

ESTABILIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PIGMENTOS TIPO
ANTOCIANINA PRESENTES EN EL FRUTO DEL MOTILON (*Hieronima
macrocarpa*)

LILIANA MARCELA BECERRA FIGUEROA
FREDY SAMIR DAZA DIAZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PASTO
2008

ESTABILIDAD Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS PIGMENTOS TIPO
ANTOCIANINA PRESENTES EN EL FRUTO DEL MOTILON (*Hyeronima
macrocarpa*)

LILIANA MARCELA BECERRA FIGUEROA
FREDY SAMIR DAZA DIAZ

Trabajo de grado presentado al Comité Curricular del Departamento de Química
como requisito parcial para optar al título de Químico

DIRECTORES:
NELSON HURTADO, Ph. D.
SILVIA CRUZ, Ph. D

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA
PASTO
2008

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

Artículo 1º del acuerdo No 324 del 11 de Octubre de 1996, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

Director

Jurado

Jurado

Pasto, Septiembre de 2008

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	18
1 OBJETIVOS	20
1.1 OBJETIVO GENERAL	
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
2 ESTADO DEL ARTE	21
2.1 POLIFENOLES	21
2.2 FLAVONOIDES	23
2.3 ANTOCIANINAS	26
2.3.1 Ruta metabólica de las antocianinas	27
2.3.2 Composición de Pigmentos Antociánicos	31
2.3.3 Antocianinas como colorantes para alimentos	34
2.3.4 Antocianinas como antioxidantes	35
2.3.5 Cuantificación de fenoles totales	36
2.3.6 Estabilidad de las antocianinas	36
2.3.6.1 Efecto del Ph	38
2.3.6.2 Efecto de la temperatura	38
2.3.6.3 Efecto de la luz	38
2.3.6.4 Efecto del aire	39
2.4 OTROS TIPOS DE PIGMENTOS NATURALES	39

2.4.1	Clorofilas	39
2.4.2	Carotenoides	40
2.4.3	Betalainas	40
2.4.4	Pigmentos originados por la reacción de Maillard	41
3	METODOLOGIA	42
3.1	SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	42
3.2	EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS	42
3.3	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS POR EL MÉTODO DEL PH DIFERENCIAL	45
3.4	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS POR EL MÉTODO DEL PH SUSTRATIVO	47
3.5	DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	47
3.6	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS	49
3.7	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD	51
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
4.1	ENSAYOS PRELIMINARES. ESPECTROS DE ABSORCIÓN	53
4.2	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL PH DIFERENCIAL	55
4.3	DETERMINACIÓN DEL COLOR POLIMÉRICO MEDIANTE EL MÉTODO DEL PH SUSTRATIVO	57
4.4	CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES	59
4.5	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	61
4.6	ESTABILIDAD DE PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS	64
4.6.1	Estabilidad durante el almacenamiento para extractos a pH 3	66

4.6.2 Estabilidad durante el almacenamiento para extractos a pH 5	69
4.6.3 Estabilidad de las antocianinas a 4°C	71
4.6.4 Estabilidad de las antocianinas durante el calentamiento	75
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFIA	82

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Estructura de un fenol simple	21
Figura 2: Estructura de un Fenil propanoide	22
Figura 3: Estructura de un tanino	22
Figura 4: Estructura de una quinona	22
Figura 5: Estructura de un flavonoide	23
Figura 6: Estructura de la catequina	24
Figura 7: Estructura de la quercitina	24
Figura 8: Estructura de la diosmetina	24
Figura 9: Estructura de las antocianidinas	25
Figura 10: Estructura general de las antocianinas	26
Figura 11: Estructura de una proantocianidina	27
Figura 12: Biosíntesis de la pelargonidina	29
Figura 13: Biosíntesis de la cianidina y delphinidina	31
Figura 14: Transformación estructural de las antocianinas a diferentes valores de pH	33
Figura 15: Formación de antocianinas incoloras por adición de metabisulfito de sodio	34
Figura 16: Estructura de la clorofila a	40
Figura 17: Estructura de los β -carotenos	40
Figura 18: Estructura de las Betalaínas	41
Figura 19: Estructuras de Trolox y ABTS	49

INDICE DE DIAGRAMAS	Pag
Diagrama 1: Obtención de los extractos	44
Diagrama 2: Determinación de la linealidad, factor de dilución y $\lambda_{\text{max-vis}}$	46
Diagrama 3: Cuantificación de antocianinas monoméricas por el método del pH diferencial	46
Diagrama 4: Cuantificación de antocianinas poliméricas por el método del pH sustractivo	47
Diagrama 5: Determinación de fenoles totales	49
Diagrama 6: Determinación de la capacidad antioxidante	51

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

MPCC: Motilón Pulpa Cáscara Crudo

MPCR: Motilón Pulpa Cáscara Refinado

TEAC: Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox.

TROLOX: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido

ABTS: 2,2'azinobis 3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico

3A, SA, SL: pH 3, T° ambiente, Sin aire, Sin luz

3A, SA, CL: pH 3, T° ambiente, Sin aire, Con luz

3A, CA, SL: pH 3, T° ambiente, Con aire, Sin luz

3A, CA, CL: pH 3, T° ambiente, Con aire, Con luz

5A, SA, SL: pH 5, T° ambiente, Sin aire, Sin luz

5A, SA, CL: pH 5, T° ambiente, Sin aire, Con luz

5A, CA, SL: pH 5, T° ambiente, Con aire, Sin luz

5A, CA, CL: pH 5, T° ambiente, Con aire, Con luz

INDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1: Porcentaje de antocianinas monoméricas en el extracto MPCC	56
Tabla 2: Porcentaje de antocianinas monoméricas en el extracto MPCR	56
Tabla 3: Cantidad de antocianinas presentes en algunas fuentes de alimentos	57
Tabla 4: Porcentaje de color polimérico en el extracto MPCC	58
Tabla 5: Porcentaje de color polimérico en el extracto MPCR	58
Tabla 6: Cantidad de fenoles totales encontrados en el fruto del motilón	60
Tabla 7: TEAC Absorbancias medidas en los extractos del motilón	62
Tabla 8: Concentración de los extractos equivalentes al trolox	63
Tabla 9: Concentración de extractos en pruebas de estabilidad	65
Tabla 10: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t^{1/2}$) a pH 3	68
Tabla 11: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t^{1/2}$) a pH 5	70
Tabla 12: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t^{1/2}$) a 4°C y pH 3 y 5	75
Tabla 13: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t^{1/2}$) durante el calentamiento a pH 3 y 5	78

INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1: Espectros de absorción de los extractos del motilón	53
Gráfica 2: Absorbancias medidas a diferentes concentraciones del extracto MPCC	54
Gráfica 3: Curva de calibración del ácido gálico	60
Gráfica 4: Comparación del contenido de fenoles totales del motilón con otros frutos	61
Gráfica 5: Curva de calibración del trolox	62
Gráfica 6: Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del motilón con otros frutos	64
Gráfica 7: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCR a pH 3	67
Gráfica 8: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCC a pH 3	67
Gráfica 9: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCC a pH 5	69
Gráfica 10: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCR a pH 5	70
Gráfica 11: Comportamiento del extracto MPCC durante el primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3	72
Gráfica 12: Comportamiento del extracto MPCC después del primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3	72
Gráfica 13: Comportamiento del extracto MPCR durante el primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3	73
Gráfica 14: Comportamiento del extracto MPCR después del primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3	73
Gráfica 15: Comportamiento del extracto MPCC almacenado a 4°C y a pH 5	74
Gráfica 16: Comportamiento del extracto MPCR almacenado a 4°C y a pH 5	74
Gráfica 17: Comportamiento del extracto MPCC durante el calentamiento a pH 3	76
Gráfica 18: Comportamiento del extracto MPCR durante el calentamiento a pH 3	77
Gráfica 19: Comportamiento del extracto MPCR durante el calentamiento a pH 5	77
Gráfica 20: Comportamiento del extracto MPCC durante el calentamiento a pH 5	78

INDICE DE ILUSTRACIONES

	Pág.
Ilustración 1: Extracto de motilón a pH 3 y 5	65
Ilustración 2: Contraste de muestras sometidas al almacenamiento entre pH 3 y pH 5	71
Ilustración 3: Muestras sometidas al almacenamiento a 4°C y a pH 5 y pH 3	75
Ilustración 4: Aspecto de los extractos antociánicos después de ser sometidos al calentamiento	79

RESUMEN

Se estudió la estabilidad y la capacidad antioxidante de los compuestos tipo antocianina que están presentes en el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) obtenidos del municipio de Puerres en el departamento de Nariño.

Mediante maceración física se obtuvo extractos de la cáscara y la pulpa del fruto del motilón rico en pigmentos tipo antocianina. Un extracto crudo (MPCC) se obtuvo de la sola maceración física, y un extracto refinado fue obtenido mediante una columna de Amberlita XAD-7 además de la extracción con solventes para eliminar azúcares, ácidos orgánicos y lípidos que están presentes en esta fruta. Se cuantificaron las antocianinas monoméricas en los dos extractos y se encontró que existe aproximadamente 275.5 mg de antocianinas/100g de fruta.

Se cuantificaron los fenoles totales y se encontró que el fruto del motilón contiene una elevada cantidad de estos compuestos; así mismo, mediante el método de la Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) se determinó la actividad antioxidante que posee esta fruta y se encontró que al ser comparada con otras frutas, el motilón tiene la mayor actividad antioxidante con excepción de la acerola.

Posteriormente, se realizaron pruebas de estabilidad en los dos extractos: se evaluó la estabilidad durante el almacenamiento a dos valores de pH (3 y 5), en condiciones de aire, luz y temperatura (4°C y temperatura ambiente de Pasto ($\pm 17^\circ$)), también se evaluó la degradación de los pigmentos a 80°C, a pH 3 y 5, se encontró que el pH es el principal factor que afecta la estabilidad de los pigmentos. En ambos extractos se observó que son altamente estables a pH 3 y en ausencia de aire y luz. La degradación de los extractos a 80°C mostró que las temperaturas altas degradan rápidamente los extractos a pH 5 y no a pH 3.

Estos resultados muestran el gran potencial que tiene el fruto del motilón para ser usado como colorante natural. Se espera que en un futuro se pueda estudiar de manera mas detallada la actividad antioxidante *in vivo* para convertirlo en un agente terapéutico en el tratamiento de enfermedades.

ABSTRACT

The stability and antioxidant capacity were studied of anthocyanins which are present in the fruit of motilon (*Hyeronima macrocarpa*). By physic maceration it was obtained extracts of peel and pulp. The raw extract (MPCC) was only obtained of physic maceration, and a refined extract was obtained employing a column of Amberlita XAD-7 and the extraction with solvents to eliminate sugars, acid organics and lipids which are found in this fruit.

The monomeric anthocyanins and phenols totals were quantified, the motilon has a high amount of these compounds in comparison with others fruits. The antioxidant activity was determined too, and the results showed that its antioxidant activity was high in comparison with others fruits, with exception of acerola.

Later, the stability in the two extracts was evaluated: the stability during the storage of two values of pH (3 and 5), air, light and temperature (4°C and ambient temperature of Pasto city ($\pm 17^\circ$)); the degradation to 80°C, pH 3 and 5. The tests showed that pH is the more important factor in the stability of extracts. In the two extracts it was determined the high stability to pH 3 and without air and without light. The degradation to 80°C showed that the high temperature degrades quickly the extracts to pH 5 and not to pH 3.

These results show the big potential that has the motilon in the use as natural colorant

INTRODUCCION

Los recursos naturales que posee el departamento de Nariño son una fuente de riqueza para sus habitantes. Invertir en la investigación de estos recursos y sus propiedades es contribuir al desarrollo científico e industrial de la región aprovechando ciertos aspectos, como la gran cantidad de flora silvestre propias del área geográfica de Nariño y la iniciativa por parte del gobierno para fortalecer las políticas y programas de fomento agropecuario y forestal, para mejorar la transformación y comercialización de productos agrícolas, (Gobernación de Nariño)¹. Dentro de la amplia flora silvestre existen plantas cuyos metabolitos secundarios resultan de gran interés en diferentes áreas de la industria, por ejemplo,, la mayoría de estos compuestos pueden ser benéficos para la salud humana al ser implementados de manera adecuada en la industria alimenticia como aditivos naturales o consumo directo.

Entre la gran cantidad de metabolitos secundarios, los flavonoides son de gran importancia biológica debido a que el consumo de la mayor parte de estos compuestos previene muchas enfermedades; dentro de los flavonoides se destacan las antocianinas que son compuestos fenólicos responsables de proveer el color a muchas frutas, flores y legumbres (Matsumoto y Nakamura, 2006)².

El color es un factor importante en la aceptabilidad de productos alimenticios, actualmente los colorantes sintéticos son muy usados por su gran estabilidad, porque otorgan a los alimentos colores brillantes y porque poseen apariencia muy atractiva para el consumidor. (Pazmino y Duran, 2001)³. Sin embargo, la seguridad de estos colorantes ha sido altamente cuestionada por sus efectos nocivos en la salud humana (Basu y Chand, 1996)⁴.

Esta situación nos lleva a buscar colorantes alimenticios de fuentes naturales que sean abundantes y de fácil extracción con el objetivo de reemplazar dichos colorantes sintéticos, los pigmentos tipo antocianina son una buena opción para ser usados como colorantes no solo por su inocuidad (Giusti y Wrolstad, 2003)⁷, sino también por que presentan actividad antioxidante y propiedades terapéuticas

¹ <http://www.gobernar.gov.co> Consultada el 5 de Marzo de 2008

² MATSUMOTO Hitoshi, NAKAMURA Yuko. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Experimental eye research*. 83 348-356 (2006)

³ PAZMINO, DURAN, A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75, 211-216 (2001)

⁴ BASU, Purmina. CHAND Surech. Anthocyanin accumulation in *Hyoscyamus mutis* L. Tissue cultures. *Journal of Biotechnology*. 52, 151-159 (1996)

en el tratamiento de enfermedades circulatorias, además son antiinflamatorias, antitumorales y controlan la diabetes (Nakajima y Tanaka, 2004)⁵; sin embargo el uso de las antocianinas en productos alimenticios tiene una gran limitante debido a que pueden ser decoloradas y degradadas durante el almacenamiento por factores como el pH, la temperatura, el oxígeno y la luz, los cuales alteran las propiedades organolépticas, físicas y químicas de la antocianina (Rodríguez y Saona, 1999)⁶.

En el presente trabajo se escogió el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*), debido a que no existen estudios sobre los pigmentos tipo antocianina que están presentes en esta fruta, por lo tanto, fue de gran interés investigar el verdadero potencial de esta clase de pigmentos por todas las ventajas que estos presentan frente a los colorantes sintéticos. Las muestras del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) se recolectaron de la vereda de la Quebrada Blanca del municipio de Puerres en el departamento de Nariño.

El árbol de motilón crece en los paramos a una altitud de 2500 m.s.n.m., y según habitantes de la zona, los árboles de este fruto han sido talados para dar cabida a cultivos mejor remunerados, por eso el motilón se encuentra en reservas naturales o lugares poco explorados, los árboles se distribuyen principalmente en los bosques montañosos de niebla, sus hojas son grandes, enteras y pelosas, los árboles de motilón desarrollan pequeñas flores que dan lugar a los frutos.

Actualmente, el motilón es usado en la producción de mermeladas o también para consumo directo y es por esto que el interés de este trabajo fue evaluar el comportamiento de extractos coloreados del motilón sometidos a diferentes condiciones de almacenamiento; además se cuantificaron los polifenoles y las antocianinas monoméricas y poliméricas, se valoró la capacidad antioxidante para obtener una aproximación de sus posibles beneficios para la salud y se establecieron parámetros de estabilidad que permitieron valorar su comportamiento frente a diferentes factores que dan una idea de su posible aplicación como materia prima para aditivos alimenticios. (Giusti y Wrolstad, 2003)⁷.

⁵ NAKAJIMA, Jun-ichiro., TANAKA, Ippei., LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 241–247 (2004)

⁶ Rodríguez-Saona, . Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, 64(3), 451–456 (1999).

⁷ GIUSTI, Monica., WROLSTAD Ronald., Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical engineering Journal* 14 217-225. (2003)

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la estabilidad y la capacidad antioxidante de antocianinas extraídas del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*)

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener por medio de la extracción en fase sólida y maceración con agua destilada, extractos de antocianinas poliméricas y monoméricas de la cáscara y de la pulpa del fruto del motilón.
- Cuantificar las antocianinas monoméricas, poliméricas y fenoles totales, presentes en los extractos obtenidos del fruto del motilón.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos por medio del método TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox).
- Realizar pruebas de estabilidad de las antocianinas frente a factores como el pH, temperatura, luz, aire y tiempo de almacenamiento.

2. ESTADO DEL ARTE

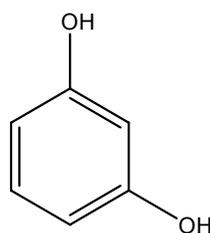
2.1 POLIFENOLES

Los polifenoles son metabolitos secundarios encontrados en las plantas que hacen parte de nuestra dieta de manera abundante; muchas evidencias indican que los polifenoles juegan un papel muy importante en la prevención de enfermedades degenerativas de tipo cardiovascular y el cáncer. (Shimoi y Masuda, 1996)⁸

En la naturaleza, todas las plantas contienen una gran variedad de compuestos entre los cuales sobresalen anillos aromáticos que generalmente contienen uno o más sustituyentes hidroxilo. Entre los productos naturales aromáticos hallados en las plantas se encuentran los polifenoles, este tipo de compuestos se puede clasificar como fenoles simples, fenil propanoides, taninos, quinonas y flavonoides.

➤ Fenoles simples: son obtenidos por hidrólisis ácida de los tejidos de las plantas, muchos de ellos son compuestos monoméricos de polifenoles poliméricos como hidroquinona, resorcinol (Fig 1), catecol, ácido salicílico, timol.

Figura 1: Estructura de un fenol simple

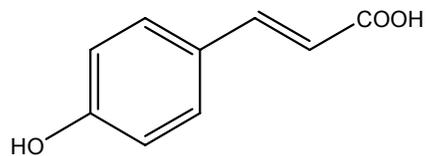


Resorcinol

➤ Fenil propanoides: 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 hidroxicinámico, como ácido cumárico y caféico.

⁸ SHIMOI, Kayoco; MASUDA Shuichi;. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis*. 350, 153-161 (1996)

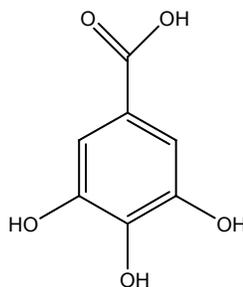
Figura 2: Estructura de un Fenil propanoide



Acido Cinámico

- Taninos: son los principales constituyentes de los tejidos leñosos de los árboles. Los taninos reaccionan con proteínas y forman copolímeros insolubles en agua, esta reacción es muy usada industrialmente para convertir la piel animal en cuero.

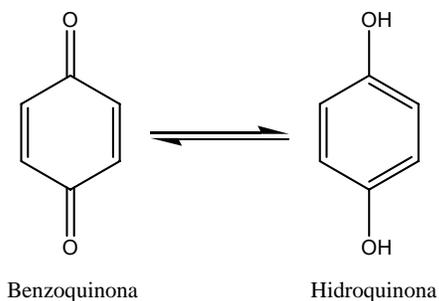
Figura 3: Estructura de un Tanino



Acido Gálico

- Quinonas: son compuestos coloreados que absorben 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 antroquinonas.

Figura 4: Estructura de una Quinona



Benzoquinona

Hidroquinona

- Flavonoides: están conformados por dos anillos bencénicos separados por una unidad de propano, estos compuestos son solubles en agua y cuando son conjugados a menudo son coloreados (Ver figura 5).

