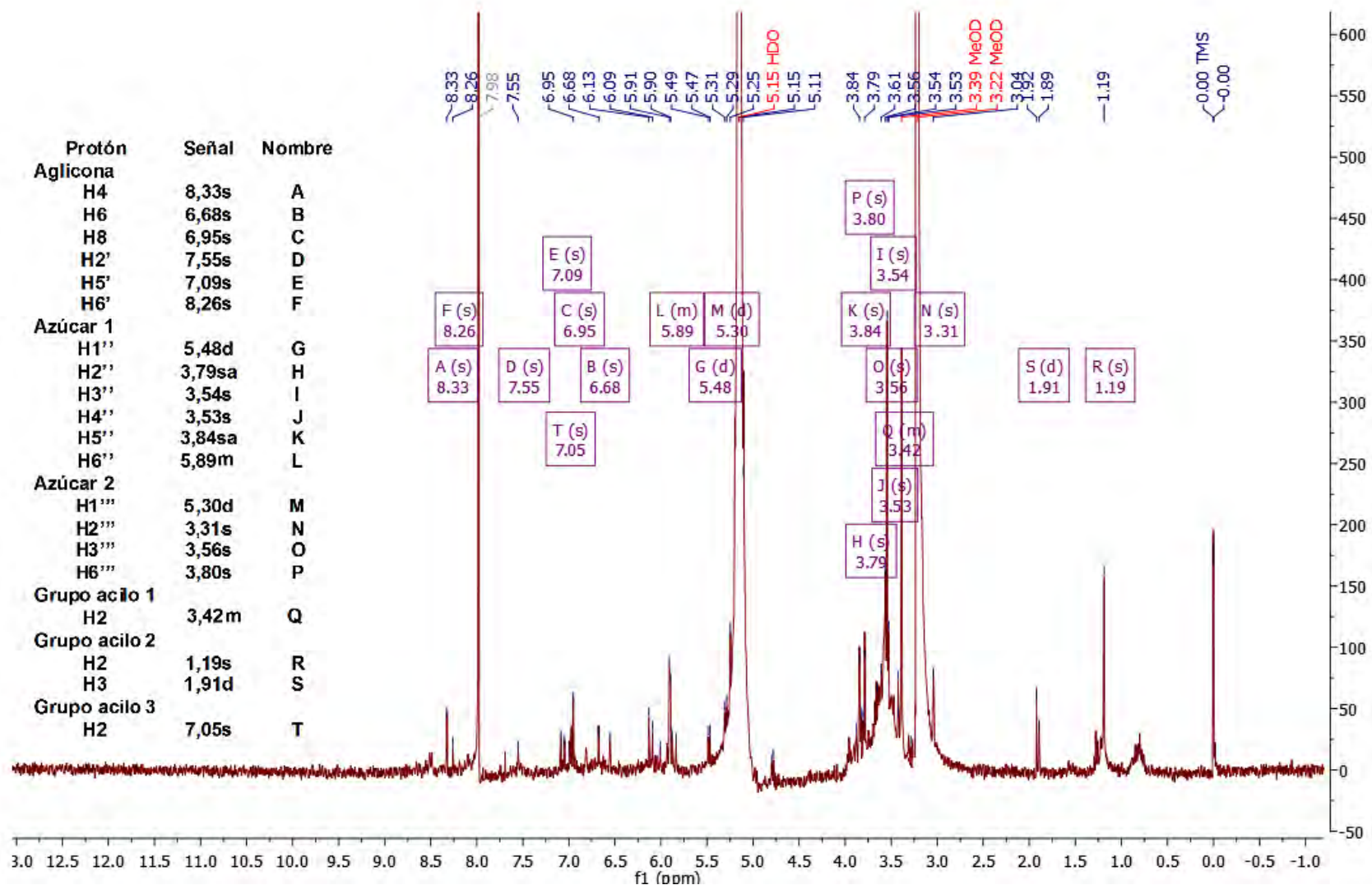
c. Espectro RMN ¹H del pigmento 2



d. expansiones del espectro RMN ^1H del pigmento 2



e. Espectro RMN ¹H del pigmento 4



f. expansiones del espectro RMN ^1H del pigmento 4