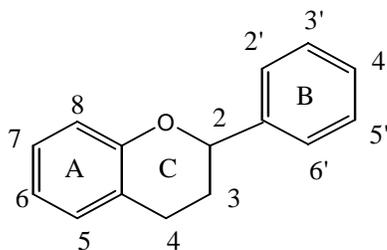
2.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos polifenólicos, los cuales son constituyentes de la parte no energética de la dieta humana. Los flavonoides son ampliamente distribuidos en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza; actualmente se han identificado un gran número de flavonoides y aunque en un principio se consideró que los flavonoides no tenían acción benéfica para la salud humana estudios epidemiológicos indican que el consumo de vegetales y frutas está asociado con el bajo riesgo de padecer enfermedades degenerativas como el cáncer, esto se debe a que juegan un papel importante en la protección contra el daño oxidativo (Cao y Sofic, 1997)⁹.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, propiedad que les confiere la capacidad de proteger al organismo del daño producido por agentes oxidantes como los rayos ultravioletas, polución ambiental y sustancias químicas presentes en los alimentos y en el ambiente, etc. (Martínez y Gonzales, 2002)¹⁰

Así, 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 su estructura química, la cual está compuesta por dos anillos aromáticos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (C6-C3-C6) como lo indica la figura 5:

Figura 5: Estructura de un Flavonoide



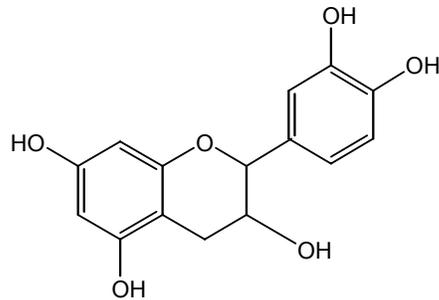
⁹ CAO, Guohua; SOFIC Emin. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure –Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 22 Nº5 749-760 (1997)

¹⁰ MARTÍNEZ, GONZÁLEZ Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*. XVII (6) 271-278 (2002)

Adicionalmente los flavonoides se pueden clasificar en función de sus características estructurales:

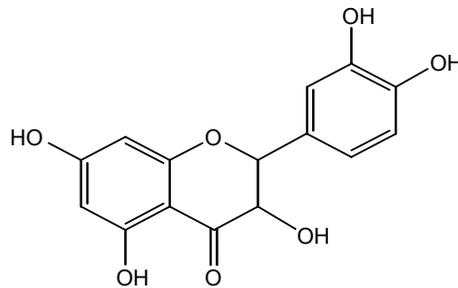
- Flavanos, como la catequina, tiene un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

Figura 6: Estructura de la Catequina



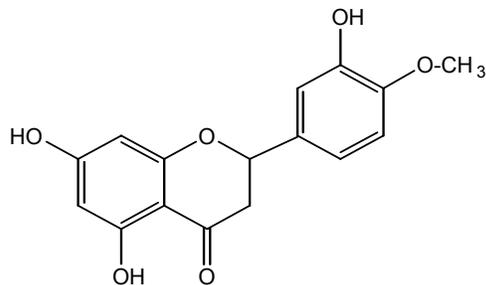
- Flavonoles, representados por la quercitina, posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

Figura 7: Estructura de la quercitina



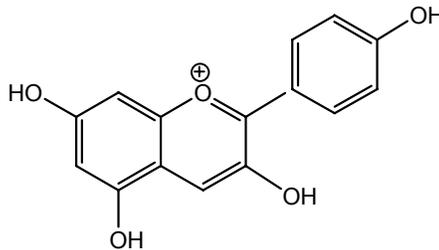
- Flavonas, como la diosmetina, posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

Figura 8: Estructura de la diosmetina



- Antocianidinas, tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Figura 9: Estructura de las antocianidinas



Los flavonoides se encuentran principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, desempeñan un papel importante en la biología vegetal debido a que son capaces de fijar metales como el hierro y el cobre, son antifúngicos y bactericidas, además responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento.

De acuerdo con la bibliografía, entre la gran cantidad de flavonoides que se han identificado se pueden destacar (Martínez y Gonzales, 2002):¹⁰

- Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naranjina dá el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.
- Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeina.
- Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.
- Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.
- Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.
- Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.
- Kaemferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja.

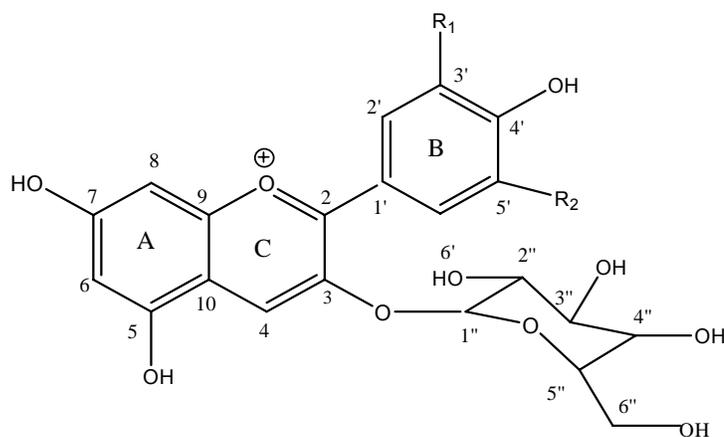
El interés de este trabajo fue estudiar pigmentos naturales tipo antocianina que están presentes en el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*).

2.3 ANTOCIANINAS

Dentro de los flavonoides se encuentran las antocianinas que son pigmentos responsables del color rojo, rosa, púrpura y azul en hojas tallos frutos, raíces semillas y flores en las plantas. Los diferentes colores que presentan este tipo de compuestos se deben a la conjugación de los enlaces y cuya estabilidad depende de las hidroxilaciones, metilaciones y glicosidaciones de las mismas.

Químicamente las antocianinas son derivados glicosidados de 3,5,7,3' del catión hidroxiflavilio (Fig. 10), la mayoría de azúcares encontrados en las antocianinas son monosacáridos y entre ellos están la glucosa, galactosa, arabinosa y ramnosa aunque también se encuentran disacáridos y trisacáridos. La molécula no glicosidada (aglicona) se llama antocianidina.

Figura 10: Estructura general de las antocianinas: Dp ($R_1=OH$, $R_2=OH$); Cy 3-glu ($R_1=OH$, $R_2=H$); Pg 3-glu ($R_1=H$, $R_2=H$); Pn 3-glu ($R_1=OCH_3$, $R_2=OH$); Mv 3-Glu ($R_1=OCH_3$, $R_2=OCH_3$)



En algunos casos las antocianinas son aciladas por ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, p-hidroxibenzoico, malónico y acético; cuando las antocianinas presentan este tipo de sustituyentes, generalmente lo hacen en la posición C-3, (Lee y Hong, 1992)¹¹

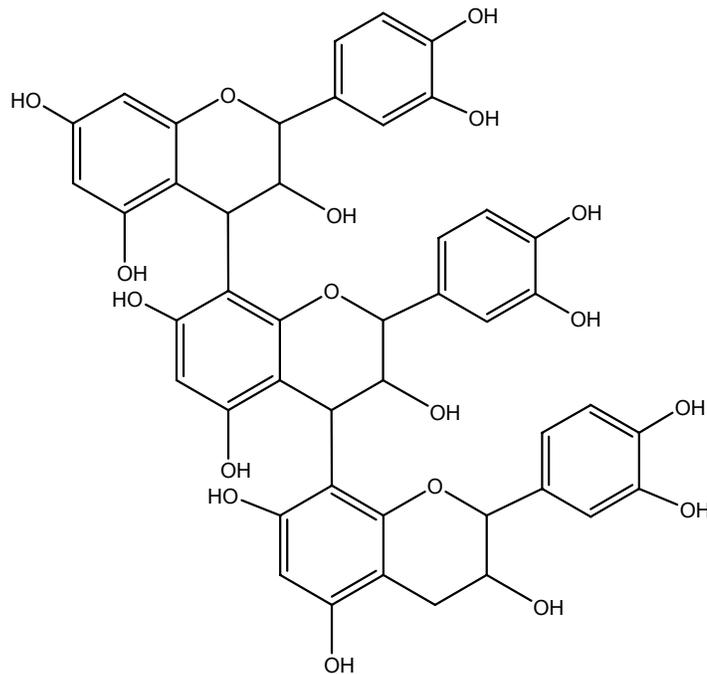
¹¹ LEE, Hyong S. HONG, Victor. Chromatographic analysis of anthocyanins, Journal of Chromatography, 624, 221–234. (1992)

La naturaleza polar de las antocianinas hace que estas sean muy solubles en agua y en solventes orgánicos polares lo que facilita su incorporación en sistemas alimenticios acuosos.

Las antocianinas cumplen diversas funciones en las plantas, entre ellas se encuentran la atracción de insectos y aves polinizadores y la protección contra el daño de la radicación UV.

Adicional a esto, las antocianinas se pueden polimerizar (Fig 11) formando proantocianidinas, las antocianinas pueden tener diferente longitud del polímero (grado de polimerización), composición de subunidades y tipo de unión entre las subunidades.

Figura 11: Estructura de una proantocianidina: epicatequina (4 β →8)-epicatequina (4 β →8)-epicatequina



2.3.1 Ruta metabólica de las antocianinas

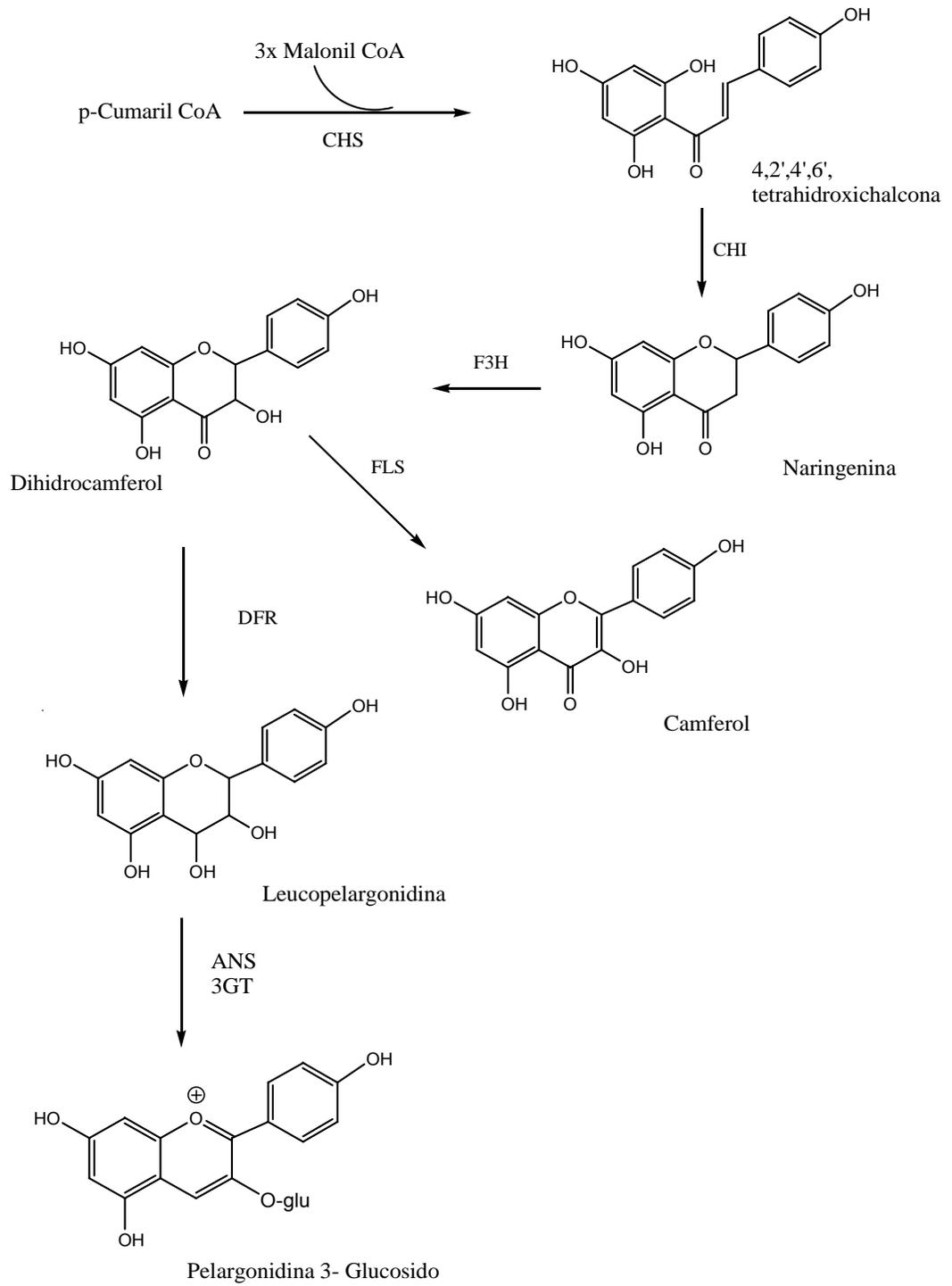
El metabolismo de las antocianinas ocurre en las vacuolas de las células de las plantas y son sintetizadas de ácidos amino aromáticos, fenilalanina en la vía de los fenilpropanoides. Esta misma ruta es la responsable de las síntesis de taninos,

flavononas como la naringina; flavonoles, flavonoides, isoflavonoides como la genistina y la daizeina, lignina, lignanos y cumarina. (Kaufman y Cseke, 1998)¹².

La enzima primaria que se encarga de la biosíntesis de las antocianinas es la chalcona sintetasa (CHS), (Fig. 12). En la mayoría de las plantas se encuentran una amplia familia de genes de la CHS los cuales son expresados en tejidos muy específicos. CHS (A) por ejemplo, es solamente expresado en pétalos y estambres de flores que producen antocianinas.

¹² KAUFMAN, meter. CSEKE, Leand. Natural Products from Plants. *Crs Press*. United states of America, pag 65-67, 1998

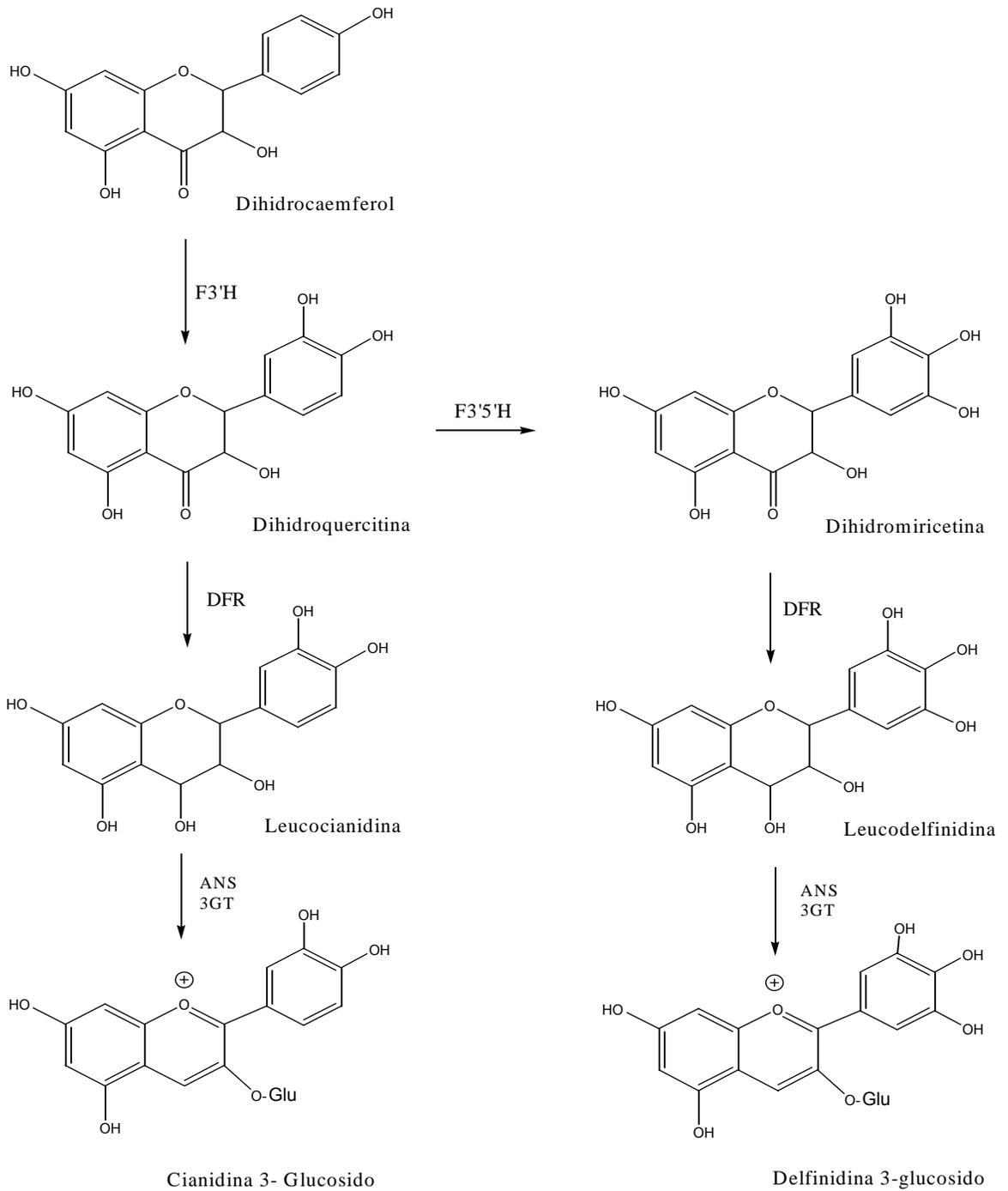
Figura 12: Biosíntesis de la pelargonidina



En la petunia, el loci* genético que controla la síntesis de la mayoría de éstas enzimas ha sido localizado con excepción de la 5GT (5-glucosil transferasa). Las diferentes antocianinas coloreadas, provienen de precursores que incluyen dihidrocaempferol, precursor de la pelargonidina, antocianina rojo-naranja (Fig. 12), la dihidroquercitina precursora de la cianidina, antocianina rojo-púrpura, (Fig 13) y la dihidromiricetina (un precursor de la delphinidina, antocianina azul-morada (Fig. 13). Todas estas antocianidinas se convierten en sus respectivos glucósidos tales como la pelargonidina 3-glucósido, cianidina 3-glucósido y delphinidina 3-glucósido, la cual les permite mejorar la solubilidad en la solución acuosa de la vacuola.

* Loci es la posición en un cromosoma en la cual se encuentra un gen específico. En muchas ocasiones se intercambia el término locus por el de gen.

Figura 13: Biosíntesis de la cianidina y delphinidina



2.3.2 Composición de Pigmentos Antociánicos

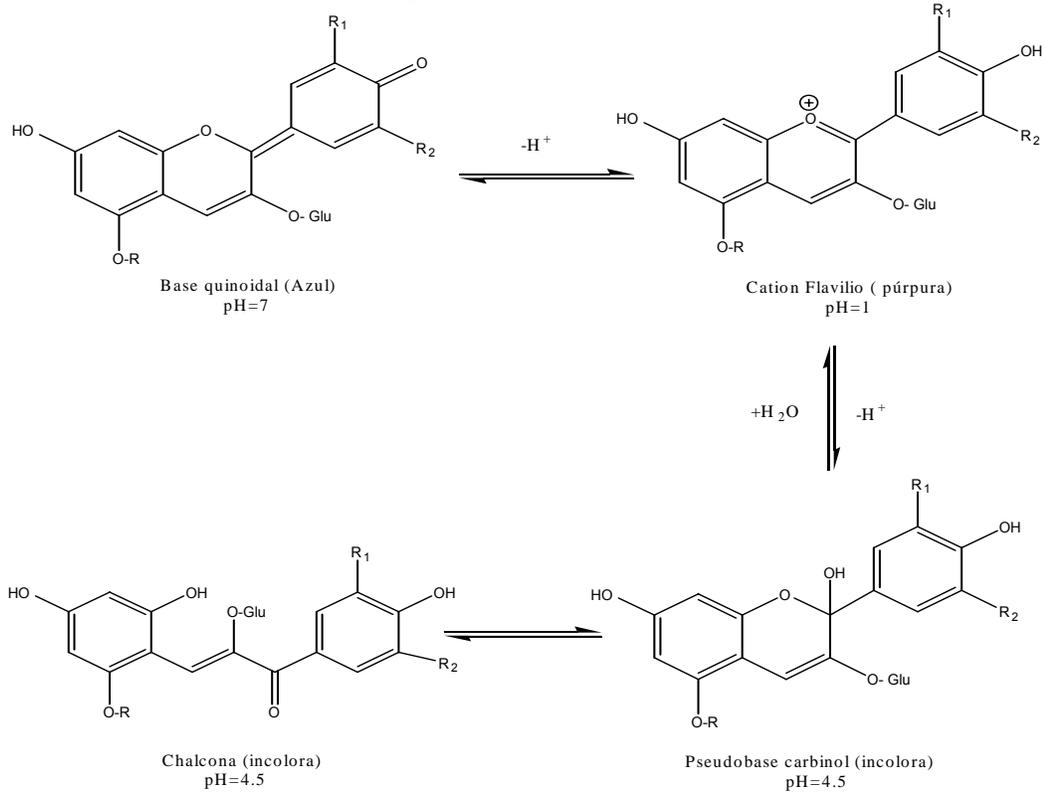
La determinación de la cantidad y tipo de metabolitos secundarios presentes en materiales vegetales es un factor de gran utilidad para valorar la viabilidad de usar estos compuestos en diferentes áreas de la industria. El contenido de antocianinas monoméricas y poliméricas son parámetros útiles en la evaluación de la calidad del color de los alimentos.

Debido a que las antocianinas poseen una banda de absorción típica en la región de los 490 y 550 nm del espectro visible es posible cuantificar el contenido total de antocianinas en matrices que contienen otro tipo de materiales fenólicos, estos compuestos fenólicos tienen su máximo de absorción en el rango UV y no intervienen directamente en la cuantificación de las antocianinas (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³. Los métodos diferenciales y sustractivos son muy útiles en la cuantificación de antocianinas monoméricas y poliméricas los cuales se describen a continuación:

➤ Mediante el método del pH diferencial las antocianinas cambian reversiblemente el color con el pH. Cada una de las muestras se diluyen en buffers a pH 1 y 4.5 y las absorbancias se miden a la longitud de onda de máxima absorción y a 700 nm para eliminar el error producido por la turbidez. La diferencia de absorbancias entre los dos buffers se debe a las antocianinas monoméricas. La bibliografía indica que las antocianinas polimerizadas no muestran cambios reversibles con el pH, por tanto no absorben completamente a la longitud de onda de máxima absorción. (Wrolstad y Durst, 2003)⁷ La figura 14 muestra la transformación que sufren las antocianinas en su estructura debido al cambio de pH.

¹³ GIUSTI, Mónica., WROLSTAD Ronald., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry F1.2.1–F1.2.13* (2001)

Figura 12: Biosíntesis de la pelargonidina



La absorbancia total y la concentración de los extractos se calculan mediante las siguientes relaciones:

Cálculo de la absorbancia total de los extractos:

$$A = (A_{\lambda_{\max\text{-vis}} - A_{700}})_{\text{pH } 1.0} - (A_{\lambda_{\max\text{-vis}} - A_{700}})_{\text{pH } 4.5}$$

$$\text{Concentración de antocianinas monoméricas en los extractos (mg/L)} = \frac{(A \times \text{PM} \times \text{DF} \times 1000)}{(\epsilon \times 1)}$$

PM=Peso molecular,
 FD=Factor de dilución,
 ϵ =Absortividad molar.

El contenido de pigmentos se calculó como cianidin-3-glucosa, PM=449.2, ϵ =26900. (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³

➤ El método sustractivo se basa en el uso de agentes blanqueadores como el bisulfito de sodio que decoloran las antocianinas. Los pigmentos antociánicos

Las propiedades farmacológicas y los colores atractivos son características que hacen de las antocianinas buenas candidatas para ser implementadas en la industria como colorantes para alimentos. Actualmente, la demanda de pigmentos naturales tipo antocianina ha crecido considerablemente, por ejemplo, actualmente se usan extractos obtenidos de bayas de sauco, piel de uvas y repollo rojo, estos extractos son muy usados como agentes colorantes en diferentes tipos de alimentos. (Schwarz y Hillebrand, 2003)¹⁵.

Se han sugerido muchas fuentes de antocianinas: baguacu (Kuskoski y Vega, 2003)¹⁶, Vacinio (Cabrita y Froystein, 2000)¹⁷, patata (Eichhorn y Winterhalter, 2005)¹⁸, zanahoria negra (Kirca y Ozkan, 2006)¹⁹, pasas negras (Rubinskiene y Viskelis, 2005)²⁰, uvas (Bordignon y Gauche, 2006)²¹, etc.

2.3.4 Antocianinas como antioxidantes

Como se mencionó anteriormente la estructura química de las antocianinas (ver fig. 10), contiene un número variable de grupos hidroxilo a los cuales se les confiere la capacidad antioxidante. Las propiedades antioxidantes se dirigen fundamentalmente a retirar el oxígeno reactivo que se encuentra en forma de superóxidos, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroxiperóxidos los cuales están implicados en la peroxidación lipídica. (Martínez y Gonzales, 2002)¹⁰

La capacidad antioxidante de las antocianinas es de gran importancia farmacológica e industrial, debido a que cuando son incluidas en el metabolismo

¹⁵ SCHWARZ Michael, HILLEBRAND Silke. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal* 3705, 1–11 (2003)

¹⁶ KUSKOSKY Marta, VEGA, Jose. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacu (*Eugenia umbellifera* Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 5450-5454, (2003)

¹⁷ CABRITA, Luis; FROYSTEIN, Nils; Anthocyanin trisaccharides in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Food Chemistry*. 69, 33-36 (2000)

¹⁸ EICHHORN, S.; WINTERHALTER P.; Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International*. 38, 943–948 (2005)

¹⁹ KIRCA Aysegu, OZKAN Mehmet. CEMEROGLU Bekir., Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars, *Food Chemistry*, 598–605 (2006)

²⁰ RUBINSKIENE M., VISKELIS P. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins por *Food Research International* 38 867–871 (2005)

²¹ BORDIGNON, L.; GAUCHE, C.; Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 02.022. (2006)

humano pueden unirse a polímeros biológicos tales como enzimas y transportadores de hormonas, pueden quelar iones metálicos, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales, de ahí que el interés de este trabajo fue investigar la capacidad antioxidante de las antocianinas extraídas del fruto del motilón para incorporarlas en la industria de alimentos como colorante natural.

2.3.5 Cuantificación de fenoles totales

Debido a que los polifenoles tienen una alta capacidad de capturar radicales libres, resulta muy útil la evaluación del contenido total de fenoles porque se puede determinar la relación entre esta y la actividad antioxidante evaluada.

Actualmente, los fenoles totales son cuantificados por el método de Folin Ciocalteu mediante el cual los compuestos fenólicos se oxidan por el reactivo de Folin–Ciocalteu, que está formado por los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (Slinkard y Singleton, 1977)²² luego de la reacción se forma una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno; esta coloración azul produce una absorbancia máxima a 750nm.

2.3.6 Estabilidad de las antocianinas

Además de sus propiedades terapéuticas y los atributos de color, las antocianinas presentan algunas limitaciones que restringen su uso como colorantes alimenticios (Giusti y Wroldstad, 2003)⁷; es por esto que medir la estabilidad de las antocianinas es muy importante debido a que la evaluación de diferentes factores fisicoquímicos permiten establecer parámetros de estabilidad que incrementen el uso de este tipo de pigmentos en la industria.

La estabilidad de los pigmentos del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) no ha sido objeto de estudio, sin embargo existen investigaciones en las que se estudia la estabilidad de las antocianinas en muchas frutas: algunos de los estudios son los siguientes:

➤ En el trabajo realizado por Kirka y Ozkan, (2005)²³, se publican los estudios acerca de la estabilidad de las antocianinas en las zanahorias negras, se concluyó que el almacenamiento a una temperatura de 4 °C las antocianinas presentan mayor estabilidad que a temperaturas superiores.

²² SLINKARD, K. SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55. (1977)

²³ KIRCA Aysegu, MEHMET Ozkan. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*. (2006)

- De igual forma el estudio realizado por M.T. Bordignon y Gauche (2006)²¹ se analizó la estabilidad de las antocianinas de las uvas *Vitis labrusca L.* a factores como temperatura, pH, luz y oxígeno, concluyendo que estas condiciones afectan fuertemente el tiempo de vida de los pigmentos antociánicos. Se encontró además que los pigmentos extraídos de la uva son estables en el yogurt.
- Estudios similares desarrollados por Rubinskiene y Viskelis (2005)²⁰ analizaron la estabilidad de los pigmentos antociánicos de las pasas negras a diferentes factores, como temperatura, almacenamiento y adición de edulcorantes, se encontró que las antocianinas son estables a 8°C y que la fructosa afecta más su estabilidad que otros azúcares como glucosa y edulcorantes como el aspartame.
- Otro estudio que cabe destacar es el realizado por Janna y Khairul (2006)²⁴ en este artículo se estudian los efectos del pH, almacenamiento, tratamiento con luz y temperatura, encontrándose no solo que las antocianinas son más estables a pH 0.5 y 3, sino que la temperatura de 25°C redujo la degradación de las antocianinas en un 7% a 20% frente a una temperatura de 31°C, los extractos almacenados en la oscuridad se degradaban menos con respecto a los almacenados en presencia de luz.

Así, las antocianinas son afectadas por diferentes factores que alteran su estabilidad, razón por la cual el uso de estos pigmentos en productos alimenticios es limitado, una gran variedad de factores fisicoquímicos, pueden decolorar y degradar el pigmento durante el almacenamiento. En este trabajo se estudió la estabilidad de las antocianinas presentes en la pulpa y en la cáscara del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) evaluando la estabilidad durante el almacenamiento de los pigmentos y teniendo en cuenta cuatro factores a saber el pH, la temperatura, el oxígeno y la luz.

2.3.6.1 Efecto del pH

El pH es el principal factor que afecta la estabilidad de las antocianinas. La figura 14 muestra las transformaciones estructurales que sufren estos compuestos provocados por el cambio de pH el cual es manifestado por las diferencias en el color. A pH's bajos predomina el catión flavilio y la base quinoidal, que son estructuras resonantes y que presentan coloración debido a la conjugación de sus enlaces; cuando se incrementa el pH la conjugación de los enlaces se pierde y se forman especies incoloras como la pseudobase carbinol y la chalcona

²⁴ JANNA, A. KHAIRUL A. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra L.* *Food Chemistry*. FOCH 5523. (2006)

(Torskangerpoll y Andersen, 2005)²⁵. En esta investigación se estudió el comportamiento de las antocianinas a pH 3 y pH 5 en los cuales las antocianinas presentan coloración. El pH de la fruta es 6 y fue necesario evaluar la estabilidad a pH 3 y pH 5 para observar el comportamiento de los pigmentos a valores de pH más bajos que el pH de la fruta.

2.3.6.2 Efecto de la temperatura.

La industria de alimentos utiliza diferentes niveles de temperatura tanto en el almacenamiento de productos en condiciones frías y en procesos de pasteurización a temperaturas elevadas; debido a esto es importante evaluar la temperatura como factor de degradación de las antocianinas.

Para observar el comportamiento de las antocianinas después de ser sometidas a diferentes niveles de temperatura, en este estudio se evaluó la estabilidad de las antocianinas a 4°C, a temperatura ambiente ($\pm 17^\circ\text{C}$) y a 80°C.

Los mecanismos de degradación de las antocianinas no han sido elucidados completamente, pero muchos estudios indican que las altas temperaturas degradan las antocianinas vía formación de chalcona, con producción de productos marrones (Turker y Erdogan, 2006)¹⁴

2.3.6.3 Efecto de la luz.

La luz también es un factor muy importante en la evaluación de la estabilidad de las antocianinas debido a que estos compuestos son sensibles a la luz. (Francis, 1989)²⁶. En este trabajo se estudió el efecto de la luz sobre extractos antocianínicos almacenados a diferentes tiempos de almacenamiento.

2.3.6.4 Efecto del aire

El efecto del oxígeno en la degradación de las antocianinas fue conocido alrededor de 1936 cuando Tressler y Pederson²⁷ observaron que el cambio del color púrpura a café en botellas de jugos de uvas pudo haber sido prevenido simplemente llenando completamente las botellas. Nabeski y colaboradores, 1949²⁸, estudiaron

²⁵ TORSKANGERPOLL Kjell, ANDERSEN Oyvind. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry* 89 427–440 (2005)

²⁶ FRANCIS, F. food colorants: anthocyanins. Department of food Science and nutrition. University of Massachusetts. Volume 28, Issue 4 (1989)

²⁷ TRESSLER, D. K. y PEDERSON, C.S. preservation of grape juice. II factors controlling the rate of deterioration of bottled concord juice. *Food res.*, 1, 87 (1936)

²⁸ NEBESKY, E. A., ESSELEN. Stability of color in fruit juices. *Food res.*, 14, 261 (1949)

el efecto del oxígeno en extractos de uvas, fresas y moras; ellos comentaron que el oxígeno y la temperatura fueron los agentes más específicos en la aceleración de la degradación. Daravingas y Cain²⁹, 1965, demostraron el efecto degradativo del oxígeno en jugos de bayas. En este estudio se determinó el efecto que el aire tiene en extractos de motilón (*Hyeronima macrocarpa*)

2.4 OTROS TIPOS DE PIGMENTOS NATURALES

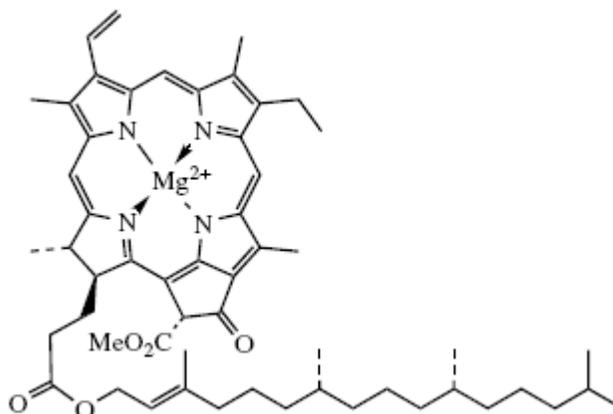
Luego de las antocianinas existen otro tipo de pigmentos naturales los cuales se mencionan a continuación (Macrae y Robinson):³⁰

2.4.1 Clorofilas

Las clorofilas son los pigmentos más apreciables de todas las plantas debido a su papel central en la fotosíntesis. Son insolubles en agua y están asociadas con la parte lipídica de las células en organelos especializados (los cloroplastos). El color verde brillante de la clorofila está determinada por la presencia del átomo de magnesio en el centro del anillo porfirínico. Cuando los vegetales de hojas verdes se cocinan bajo condiciones normales (poco ácidas), este magnesio se pierde fácilmente en forma de feofitina verde grisácea.

El color rojo brillante característico de la hemoglobina en los animales de sangre fría y en carnes frescas, contienen estructuras similares al anillo porfirínico donde el átomo central es hierro.

Figura 16: Estructura de la clorofila a



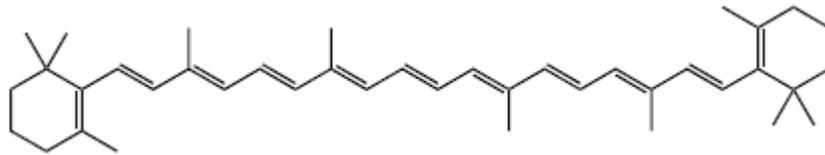
²⁹ DARAVINGAS, G. y CAIN, R. F., changes in the antocyanin pigments of raspberries during processing and storage, *J. food Sci.*, 30, 400 (1965)

³⁰ MACRAE R., ROBINSON R., SADLER, M. Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition. Catering – Down's Syndrome. Academic press. Volumen dos.

2.4.2 Carotenoides

Los carotenos son pigmentos lipídicos presentes en plantas y en algas. Son los responsables del color naranja-amarillo de algunas frutas y vegetales como el pimiento rojo, tomate, zanahoria y banano. La estructura de los carotenoides es más diversa que las antocianinas. La unidad básica es una cadena de 40 carbonos. Las xantofilas son carotenoides que contienen aldehídos o hidroxilos al final de las cadenas. Pocos carotenoides se encuentran en los animales como el salmón y el camarón los cuales los adquieren en su dieta. La mantequilla, el queso y la yema de huevo contienen carotenoides. En los animales los carotenoides actúan como precursores de la vitamina A.

Figura 17: Estructura de los β -carotenos



Aunque en la naturaleza se conocen cerca de 500 carotenoides, muy pocos son solubles en agua. Su insolubilidad en agua significa que tienen la tendencia a ser más estables que las antocianinas en el procesamiento de alimentos.

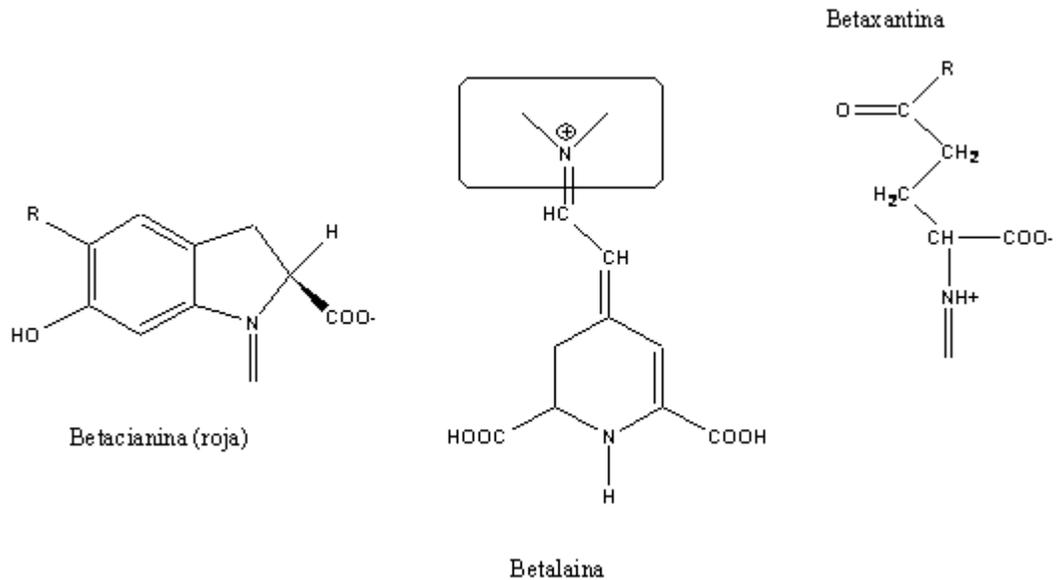
2.4.3 Betalaínas

Las Betalaínas son solubles en agua y generalmente son estables a pH moderadamente ácidos, sin embargo con calor, luz y oxígeno se degradan inmediatamente. Las Betalaínas se encuentran principalmente en la acelga y en la remolacha.

Las antocianinas y las Betalaínas difieren en su estabilidad con respecto a valores de pH: mientras que las primeras son intensamente coloreadas a pH bajos, las segundas se caracterizan por tener una estabilidad óptima a pH 5-7. (Stintzing y Trichterborn, 2006)³¹

³¹ STINTZING, Florian., TRICHTERBORN, Jan., Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry* 94 296–309 (2006)

Figura 18: Estructura de las Betalaínas



2.4.4 Pigmentos originados por la reacción de Maillard

El desarrollo de estos pigmentos está usualmente asociado con el tipo de caramelización, el cual es otorgado por la reducción de los azúcares en presencia de aminoácidos debido a la temperatura. Con la degradación de azúcares se forman aldehídos los cuales se polimerizan a cromóforos visibles por la formación de complejos de los grupos amino. Algunos ejemplos incluyen la cebolla frita, la carne asada o la manufactura de caramelos. Inevitablemente, el oscurecimiento de Maillard es asociado con el desarrollo del sabor.

Se ha demostrado que el jugo de manzana concentrado, almacenado a 20°C durante semanas muestra desarrollo de color asociados con las reacciones de Maillard entre la fructosa y los aminoácidos.

3. METODOLOGIA

3.1 SELECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El muestreo del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) se realizó en la vereda Quebrada Blanca del municipio de Puerres en el departamento de Nariño, la recolección de muestras se realizó en el primer trimestre del año (2007) época en la que encuentra la mayor productividad del fruto, por las condiciones lluviosas y la alta humedad. En la zona de recolección de las muestras se encontró alrededor de seis árboles, en los que se observó gran cantidad de la fruta, se recogió aproximadamente 500 g de cada árbol y se procedió a mezclar todo el material vegetal, de esta manera la selección de la fruta para los análisis respectivos se realizó por cuarteos utilizando 682 g de motilón, así se puede afirmar que mediante el muestreo por cuarteos se obtiene una cantidad de muestra representativa de toda el área seleccionada para la toma de muestras.

Clasificación taxonómica:

La clasificación taxonómica del árbol del motilón se realizó en el Herbario de la Universidad de Nariño (Comp. Pers. Gonzáles Insuasty Marta Sofía).

Nombre Científico: *Hyeronima Macrocarpa*

Nombre común: Motilón

Número de ubicación: 011127

3.2 EXTRACCIÓN DE LOS PIGMENTOS

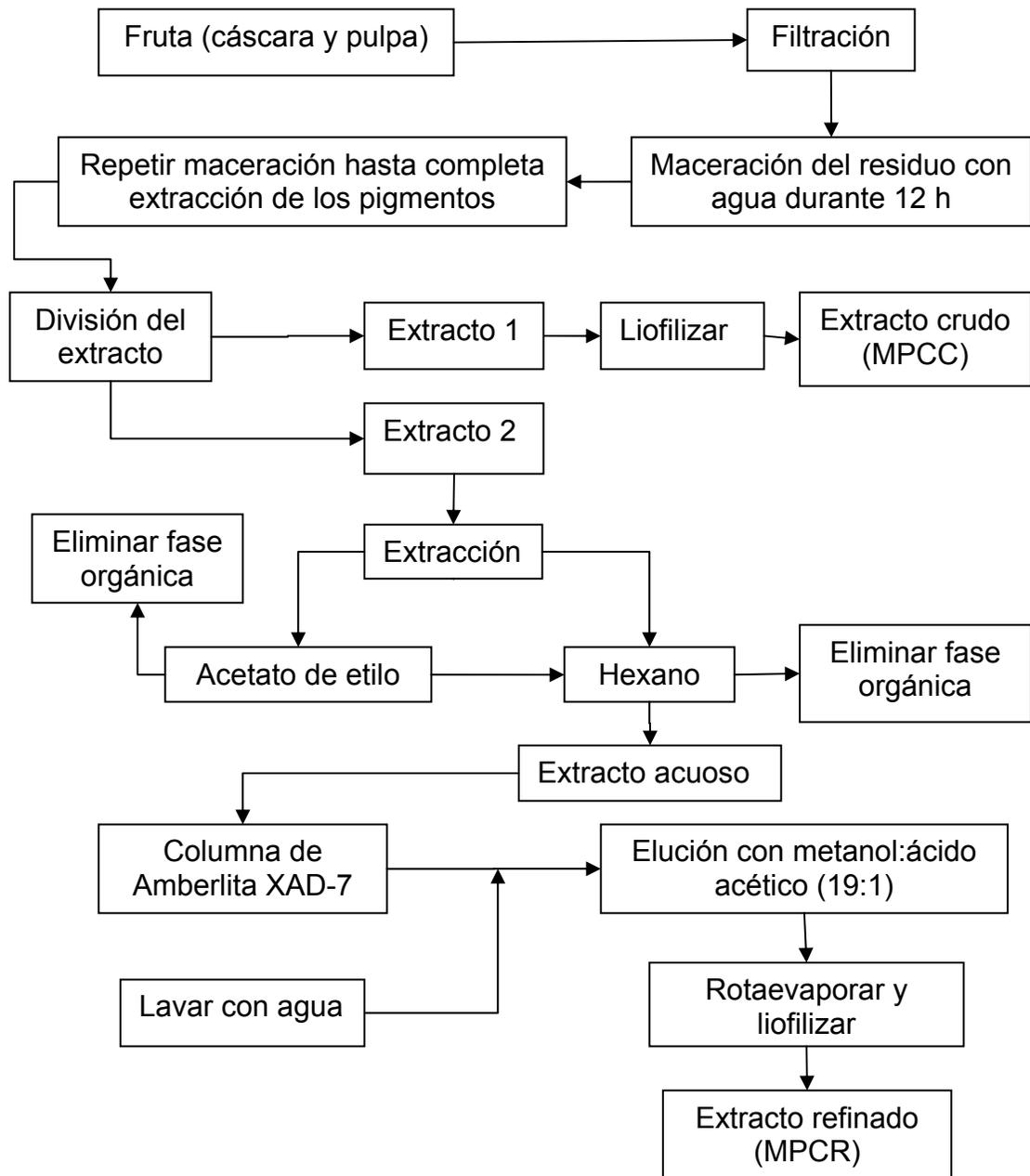
Luego de seleccionar la muestra a analizar (682 g) se extrajo la semilla de la fruta y se procedió a triturar la pulpa y la cáscara hasta obtener una masa uniforme, ésta mezcla se filtró hasta obtener aproximadamente 330 ml de extracto de motilón altamente coloreado. Luego de la filtración, el sólido se sometió a maceración con 100 ml de agua destilada durante 12 horas; este procedimiento se repitió dos veces. Todo el extracto de pigmentos obtenido se dividió en dos partes para todos los análisis correspondientes; la primera porción del extracto se liofilizó y fue llamado extracto crudo o MPCC (Motilón Pulpa Cáscara Crudo), del liofilizado crudo se obtuvo 16.57 g, la segunda porción fué sometida a un proceso de refinación, en la cual se realizó extracciones con hexano y acetato de etilo con el fin de eliminar compuestos de carácter lipofílico; se realizaron cinco extracciones con cada uno de los solventes utilizando 20 ml de hexano y 20 ml de acetato de etilo, luego de cada extracción y por medio de un rotavaporador se concentró la muestra a una temperatura de 35°C.

Después de este proceso el extracto obtenido se pasó a través de una columna de Amberlita XAD-7, la resina se lavó con suficiente agua para eliminar compuestos como azúcares, ácidos orgánicos, proteínas y sales; los compuestos fenólicos (incluyendo las antocianinas) fueron retenidas en la columna y su elusión se realizó con una solución de metanol: ácido acético (19:1, v/v) (Schwarz y Hillebrand, 2003)¹⁵.

Después de eluir los pigmentos, la resina se lavó con suficiente agua para eliminar todo el metanol presente en la columna. (Diagrama 1)

Luego de pasar la totalidad del extracto por la columna, los pigmentos se concentraron mediante rotavaporación; el extracto obtenido fue liofilizado y las muestras para los análisis se llamaron extracto refinado o MPCR (Motilón Pulpa Cáscara Refinado), se obtuvo una cantidad de liofilizado refinado de 5.28 g.

Diagrama 1: Obtención de los extractos



Características principales de la resina Amberlita XAD-7

La resina XAD-7 está formada por polímeros acrílicos, éstas resinas acrílicas llamadas también acrílicos, se obtienen por la polimerización de los acrilatos que son los esteres del ácido acrílico ($H_2C=CHCOOH$) u otros monómeros que

contengan el grupo acrílico ($\text{H}_2\text{C}=\text{CHCO}-$). Entre las propiedades físicas y químicas de la resina XAD-7 se encuentran: (Scordino y Di Mauro, 2004)³².

Estructura: acrílica

Área superficial (m^2/g): 450

Radio de poro (Å): 45

Porosidad: (mL/g): 1.14

Tamaño de partícula (mm): 0.25-0.84

Densidad (g/mL): 1.24

3.3 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS POR EL MÉTODO DEL PH DIFERENCIAL.

Mediante el método del pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³, se cuantificaron las antocianinas monoméricas en el extracto crudo (MPCC) y el extracto refinado (MPCR). Se determinó el límite máximo de concentración en el cual no se viole la ley de Beer determinando la correlación más cercana a 1 de la gráfica absorbancia vs concentración obtenida por dilución de los pigmentos en buffer cloruro de potasio 0.025 M pH 1.0, estas mediciones se utilizaron para determinar el factor de dilución apropiado tanto para MPCC (121) y para MPCR (10), también se determinó la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los extractos (Diagrama 2). El factor de dilución apropiado para cada muestra se determinó de la siguiente forma:

MPCC

0.206g → 7 ml

1 ml → 11 ml

1 ml → 11 ml

MPCR

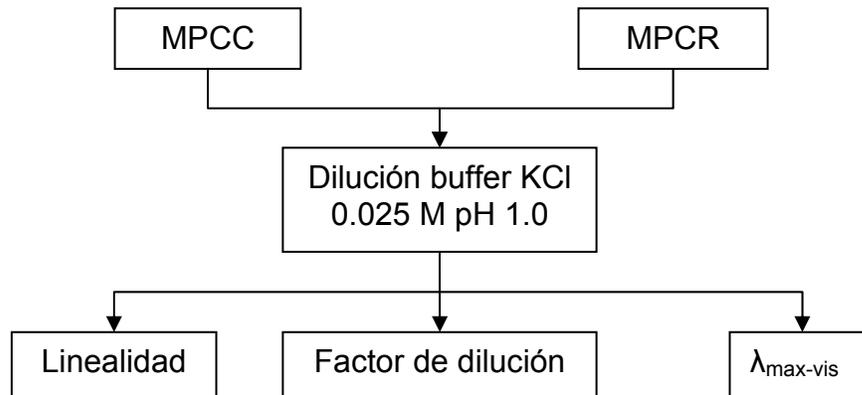
0.014g → 10 ml

1ml → 10 ml

Todas las mediciones espectrofotométricas, fueron realizadas en un espectrofotómetro Lambda Perkin Elmer Modelo C632-0001.

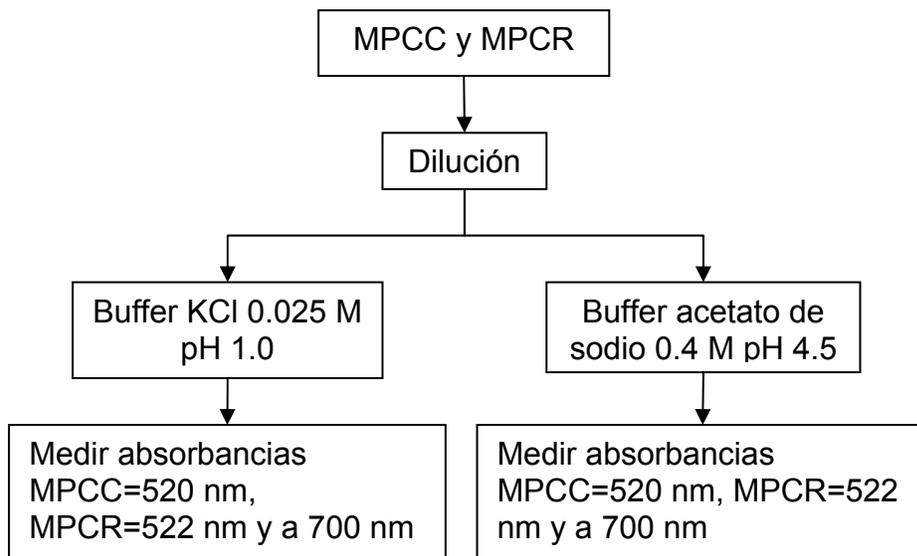
³² SCORDINO, Mónica. DI MAURO, Alfio. Adsorption of Flavonoids on Resins: Cyanidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1965-1972 (2004)

Diagrama 2: Determinación de la linealidad, factor de dilución y $\lambda_{\text{max-vis}}$



Con MPCC se prepararon dos soluciones diluidas por el factor de dilución determinado anteriormente; la primera solución se preparó con buffer cloruro de potasio 0.025 M pH 1.0 y la segunda con acetato de sodio 0.4 M pH 4.5. Después de 15 minutos de reposo y antes de una hora después de la preparación de las soluciones, se midieron las absorbancias de las dos soluciones a la longitud de onda de máxima absorción (MPCC=520 nm y MPCR=522 nm) y a 700 nm. En todas las mediciones se utilizó como blanco agua destilada. Este procedimiento se repitió con el extracto MPCR (Diagrama 3).

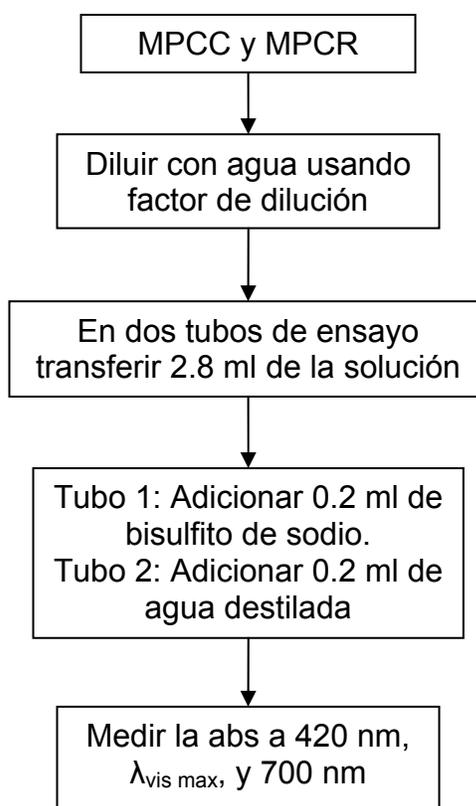
Diagrama 3: Cuantificación de antocianinas monoméricas por el método del pH diferencial.



3.4 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS POR EL MÉTODO DEL PH SUSTRACTIVO.

Se determinó la cantidad de antocianinas poliméricas mediante el método del pH sustractivo (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³, al igual que en el pH diferencial en esta metodología se utilizó el mismo factor de dilución para las mediciones. Cada uno de los extractos se diluyeron con agua destilada y se transfirieron 2.8 ml de las muestras a 2 tubos de ensayo. Al primer tubo se adicionó 0.2 ml de solución de bisulfito de sodio y al segundo tubo se agregó 0.2 ml de agua destilada, se dejaron reposar durante 15 min y se midió la absorbancia de las soluciones a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorción, (MPCC=520 nm y MPCR=522 nm) y a 700 nm (corrección por turbidez), contra un blanco de agua destilada. (Diagrama 4)

Diagrama 4: Cuantificación de antocianinas poliméricas por el método del pH sustractivo



3.5 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.

Para la determinación de fenoles totales (expresada en términos de mg ácido gálico/100g muestra) se utilizó la metodología de Folin Ciocalteu (Kuskoski y

Azuero 2004)³³. Mediante este método se preparó una solución de 121 mg de ácido gálico en 100 mL de agua (1210 ppm) y una solución de Na₂CO₃ al 20%.

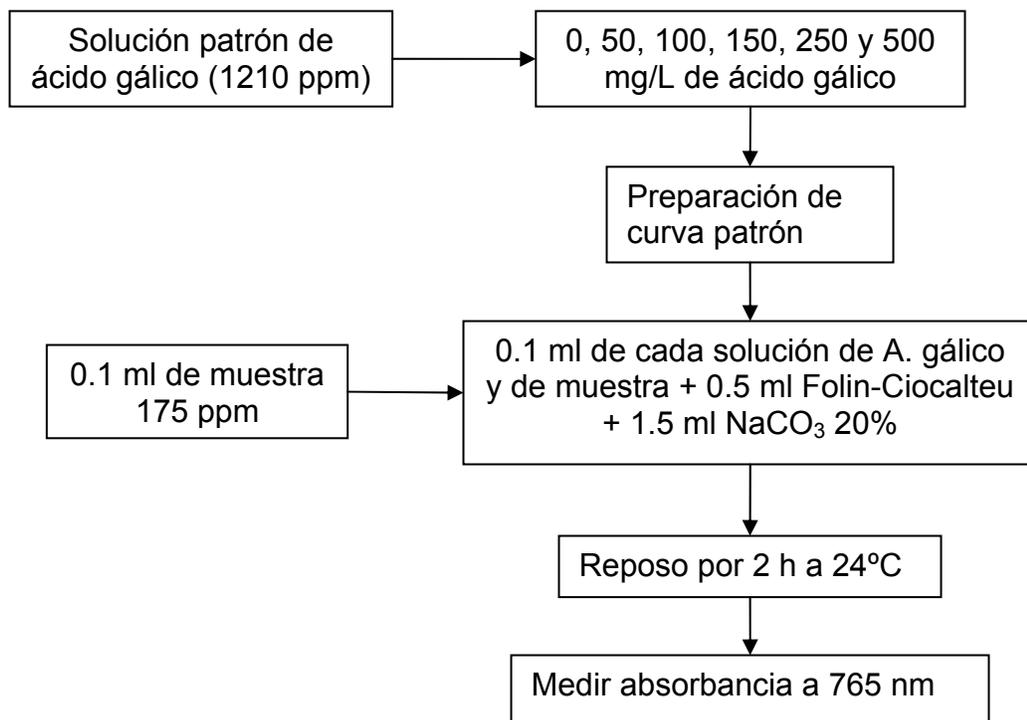
A partir de la solución de ácido gálico se preparó soluciones patrón de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L, luego se tomó 0.1 ml de estas soluciones y se colocaron en matraces aforados de 10 mL etiquetados previamente, se añadió agua, se agitó y a cada uno de los balones se agregó 0.5 mL del reactivo de Folin Ciocalteu. Después de 30 segundos y antes de 8 minutos se añadió 1.5 mL de NaCO₃ al 20%, se aforó con agua cada balón y se dejó en reposo durante 2 horas a 24°C (Diagrama 5).

A cada una de estas soluciones se midió la absorbancia frente a un blanco adecuado a 765 nm. Para la determinación de fenoles en las muestras se prepararon soluciones de cada uno de los extractos teniendo en cuenta que la absorbancia aproximada en las muestras fuera de 0.5, la concentración de los extractos utilizada fue de MPCR=175 ppm, MPCC=1800 ppm.

Cada uno de los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó la absorbancia frente a la concentración de las soluciones patrón.

³³ KUSKOSKI. Marta, ASUERO. Agustín. Actividad antioxidante de pigmentos antocianícos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(4): 691-693, (2004)

Diagrama 5: Determinación de fenoles totales



3.6 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS

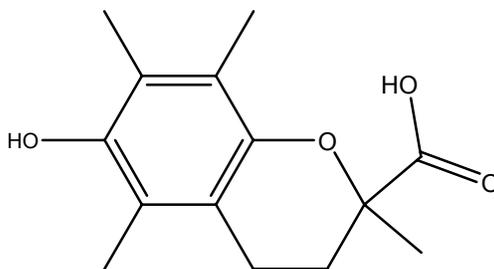
Para la determinación de la capacidad antioxidante TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) se utilizó Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido) como antioxidante de referencia y un radical coloreado, el ABTS, 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) (Ver Figura 19) en forma de sal diamónica y persulfato de potasio para la preparación del catión radical.

Figura 19: Estructuras de Trolox (A) y ABTS (B).

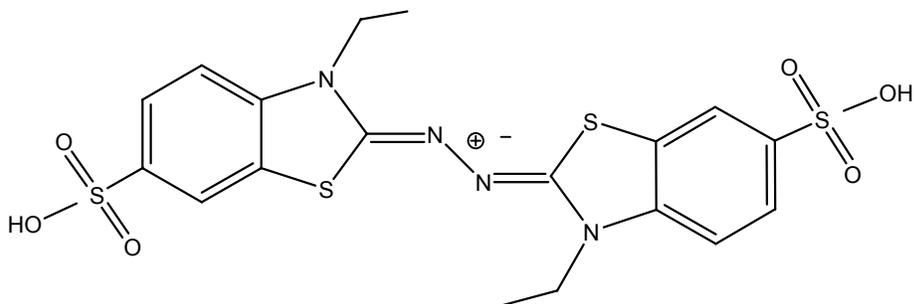
A: Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2- carboxílico

B: Acido 2.2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico

A



B

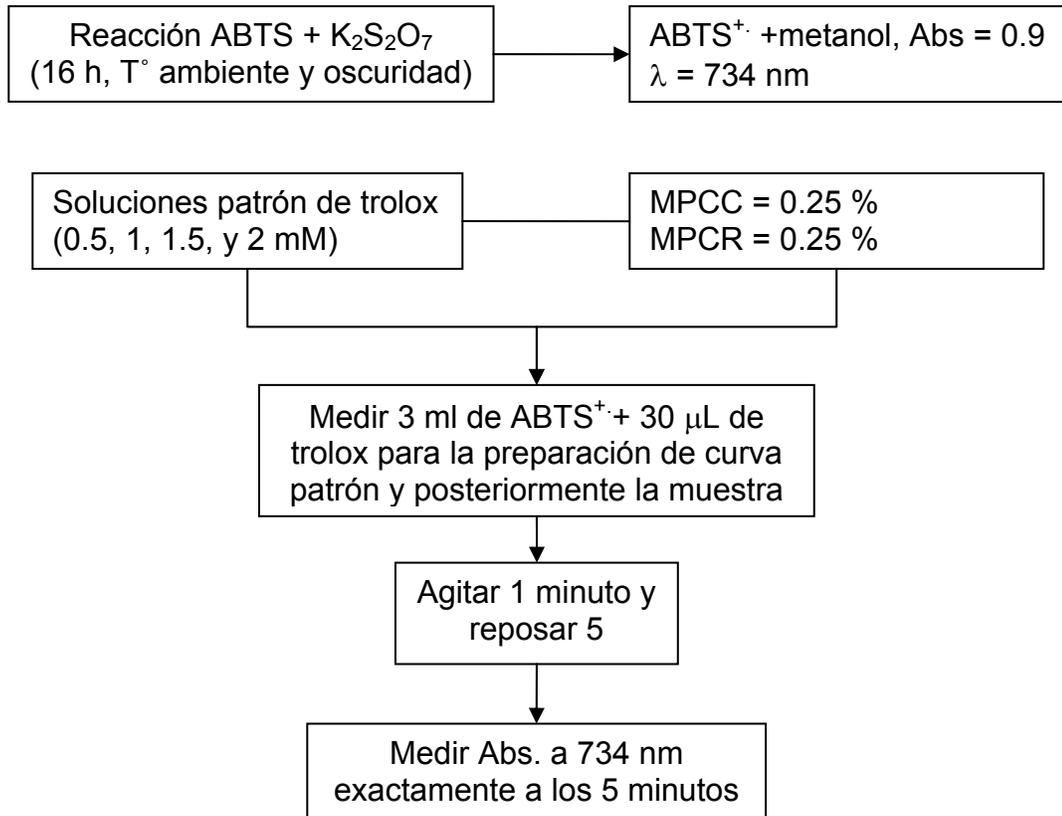


Primero se preparó el radical disolviendo ABTS y persulfato de potasio (2.45 mM concentración final) incubados a temperatura ambiente, en oscuridad y durante 16 horas. Después de formado el radical se diluyó esta solución en metanol y se dejó equilibrar hasta obtener una absorbancia alrededor de 1.

A continuación se prepararon soluciones patrón de Trolox; la solución madre se preparó por disolución de 25.04 mg de Trolox en 10 ml de metanol (2504 ppm o 10 mM) y de esta solución se prepararon patrones de 0.5, 1, 1.5, y 2 mM de trolox. (Diagrama 6)

Para la preparación de la curva patrón se adicionó 30 μ L de las soluciones patrón de trolox anteriormente preparadas a 3 ml del radical ABTS, se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar 5 minutos, luego se realizaron las mediciones a 734 nm. Por último se utilizó 30 μ L de las soluciones de cada extracto al 0.25% de la misma forma que la preparación de la curva patrón. Cada medición se realizó por triplicado y los resultados se expresaron en TEAC (μ mol de trolox/g de pulpa y cáscara).

Diagrama 6: Determinación de la Capacidad Antioxidante



3.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD.

Para la evaluación de la estabilidad de las antocianinas en los extractos obtenidos se tuvieron en cuenta cuatro variables: pH, temperatura, luz y aire.

La estabilidad de las antocianinas en los diferentes extractos fue determinada de acuerdo a la metodología realizada por Janna y Khairul²⁴, 2006 con algunas modificaciones que se muestran a continuación: Los parámetros estudiados para cada extracto fueron: degradación de las antocianinas frente al almacenamiento a pH 3 y 5 ajustados con un buffer de citrato y acetato respectivamente, temperatura de 4°C y temperatura ambiente ($\pm 17^\circ\text{C}$), en presencia y ausencia de luz, y en presencia y ausencia de aire; la degradación térmica de las antocianinas fue evaluada a 80°C y también a pH 3 y 5.

Se evaluó el comportamiento de los pigmentos antocianínicos a diferentes temperaturas para observar la degradación de estos compuestos en condiciones frías (4°C), a temperatura ambiente y a 80°C que es la temperatura aproximada en procesos de pasterización muy utilizados en la industria alimenticia.

La concentración de los extractos utilizada en los ensayos se puede observar en la tabla 9.

Debido a la dificultad prevista en el desarrollo de este análisis al combinar los factores, se prescindieron algunos de ellos: a 4°C no se realizaron experimentos con luz debido a la dificultad de instalar en un refrigerador una fuente de luz constante, además los ensayos se realizaron en ausencia de aire debido a que el material utilizado en el almacenamiento de las muestras no resistió tales condiciones; los análisis a temperatura ambiente se realizaron usando todas las variables, pero 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 sin aire y en oscuridad.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

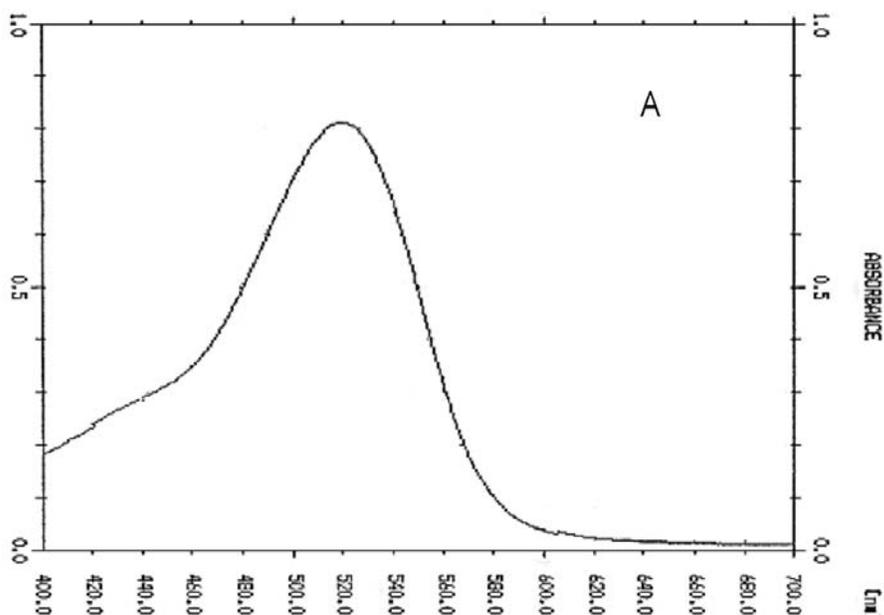
4.1 ENSAYOS PRELIMINARES. ESPECTROS DE ABSORCIÓN

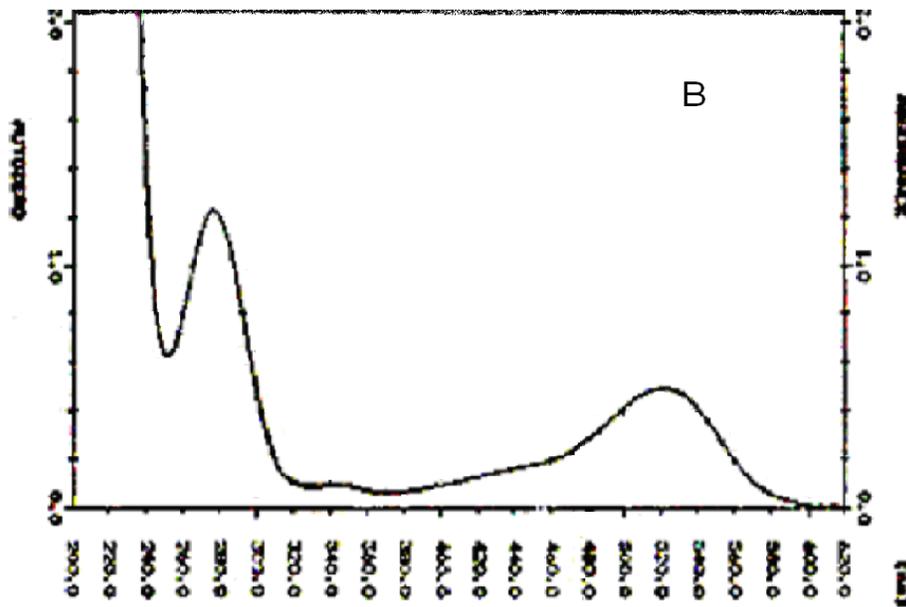
Se determinó la longitud de onda de máxima absorción de los extractos antocianínicos (MPCC y MPCR) que se obtuvieron del fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*), este valor fue de gran utilidad para cuantificar las antocianinas monoméricas y poliméricas y realizar los ensayos de estabilidad y degradación térmica. Mediante los espectros (Gráfica 1) se obtuvo una λ_{\max} de 520nm para MPCC y una λ_{\max} de 522 nm para MPCR.

Gráfica 1: Espectros de absorción de los extractos del motilón.

A: MPCC (Motilón Pulpa Cáscara Crudo)

B: MPCR (Motilón Pulpa Cáscara Refinado)

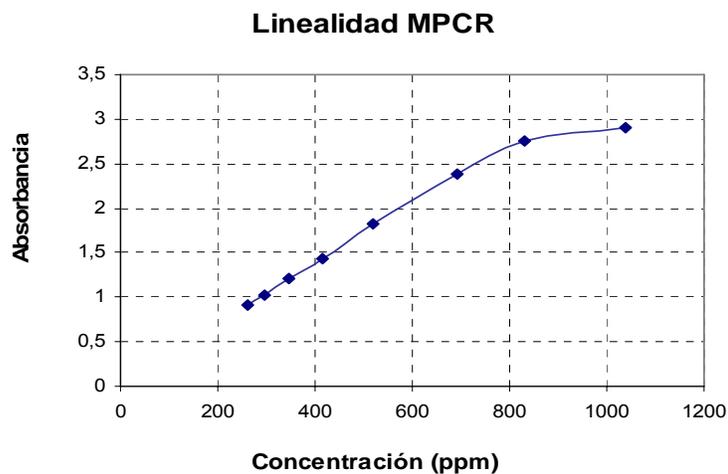




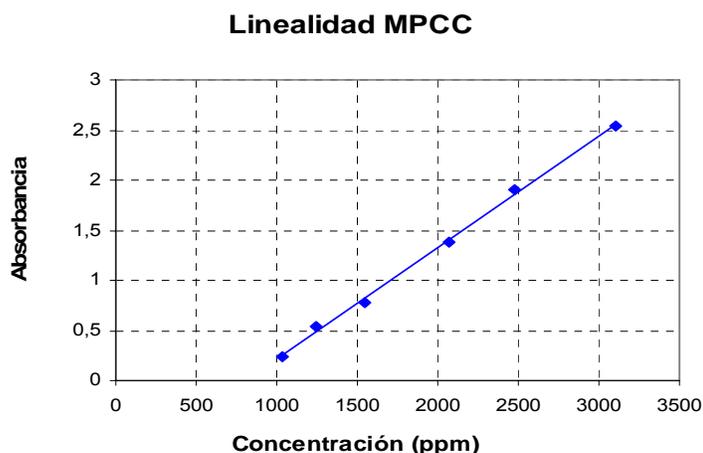
Posteriormente, se graficaron las absorbancias de las soluciones de antocianinas a diferentes concentraciones a la λ_{\max} para determinar su linealidad determinando así el rango más adecuado de concentración, útil para posteriores análisis. En la gráfica 2 se muestra las curvas de concentración vs absorbancia para cada uno de los extractos.

Gráfica 2: Absorbancias medidas a diferente concentración de los extractos
 A: MPCR (Motilón Pulpa Cáscara Refinado)
 B: MPCC (Motilón Pulpa Cáscara Crudo)

A



B



Para encontrar el rango lineal de absorbancia del extracto refinado (A) se eliminaron los puntos que disminuyen la linealidad de la curva expresada en R^2 , se encontró que los 5 primeros puntos tienen una correlación de 0.9999 muy cercana a 1 y que al tener en cuenta los puntos superiores esta correlación disminuye considerablemente por lo tanto la linealidad del extracto refinado se encuentra para valores de absorbancia menores a 1.427 aproximadamente.

La gráfica del extracto crudo (B) muestra un amplio rango de linealidad obteniendo una correlación R^2 de 0.9982, sin embargo se trabajó a concentraciones que no superan las 2000 ppm de extracto crudo, una vez obtenidos los rangos de linealidad donde se cumple la ley de Beer se procedió a cuantificar antocianinas y posteriormente a determinar las pruebas de estabilidad.

4.2 CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS MEDIANTE EL MÉTODO DEL PH DIFERENCIAL

A continuación se muestran los resultados que se obtuvieron tras el análisis semicuantitativo de antocianinas monoméricas mediante el método del pH diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³. En la tabla 1 se consignan los datos para el extracto crudo (MPCC), y en la tabla 2 se muestran los datos del extracto refinado (MPCR). Los porcentajes consignados en las tablas hacen referencia al contenido total de antocianinas monoméricas presentes en cada liofilizado.

Tabla 1: Porcentaje de antocianinas monoméricas en el extracto MPCC

λ	pH 1	pH 5	A	(mg/L)	% A.M
522 nm	0,896	0,059	0,837	1691,21	5,75
700 nm	0	0			
522 nm	0,849	0,053	0,796	1608,37	5,47
700 nm	0	0			
522 nm	0,894	0,05	0,844	1705,36	5,79
700 nm	0	0			
<i>Promedio</i>				1668,31	5,67
<i>Desv. Estándar</i>				52,39	0,178
<i>Coef. Variación</i>				3,14	3,14

Tabla 2: Porcentaje de antocianinas monoméricas en el extracto MPCR

λ	pH 1	pH 5	A	(mg/L)	%A.M
522 nm	1,885	0,399	1,53	255,49	18,25
700 nm	0,033	0,077			
522 nm	1,793	0,413	1,419	236,96	16,93
700 nm	0,04	0,079			
522 nm	1,857	0,407	1,493	249,31	17,81
700 nm	0,039	0,082			
<i>Promedio</i>				247,25	17,66
<i>Desv. Estándar</i>				9,44	0,67
<i>Coef. Variación</i>				3,82	3,82

En las dos tablas se puede observar un considerable contenido de antocianinas monoméricas contenidas en los extractos liofilizados; MPCR presenta mayor porcentaje de antocianinas porque es una fracción enriquecida de ellas debido a la refinación y la extracción de compuestos lipofílicos, azúcares y ácidos orgánicos, la tabla 2 indica que el extracto MPCR contiene 17.66% de antocianina monomérica, la tabla 1 muestra que en el extracto MPCC se encuentra una cantidad de 5.67% de antocianina monomérica, esto demuestra que el proceso de refinación concentra la cantidad de antocianinas 3.11 veces comparado con el extracto sin refinar.

Debido a que no se han realizado estudios de elucidación de estructura de antocianina mayoritaria en los pigmentos antociánicos del motilón, la cantidad de

antocianina presente en el fruto se expresó como mg de Cianidina-3 glucósido. (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³.

Conociendo el porcentaje de antocianinas presentes en el liofilizado crudo (tabla 1), se encontró que la cantidad de antocianinas monoméricas presentes en el fruto del motilón corresponde a 275.5 mg-antocianina/100 g de fruta.

La siguiente tabla muestra una comparación del contenido de antocianinas del motilón frente a otros frutos. (Manach y Scalbert, 2004)³⁴.

Tabla 3: Cantidad de antocianinas presentes en algunas fuentes de alimentos

<i>Fruto</i>	Cantidad mg/100 g de fruto
Mora	41.8
Uva	30.9
Acai	22.8
Guayaba	2.7
Fresa	23.7
Acerola	16.0
<i>Motilón</i>	275.5

Fuente: MANACH Claudin, SCALBERT Agustin, 2004

En comparación con otras frutas, el fruto del motilón contiene una alta cantidad de antocianinas por cada 100 g de fruto, es evidente, que el extracto del fruto del motilón es una fuente importante de antocianinas de gran interés no solo como materia prima para la obtención de patrones sino como posible aditivo natural en la industria alimenticia.

4.3 DETERMINACIÓN DEL COLOR POLIMÉRICO MEDIANTE EL MÉTODO DEL PH SUSTRACTIVO

Los análisis realizados para la cuantificación de antocianinas poliméricas mediante el método del pH sustractivo del extracto crudo (MPCC) y refinado (MPCR) muestran un porcentaje de color polimérico de 1.84% y 0.79% respectivamente.

Los resultados obtenidos coinciden con los valores publicados en la literatura científica en la que para frutas y vegetales no procesados ni almacenados el porcentaje de color polimérico es usualmente menor al 10%. (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³.

En las siguientes tablas se muestra el porcentaje de color polimérico para cada uno de los extractos, los análisis se realizaron por triplicado.

³⁴ MANACH Claudin, SCALBERT Agustin. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*; 79, 727-47. 2004

Tabla 4: Porcentaje de color polimérico en el extracto MPCC

λ	(Abs) Sin bisulfito	(Abs) Con bisulfito	Densidad de color	Color polimérico	% Color polimérico
522 nm	0,693	0,012	221,004	4,284	1,94
420 nm	0,19	0,017			
700 nm	0,003	0,006			
522 nm	0,608	0,014	189,504	3,276	1,73
420 nm	0,164	0,001			
700 nm	0,01	0,001			
522 nm	0,645	0,014	202,86	3,78	1,86
420 nm	0,166	0,001			
700 nm	0,003	0			
		<i>Promedio</i>	204,456	3,78	1,84
		<i>Desv. Estándar</i>	15,811	0,504	0,106
		<i>Coef. Variación</i>	7,73	13,33	5,76

Tabla 5: Porcentaje de color polimérico en el extracto MPCR

λ	(Abs) Sin bisulfito	(Abs) Con bisulfito	Densidad de color	Color polimérico	% Color polimérico
522 nm	1,389	0,014	193,7	1,9	0,98
420 nm	0,598	0,009			
700 nm	0,025	0,002			
522 nm	1,376	0,011	184,8	1,1	0,60
420 nm	0,522	0,004			
700 nm	0,025	0,002			
522 nm	1,384	0,014	186,2	1,5	0,81
420 nm	0,522	0,001			
700 nm	0,022	0			
		<i>Promedio</i>	188,2	1,5	0,79
		<i>Desv. Estándar</i>	4,7857	0,4	0,1931
		<i>Coef. Variación</i>	2,54	26,67	24,32

El color polimérico y la densidad de color calculados para determinar el porcentaje de color polimérico se determinaron según el procedimiento descrito en la metodología.

Las antocianinas poliméricas o proantocianidinas se encuentran en muestras procesadas o materiales que están sujetos al almacenamiento, por lo tanto este tipo de compuestos son menos susceptibles a la decoloración que las antocianinas monoméricas. (Giusti y Wrolstad, 2001)¹³; no obstante, las propiedades antioxidantes pueden verse disminuidas de manera considerable con respecto a las antocianinas monoméricas, entonces, un bajo contenido de antocianinas poliméricas indicarían que los extractos antociánicos tendrán una buena capacidad antioxidante.

Los resultados muestran un mayor porcentaje de color en el extracto crudo (tabla 4), la diferencia de los valores hallados entre el extracto crudo y refinado se puede explicar teniendo en cuenta que en el proceso de refinación los pigmentos fueron pasados por una columna de Amberlita XAD-7 para eliminar azúcares, ácidos orgánicos y otros compuestos menos polares que las antocianinas, se observó que durante el proceso de elusión de estos compuestos el agua usada en la columna salió con una leve pigmentación parda-rojiza; el color obtenido en el agua de desecho pudo ser el resultado de la eliminación de las proantocianidinas junto con otros compuestos.

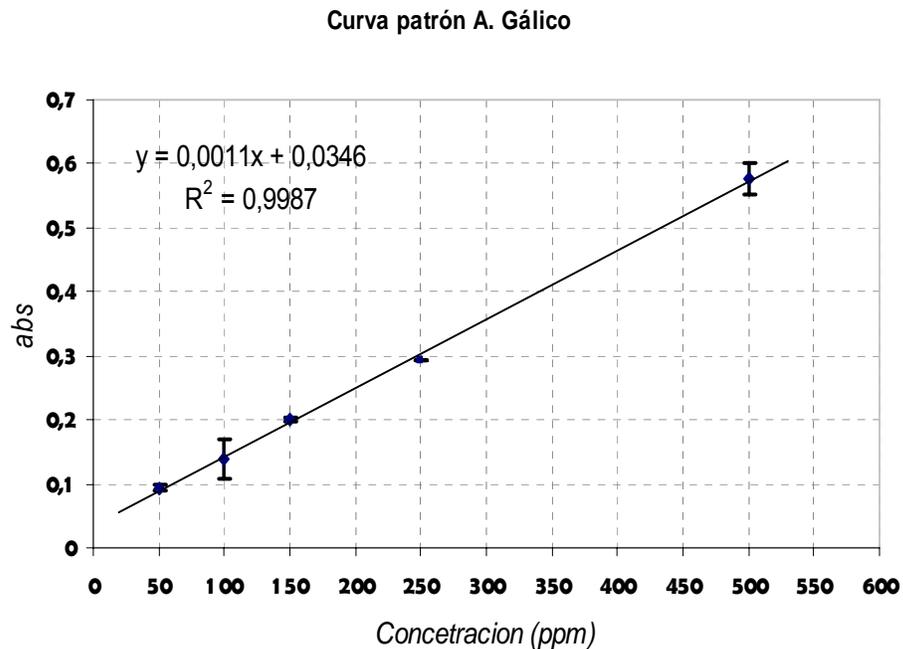
De acuerdo con la bibliografía (Kuresh y McDonald, 2002)³⁵ se utiliza acetona al 70% para eluir proantocianidinas en una columna apolar de Sephadex LH-20. La disminución de la polaridad de las antocianinas poliméricas puede llegar hasta el punto de tener una polaridad similar a otros compuestos que se eluyen en la columna de Amberlita XAD-7, explicando así la disminución de porcentaje de color polimérico en el extracto refinado (MPCR).

4.4 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Los datos para la construcción de la curva patrón de ácido gálico para la determinación de fenoles totales se tomaron por triplicado, se obtuvo un coeficiente de correlación muy cercano a uno lo que indica una buena linealidad, (gráfica 3). Con la ecuación de la recta se obtuvo el valor en mg de ácido gálico equivalente para cada una de las muestras MPCR y MPCC, expresando los datos como mg A. gálico/g fruta.

³⁵ KURESH A., McDONALD Jane. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 282–288 (2002)

Gráfica 3: Curva de calibración de ácido gálico



Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla 6.

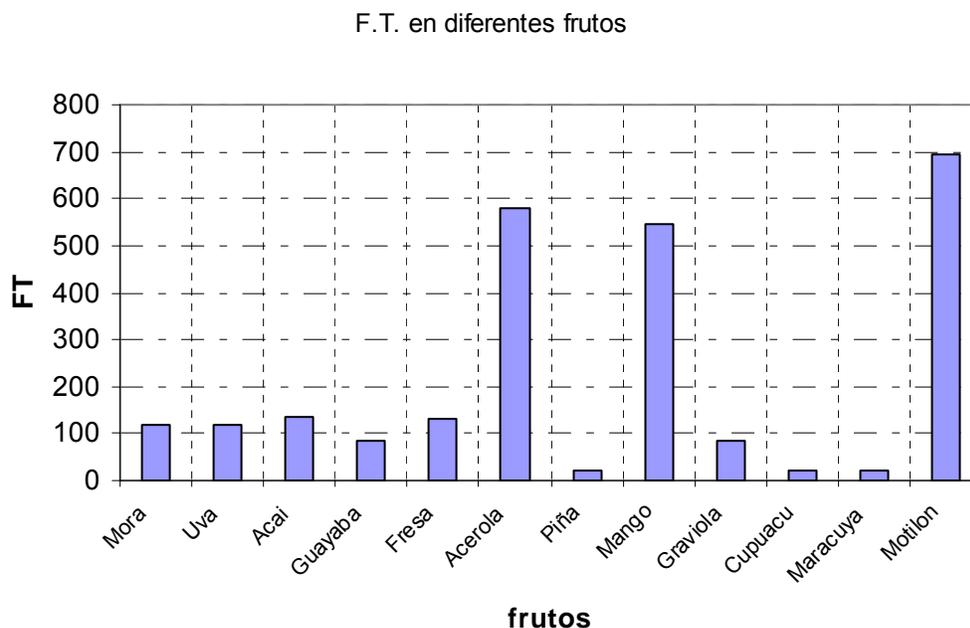
Tabla 6: Cantidad de fenoles totales encontrados en la fruta

Muestra	Fenoles Totales (mg A. gálico/100 g de muestra)
MPCR	31217.1
MPCC	2816.5
Fruta	693.4

En la siguiente gráfica se muestra una comparación de la cantidad de fenoles totales presentes en 100 g de fruta de motilón respecto a otros frutos, (Kuskoski y Azuero³⁶ 2005).

³⁶ KUSKOSKI. Marta, ASUERO. Agustín. Aplicación de Diversos Metodos Quimicos para determinar la Actividad Antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732, (2005)

Gráfica 4: Comparación del contenido de fenoles del motilón con otros frutos



La gráfica 4 muestra que el fruto del motilón contiene una elevada cantidad de fenoles totales en comparación con otras frutas. Se debe destacar que en este tipo de extractos, se encuentra una amplia variedad de polifenoles, no solo los que imparten coloración, (antocianinas) sino también compuestos incoloros. El elevado contenido de polifenoles del fruto del motilón permite reflexionar sobre las actividades biológicas de los polifenoles; por esta razón, fue importante valorar la actividad antioxidante de este tipo de extractos. (Manach y, Scalbert, 2004)³⁴

4.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE:

Dentro del amplio rango de métodos usados para evaluar antioxidantes, la Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox (TEAC) es uno de los métodos más usados.

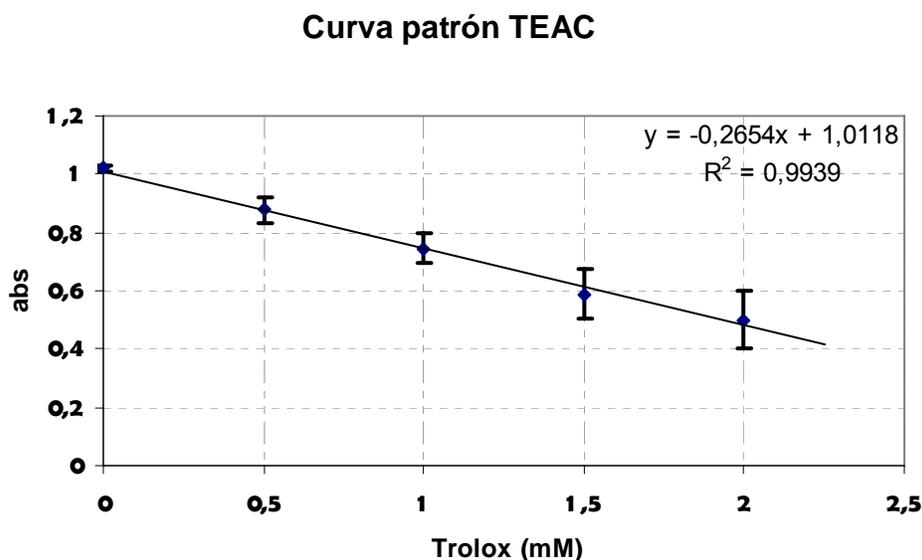
Esta medición está basada en la reducción por parte del radical ABTS azul/verde relativamente estable convirtiéndolo a un producto incoloro. El grado de esta decoloración refleja la cantidad de ABTS^{•+} que ha sido reducido y puede ser determinada espectrofotométricamente. Como antioxidante de referencia se utilizó trolox. (Halliwell y Gutteridge, 1999)³⁷.

³⁷ HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford University Press. Tercera Edición. (1999).

La curva de calibración se realizó con un promedio de tres replicas, de esta manera se determinó la disminución de la absorbancia del radical ABTS a una λ de 734 nm, la correlación fue muy cercana a 1, obteniéndose así, una curva con una buena linealidad. (Gráfica 5)

El grado de dispersión se expresa en términos de la desviación estándar y coeficiente de variación, los cuales presentan como valores de 0.057 y 9.38 % respectivamente.

Gráfica 5: Curva de calibración del trolox



Después de obtener la curva patrón de trolox, se realizaron las mediciones espectrofotométricas de los extractos crudo y refinado del fruto de motilón, cada medición se realizó por triplicado (tabla 7)

Tabla 7: TEAC: Absorbancias medidas en los extractos de motilón

Replica	Abs MPCR	Abs MPCC
1	0,402	0,759
2	0,4	0,774
3	0,401	0,805
Promedio	0,401	0,779
Desv. Estándar	0,0010	0,0235
Coef. Variación	0,25	3,01

Los CV (coeficientes de variación) relativamente bajos garantizan que los resultados son confiables, es entonces cuando se procede al procesamiento de los datos. Los valores TEAC, se calcularon interpolando los datos promedio en la curva de calibración con trolox (gráfica 5)

Los valores obtenidos fueron

Tabla 8: Concentración de los extractos equivalentes al trolox

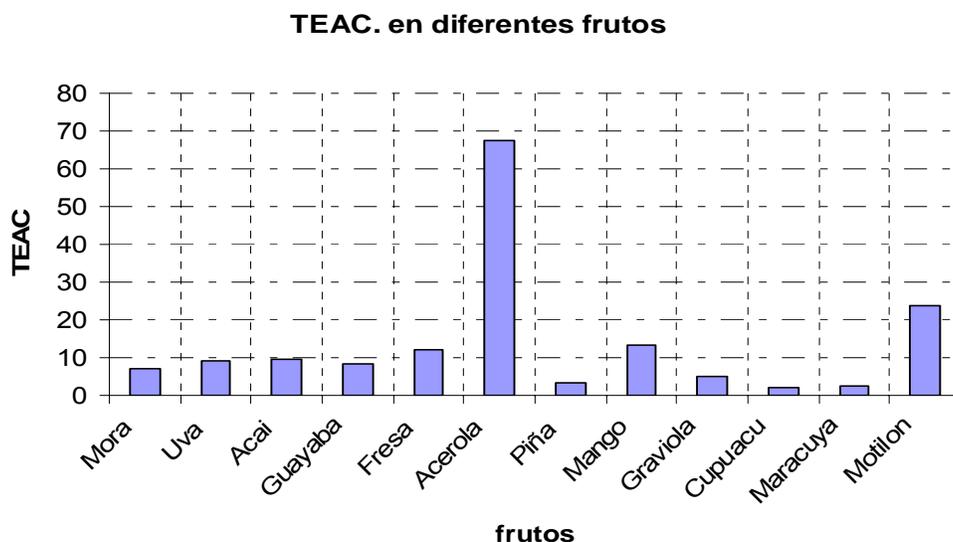
Muestra	Capacidad antioxidante (μmol de trolox/g de muestra)
MPCR	1130.0
MPCC	322.0
Fruta	22.3

Los valores de TEAC indican que para el extracto MPCC la capacidad antioxidante es mucho menor que para el extracto MPCR, igualmente se debe a que el extracto enriquecido en polifenoles tiene mayor capacidad para reducir los radicales libres, así, estos resultados están en concordancia con el mayor contenido de polifenoles en este extracto.

La capacidad antioxidante se reporta comúnmente en μmol de trolox/g de pulpa y para el motilón se obtuvo un valor de 22.31 μmol de trolox/g de pulpa y cáscara, además, se comparó este valor con los publicados en la bibliografía (Kuskoski y Azuero 2005)³⁶. La gráfica 6 muestra la capacidad antioxidante del motilón comparada con otras frutas. Es evidente que dentro de esta comparación, el motilón posee la mayor actividad antioxidante con excepción de la acerola:

Se ha encontrado que los polifenoles poseen una buena capacidad antioxidante, era de esperarse que el alto contenido de polifenoles en el motilón (ver Gráfica 4) mostrara el valor mas alto como agente antioxidante comparado con frutos con menor cantidad de polifenoles; en algunos trabajos (Kuskoski y Azuero³⁶ 2005) relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de fenoles totales y las antocianinas, sin embargo se ha encontrado que cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente, de acuerdo con la variación en la sustitución hidroxilo o metoxilo. Por esta razón no es confiable la comparación entre cantidad de fenoles y capacidad antioxidante.

Gráfica 6. Comparación de la capacidad antioxidante TEAC del motilón con otros frutos



Debido a que los antioxidantes protegen contra los radicales libres son de gran importancia en la dieta para preservar una buena salud, (Mariken y Dallinga, 2003)³⁸. Es por esto que se hace necesario encontrar una fuente natural de flavonoides como el motilón el cual posee una muy buena capacidad antioxidante (TEAC) y una alta cantidad de antocianinas (2755 mg antocianina/kg de fruta). En resumen, en este estudio se presenta el motilón, en el cual se pudo obtener resultados verdaderamente útiles para ser implementado como colorante en la industria de alimentos, sin embargo, existen factores que limitan el uso de estos compuestos en la industria debido a que las antocianinas se pueden degradar dependiendo de las condiciones de almacenamiento y la matriz alimenticia que contenga el extracto, a continuación se tratará el aspecto de la estabilidad de las antocianinas respecto a cuatro factores importantes tales como pH, luz, aire y temperatura.

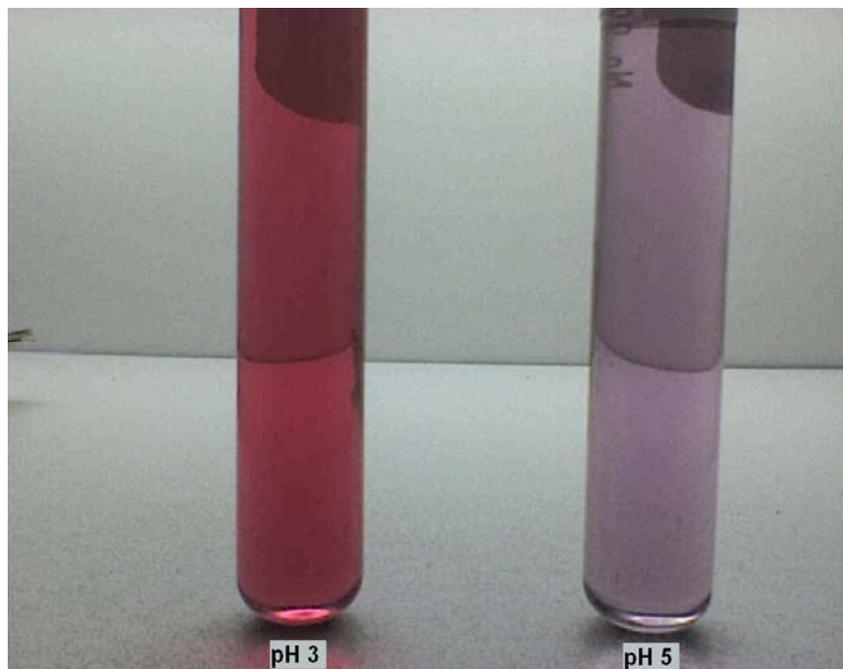
4.6 ESTABILIDAD DE PIGMENTOS ANTOCIÁNICOS

Se evaluó la estabilidad de los pigmentos antociánicos a partir de los extractos MPCC y MPCR, en cada extracto se estudio el efecto de factores como pH, temperatura, aire y luz, la concentración de cada extracto se preparó teniendo en cuenta de que la absorbancia no sobrepase el limite de linealidad (ver gráfica 2).

³⁸ MARIKEN J.T.J., DALLINGA J. Sebastian, A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section* 80 409–414 (2003)

El pH afecta directamente la absorbancia de los extractos debido a que a pH's bajos como el pH 3 las antocianinas se encuentran en la forma catión flavilio que es la estructura más estable y con mayor intensidad de color y por tanto tiene mayor absorbancia, mientras que a pH 5 la estructura predominante es la forma seudo-base carbinol la cual tiene menor intensidad de color. En la ilustración 1 se muestra la intensidad de color a t=0 del extracto crudo (MPCC).

Ilustración 1: Extracto de motilón a pH 3 y 5



No obstante, la concentración (Tabla 9) de extracto afecta el color: al utilizar iguales cantidades de cada extracto, MPCR presentó mayor coloración debido a que es una fracción enriquecida de antocianinas a diferencia del extracto MPCC que contiene sustancias como azúcares y ácidos orgánicos y que no contribuyen con el color.

Tabla 9: Concentración de extractos en pruebas de estabilidad

Muestra	pH	Concentración (ppm de extracto)
MPCC	3	416
MPCC	5	1240
MPCR	3	197
MPCR	5	340

En esta investigación, se evaluó la estabilidad de los extractos crudo y refinado durante el almacenamiento a pH 3 y 5, a temperatura ambiente (17°C) y a 4°C, en exposición directa a la luz y en la oscuridad y en presencia y ausencia de aire; también se evaluó la degradación de los extractos frente al calentamiento a 80°C.

4.6.1 Estabilidad durante el almacenamiento para extractos a pH 3:

La degradación de los pigmentos a pH 3, se evaluó en presencia y ausencia de aire (CA y SA) y en presencia y ausencia de luz (CL y SL). La nomenclatura que se utilizó en la denominación de las muestras se explica a continuación:

1. dígito: indica el valor de pH (3 o 5)
2. letra: indica la temperatura ambiente (A)
3. letras: indica presencia aire (CA) o ausencia (SA)
4. letras: indica presencia luz (CL) o ausencia (SL)

El análisis efectuado a pH 3, indicó que la degradación de los extractos durante el almacenamiento siguió un modelo de reacción de primer orden. La constante de degradación de las diferentes condiciones evaluadas fue determinada mediante la ecuación:

$$\ln (A_t/A_0) = -k \times t$$

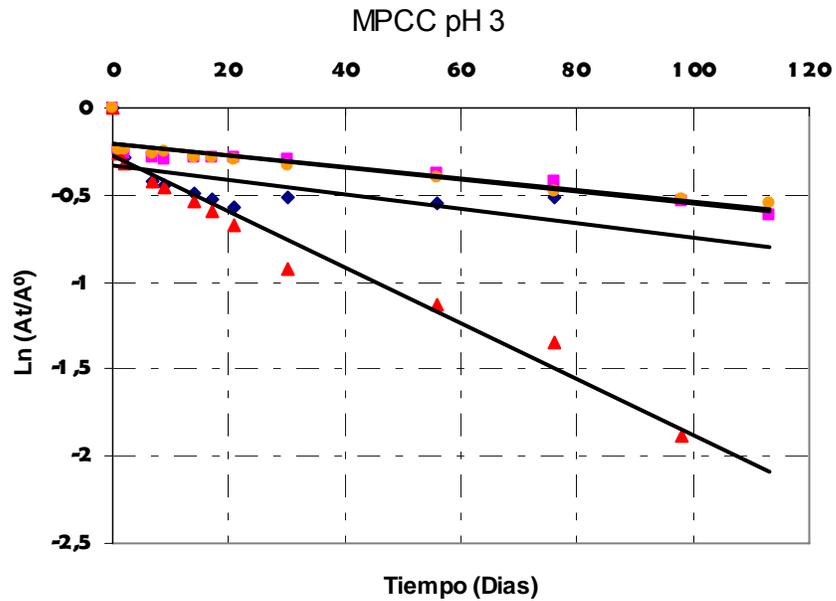
Donde A_0 es la medición de absorbancia medida inicialmente y A_t es la absorbancia medida después de t días de almacenadas las muestras a diferentes condiciones de almacenamiento; adicional a esto se calculó $t_{1/2}$ (tiempo de vida medio) necesario para una degradación del 50% de las antocianinas (Reyes y Cisneros- Zevallos, 2005)³⁹:

$$t_{1/2} = \ln (0.5)/k$$

Las siguientes gráficas muestran el efecto en la velocidad de degradación al cambiar las condiciones de almacenamiento de las muestras.

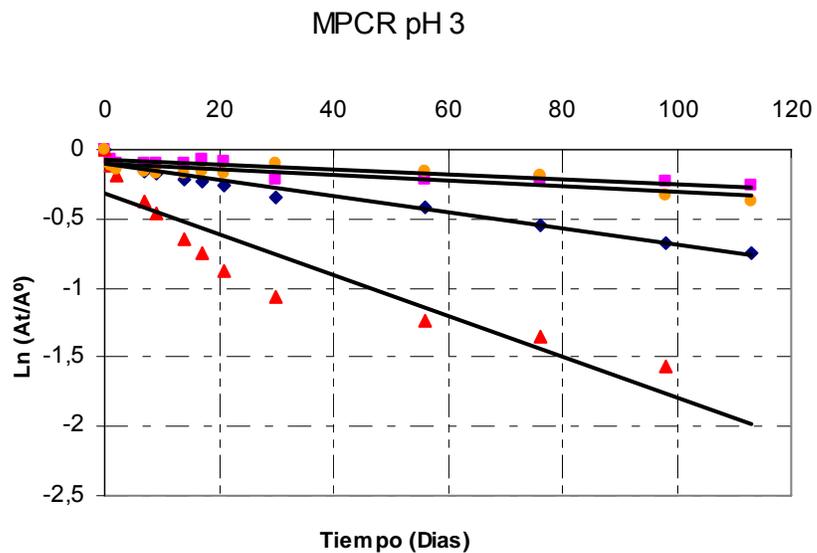
³⁹ REYES L., CISNEROS-ZEVALLOS L.. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple and red – flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry*. (2005)

Gráfica 7: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCC a pH 3.



■ 3A SA SL, ● 3A SA CL, ◆ 3A CA SL, ▲ 3A CA CL

Gráfica 8: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCR a pH 3..



■ 3A SA SL, ● 3A SA CL, ◆ 3A CA SL, ▲ 3A CA CL

Las pruebas de almacenamiento mostraron que el pH es el principal factor que afecta la degradación de los extractos, adicional a esto se obtuvo como resultado

que a pH 3 los extractos soportaron mejor los factores a los cuales se vieron sometidos como el aire y la luz.

Las gráficas 7 y 8 indican una pendiente más pronunciada para las muestras almacenadas con aire y con luz, las muestras más estables fueron aquellas que no contenían aire en el recipiente, 3A SA SL, 3A SA CL, de igual forma se puede observar que la luz es un factor que no afecta significativamente la estabilidad de los pigmentos, siempre y cuando no se exponga al aire, entonces la presencia de aire es un factor con una gran influencia en la degradación; en ese orden de ideas, las muestras expuestas al aire experimentaron un aumento en las constantes de degradación, pero la combinación de ambos factores, aire y luz tienen el efecto más adverso en la estabilidad, dando como resultado un tiempo de vida media menor y una alta constante de degradación para las muestras 3A CA CL de ambos extractos.

Las gráficas 7 y 8 muestran además que la refinación de los extractos influye en su estabilidad frente al almacenamiento, se puede observar que las muestras refinadas MPCR presentan mayor estabilidad que las muestras crudas MPCC al comparar los tiempos de vida media y las constantes de degradación (Tabla 10), esto puede deberse principalmente a la presencia de otros metabolitos secundarios, tales como azúcares y ácidos orgánicos que influyen negativamente en la estabilidad de los compuestos coloreados de MPCC, sin embargo los factores como el aire y la luz afectan en una proporción similar en ambos extractos. En conclusión los extractos refinados MPCR soportan mejor el almacenamiento que los extractos crudos MPCC alcanzando un tiempo de vida media muy alto, cuando las muestras no se someten al aire o luz simultáneamente. En la siguiente tabla se puede observar las constantes y los tiempos de vida media para cada una de las muestras.

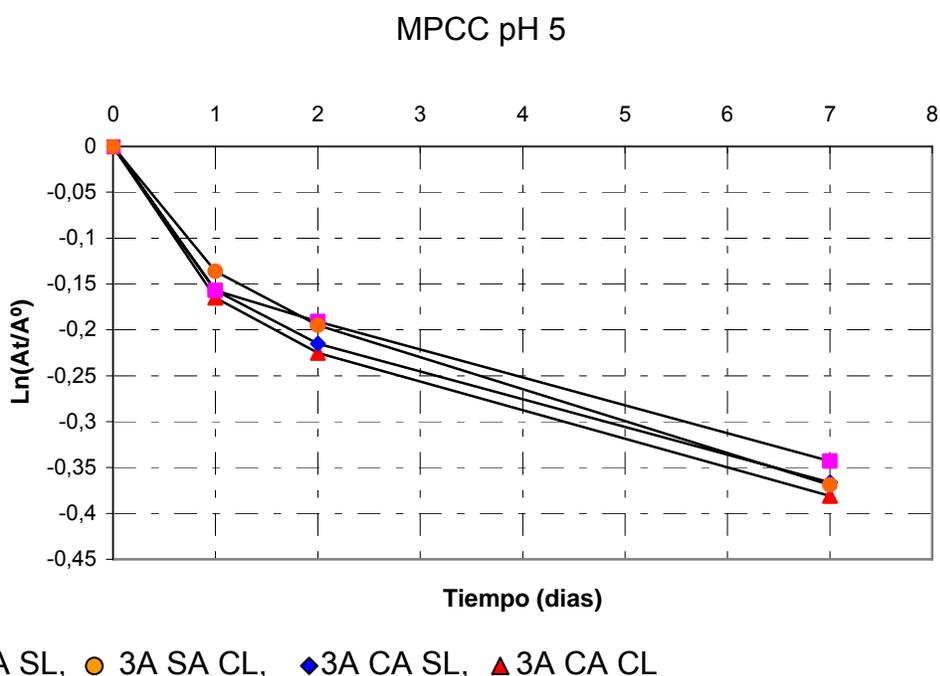
Tabla 10: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a pH 3

Extracto	pH	Muestra	$k \times 10^{-3}$	$t_{1/2}$ (d)
MPCC	3	3A, SA, SL	3,4	203,87
		3A, SA, CL	3,4	203,87
		3A, CA, SL	4,2	165,04
		3A, CA, CL	16,1	43,05
MPCR	3	3A, SA, SL	1,8	385,08
		3A, SA, CL	1,9	364,81
		3A, CA, SL	5,9	117,48
		3A, CA, CL	14,8	46,83

4.6.2 Estabilidad durante el almacenamiento para extractos a pH 5:

Como ya se mencionó anteriormente el pH es el factor de mayor influencia en la estabilidad de los pigmentos antociánicos debido a que afecta directamente la estructura química de la antocianina (véase fig. 14), al ser la base quinoidal (pH 5) menos estable que el catión Flavilio (pH 3) factores externos como la luz y el aire afectan enormemente la estabilidad de los extractos; las gráficas presentadas a continuación muestran el comportamiento que tiene el extracto MPCC durante el almacenamiento a temperatura ambiente y a pH 5:

Gráfica 9: Comportamiento de los extractos coloreados del motilon MPCC a pH 5



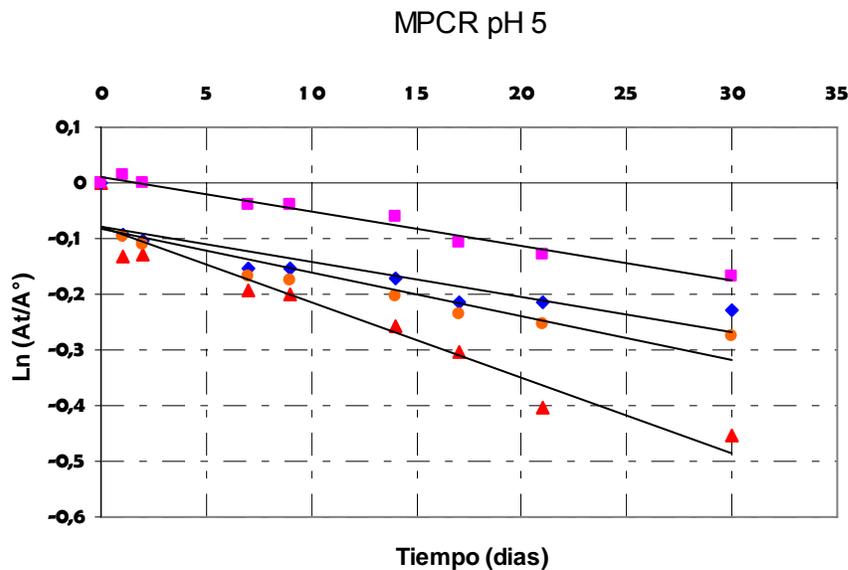
Para el extracto crudo almacenado a pH 5 los factores de exposición como el aire y la luz no afectan en gran medida la velocidad de degradación, esto se debe a que el pH es el factor más importante y degrada los pigmentos en un intervalo muy corto de tiempo, esta rápida degradación no permite observar los efectos degradativos propios de factores externos como la luz y el aire; la tabla 11 muestra que los tiempos de vida media ($t^{1/2}$) para las muestras almacenadas del extracto MPCC varían en menor proporción que para las muestras del extracto MPCR, en las cuales se puede observar que los factores externos influyen enormemente en las constantes de degradación k y $t^{1/2}$.

Tabla 11: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a pH 5

Extracto	pH	Muestra	$k \times 10^{-3}$	$t_{1/2}$ (d)
MPCC	5	5A, SA, CL	8,5	81,55
		5A, SA, SL	10,4	66,65
		5A, CA, SL	13,2	52,51
		5A, CA, CL	16	43,32
MPCR	5	5A,SA, SL	6,1	113,63
		5A, CA, SL	6,3	110,02
		5A, SA, CL	7,9	87,74
		5A, CA, CL	13,5	51,34

Las pruebas de almacenamiento para el extracto refinado MPCR muestra que el proceso de refinación otorga a los extractos del motilón mayor estabilidad durante el almacenamiento en comparación con el extracto MPCC, en la gráfica 11 se observa los efectos causados por los factores a los cuales se expone el extracto MPCR, la muestra menos estable es aquella a la que se expone los factores de aire y luz simultáneamente 3A CA CL.

Gráfica 10: Comportamiento de los extractos coloreados del motilón MPCR a pH 5



■ 3A SA SL, ● 3A SA CL, ◆ 3A CA SL, ▲ 3A CA CL

Aunque el proceso de refinación del extracto MPCR se hace notable en la estabilidad frente a los extractos MPCC a pH 5 (ver graficas 9 y 10), estos resultados no se comparan con las muestras almacenadas a pH 3 a que son

mucho más estables a todas las condiciones, obteniendo tiempos de vida media muy superiores que a pH 5 (ver tablas 10 y 11), éste resultado concuerda con lo encontrado en la bibliografía (Reyes, 2005)³⁹ en donde a valores bajos de pH los pigmentos antociánicos son altamente estables y presentan colores muy llamativos. En la gráfica 10 se puede observar una variación al comportamiento normal frente a la presencia de aire y luz de la muestra 3A SA CL este comportamiento no es un resultado definitivo frente al aire y la luz debido a que el tiempo de vida media es relativamente corto y no se observa el efecto degradativo con claridad a diferencia de muestras almacenadas a pH 3. La ilustración 2 muestra el color de las muestras después de cuatro meses de almacenamiento, se puede observar que a pH 5, el color cambió de violeta brillante a café opaco, mientras que a pH 3 el color rojo se mantiene.

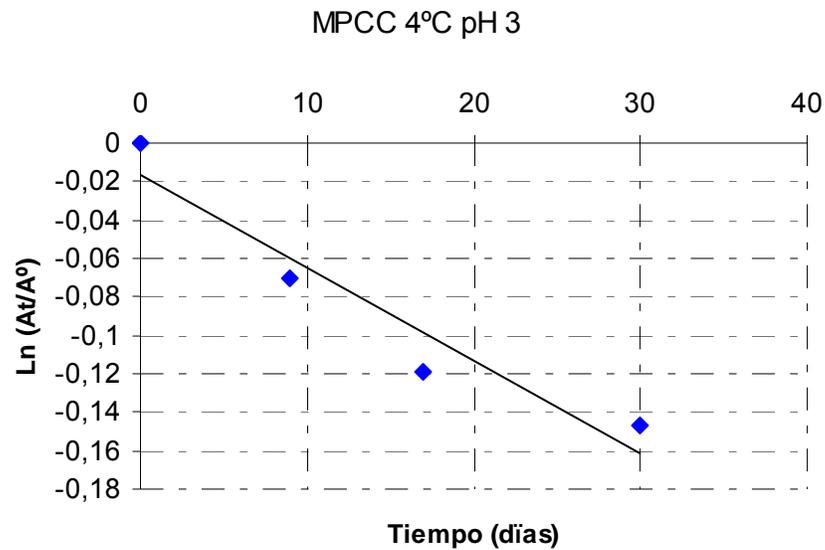
Ilustración 2: Contraste de muestras sometidas al almacenamiento entre pH 3 y pH 5



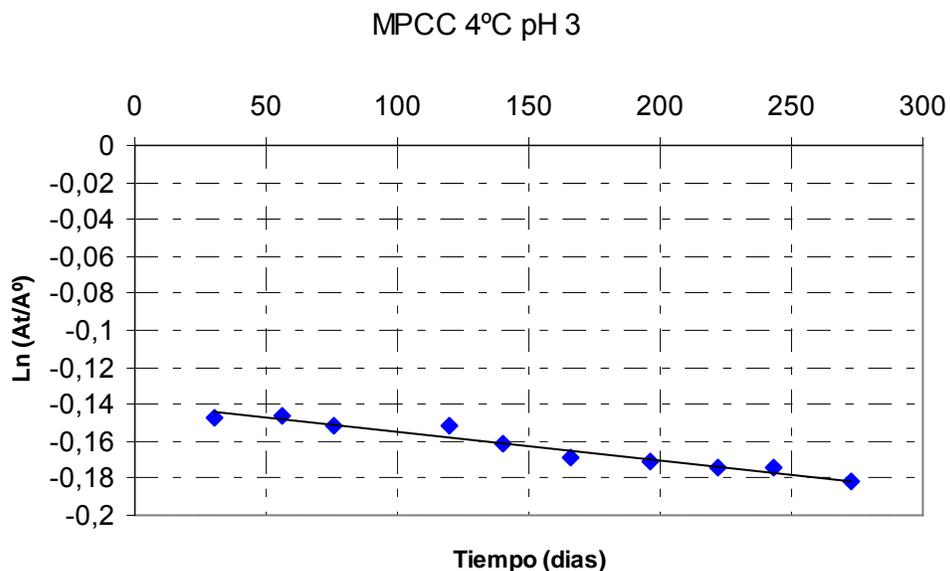
4.6.3 Estabilidad de las antocianinas a 4°C

La degradación de los pigmentos durante el almacenamiento a 4°C siguió una cinética de primer orden para los dos extractos y para los dos valores de pH, debido a las dificultades metodológicas expuestas anteriormente no se realizaron los ensayos en presencia de aire y luz.

Gráfica 11: Comportamiento del extracto MPCC durante el primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3



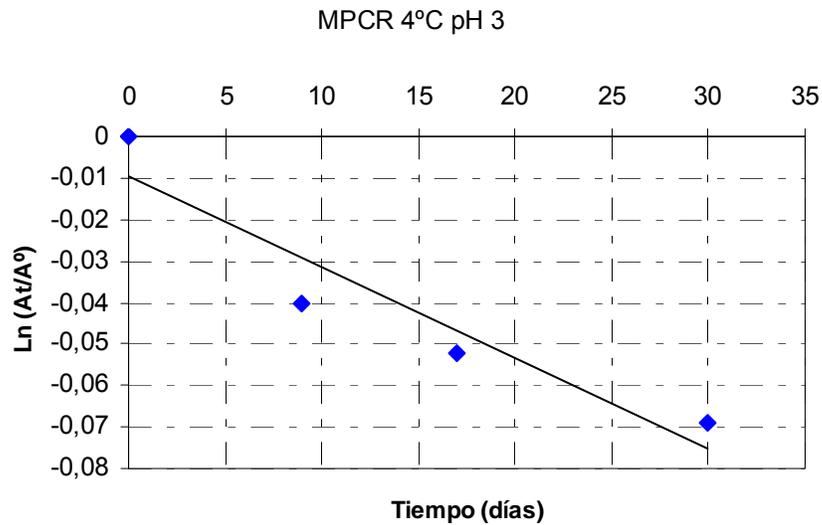
Gráfica 12: Comportamiento del extracto MPCC después del primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3



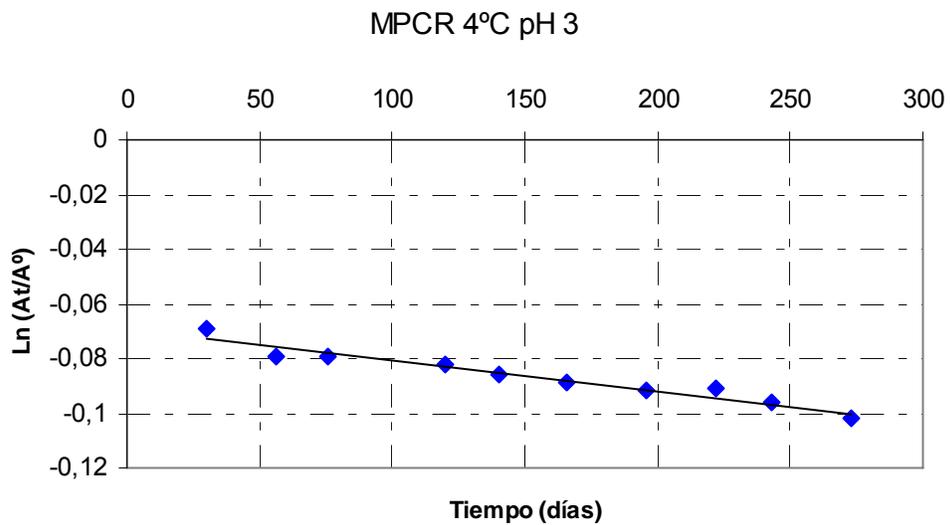
El comportamiento de los extractos durante el almacenamiento a pH 3 mostró que la degradación de los pigmentos para ambos extractos fue de forma lineal hasta los 30 días aproximadamente (Gráficas 11 y 12), luego de este periodo de tiempo,

se observó que la lectura de las absorbancias no cambiaron considerablemente en comparación con las mediciones realizadas durante el primer mes de almacenadas las muestras (Gráficas 13 y 14).

Gráfica 13: Comportamiento del extracto MPCR durante el primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3

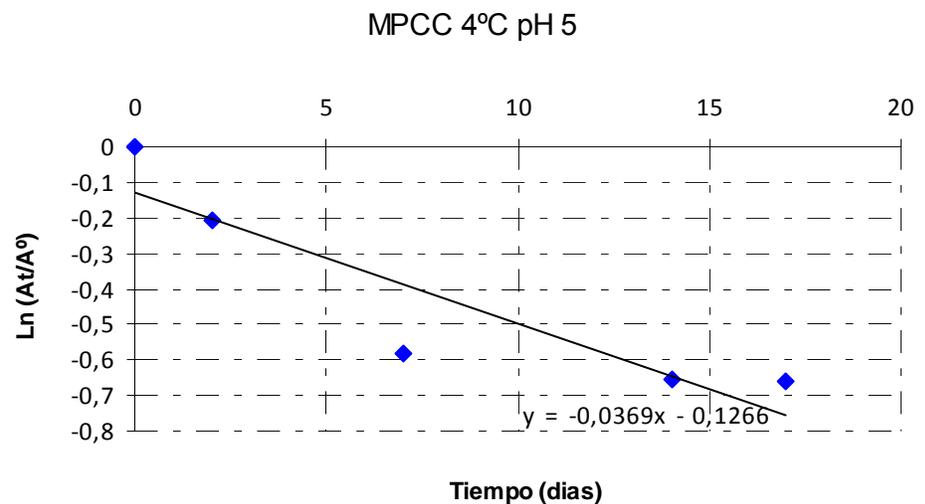


Gráfica 14: Comportamiento del extracto MPCR después del primer mes de almacenamiento a 4°C y a pH 3

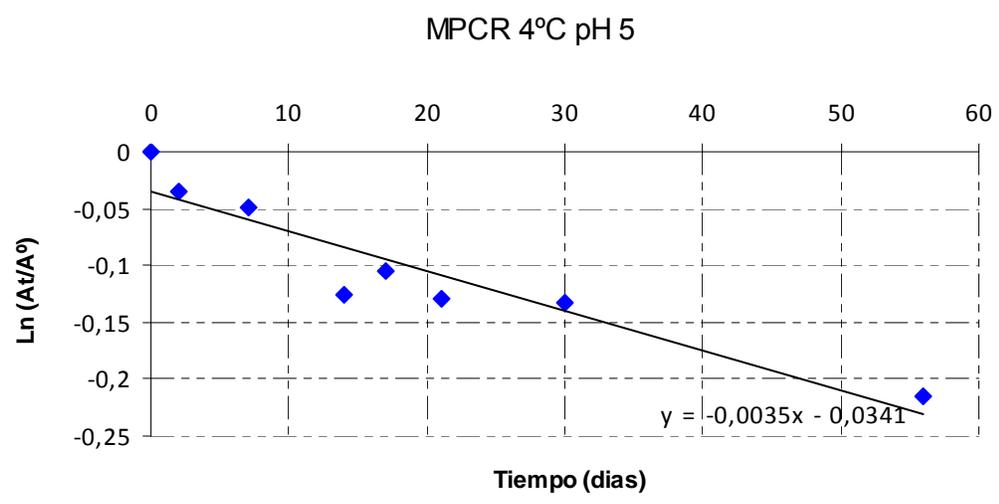


Las gráficas 15 y 16 indican una cinética de degradación lineal de las muestras almacenadas a pH 5, sin embargo se observa que el extracto MPCC tuvo una constante de degradación más grade que el extracto MPCR, como lo muestra la tabla 13.

Gráfica 15: Comportamiento del extracto MPCC almacenado a 4°C y a pH 5



Gráfica 16: Comportamiento del extracto MPCR almacenado a 4°C y a pH 5



La degradación de los extractos a 4°C se vió afectada principalmente por el pH, a pH 3 los extractos son mucho más estables que a pH 5 como indican las constantes de degradación (Tabla 12), además se puede observar que el tiempo de vida medio del extracto MPCC es menor en comparacion con el extracto MPCR; la principal causa de este comportamiento es la presencia de compuestos

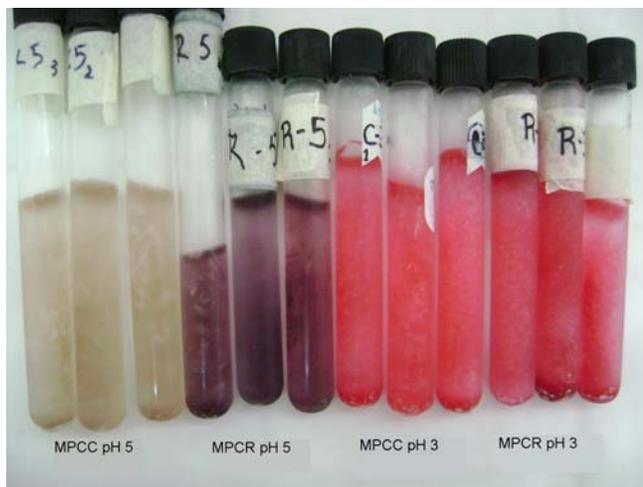
que pueden acelerar la degradación en el extracto MPCC, sin embargo, el pH es la principal causa de degradación siendo a pH 3 los extractos más estables.

Tabla 12: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) a 4°C y pH 3 y 5.

Extracto	pH	Temperatura	$k \times 10^{-3}$	$t_{1/2}$ (min)
MPCR	3	4 °C	2,2	315,07
	5	4 °C	3,5	198,04
MPCC	3	4 °C	4,9	141,46
	5	4 °C	36,9	18,78

En otras palabras, este comportamiento se debe a la alta estabilidad del catión flavilio una de las estructuras de las antocianinas que prevalece a valores de pH bajos y que produce un llamativo color rojo el cual se mantiene durante todo el periodo de almacenamiento, la estructura primordial a pH 5 es la pseudo base carbinol que es menos estable, esta estructura produce un color violeta el cual cambia a colores no deseados como se indica en la ilustración 3.

Ilustración 3: Muestras sometidas al almacenamiento a 4°C y a pH 5 y pH 3.

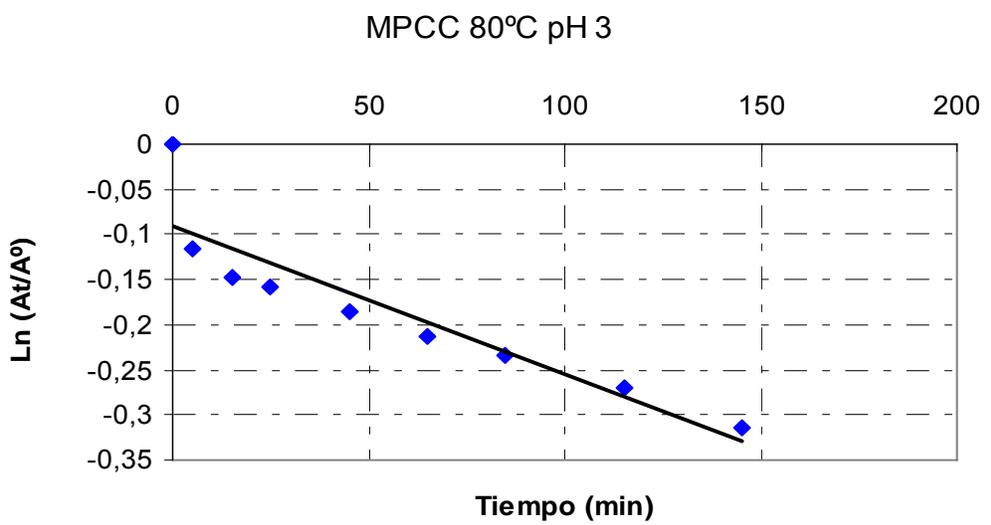


4.6.4 Estabilidad de las antocianinas durante el calentamiento

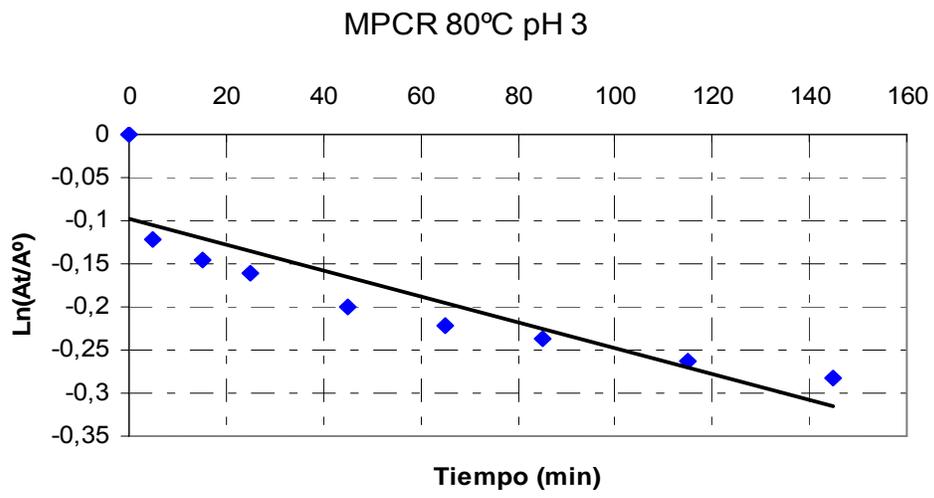
La estabilidad térmica del extracto MPCC y MPCR a pH 3 siguió una cinética de primer orden para ambos extractos, las gráficas que se presentan a continuación indican que los extractos antocianínicos soportan muy bien el calentamiento a pH 3, debido a la estabilidad proporcionada por el catión flavilio. Las constantes y los

tiempos de vida media encontrados para ambos extractos (tabla 13) indican la alta resistencia a la degradación por calentamiento y un tiempo de vida media muy extenso 462,10 minutos para el MPCR y 407,73 minutos para MPCC a pH 3, resultado muy alentador que permitiría el uso de estos pigmentos naturales en la industria alimenticia. Al comparar la pendiente de las gráficas 17 y 18 se puede observar un comportamiento similar en la degradación de los extractos MPCC y MPCR lo que indica que el proceso de refinamiento del extracto influye en una baja proporción a la estabilidad del mismo, por lo tanto a nivel industrial sería un proceso injustificado y costoso, debido a la alta estabilidad del extracto crudo

Gráfica 17: Comportamiento del extracto MPCC durante el calentamiento a pH 3.

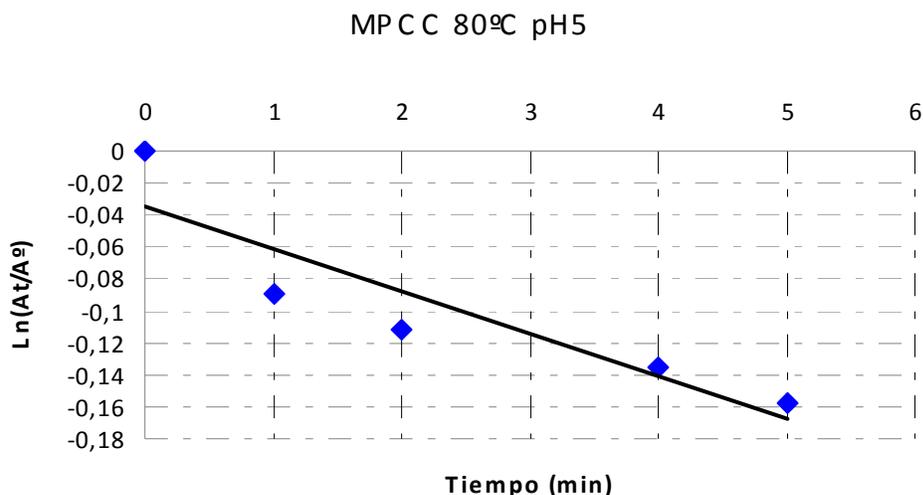


Gráfica 18: Comportamiento del extracto MPCR durante el calentamiento a pH 3

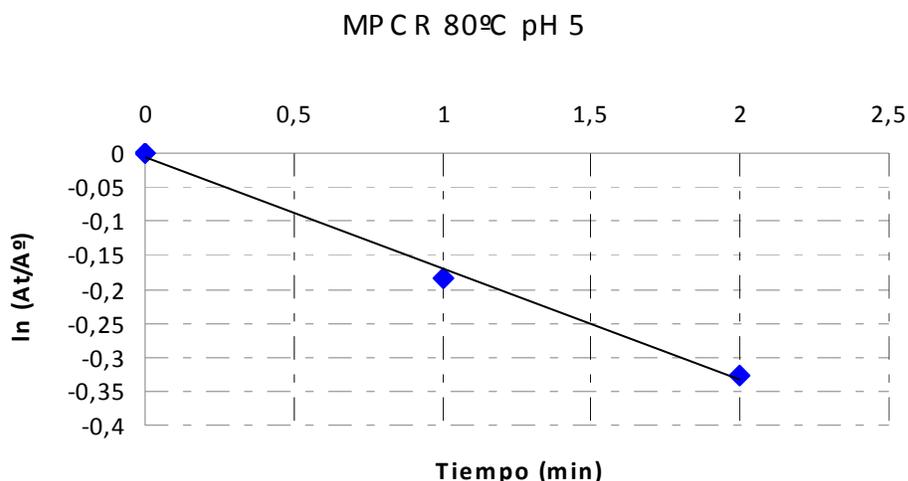


De igual forma, la degradación de los pigmentos antociánicos a pH 5 muestra una cinética de primer orden como lo muestran las graficas 19 y 20. El resultado obtenido indica la incidencia directa del pH en la estabilidad de los pigmentos antociánicos, mostrando tiempos de vida media muy cortos 4.24 minutos para MPCR, 26.16 para MPCC y constantes de degradación altas, se puede observar que a pH 5 los extractos no son estables y no resultaría conveniente usar pigmentos a valores de pH medianamente ácidos como por ejemplo en el rango entre pH 4-7 y mucho menos valores superiores.

Gráfica 19: Comportamiento del extracto MPCC durante el calentamiento a pH 5



Gráfica 20: Comportamiento del extracto MPCR durante el calentamiento a pH 5



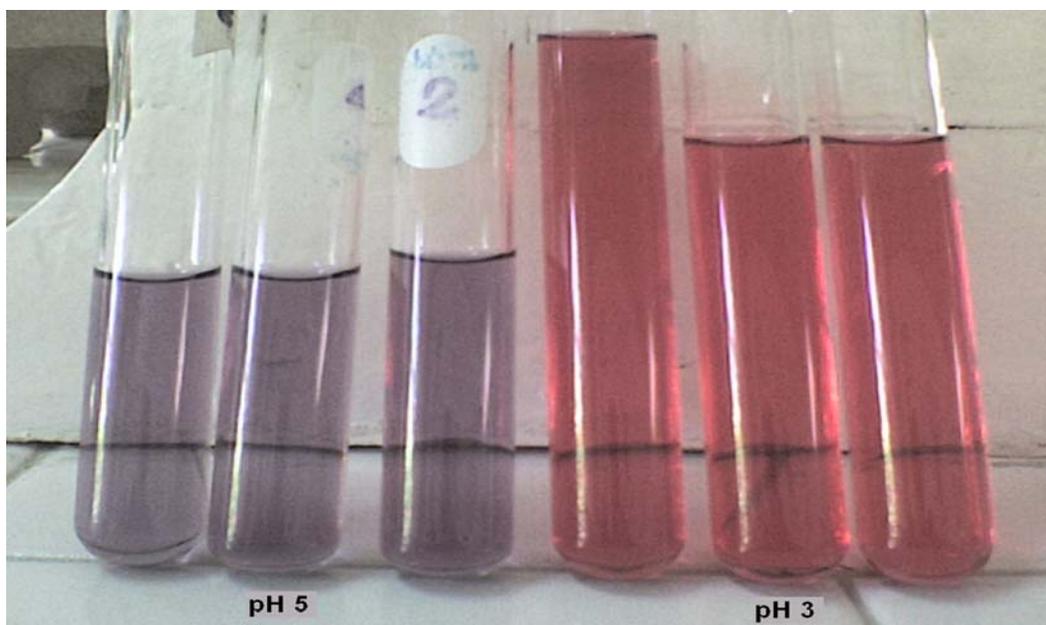
Las constantes de degradación y los tiempos de vida media de los extractos a pH 3 y 5 (ver tabla 13), muestran que el pH es el factor más significativo en la

estabilidad de los pigmentos antociánicos, se puede observar que las antocianinas son altamente estables a pH 3 y enormemente lábiles a pH 5 (Ilustración 4), el proceso de refinamiento no afecta de manera crucial la estabilidad al calentamiento de los extractos antociánicos.

Tabla 13: Constantes de degradación ($k \times 10^{-3}$) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) durante el calentamiento a pH 3 y 5

Extracto	pH	Temperatura	$k \times 10^{-3}$	$t_{1/2}$ (min)
MPCR	3	80°C	1,5	462,10
	5	80°C	163.5	4.24
MPCC	3	80°C	1,7	407,73
	5	80°C	26.5	26.16

Ilustración 4: Aspecto de los extractos antociánicos después de ser sometidos al calentamiento (MPCC)



Las pruebas realizadas respecto a la estabilidad frente al calentamiento de los pigmentos extraídos del motilón (*Hyeronima macrocarpa*) son de gran importancia para la investigación debido a que los resultados otorgan información útil para el posible uso de estos compuestos como aditivo natural, debido a que en el procesamiento de alimentos en la industria requiere calentamiento de las matrices alimenticias para fines de higiene, tal es el caso de la pasteurización que hoy en día es un proceso obligado para los productos líquidos como bebidas, productos congelados y lácteos, por esta razón es indispensable que los aditivos como

colorantes conserven sus propiedades organolépticas después de un calentamiento severo; teniendo en cuenta estos aspectos los resultados obtenidos después de las pruebas de calentamiento mostraron que los pigmentos extraídos de esta fruta son altamente estables. Estos extractos presentan mayor estabilidad a pH 3 y mantienen sus propiedades organolépticas como el color después de un calentamiento prolongado. Los extractos sometidos al calentamiento a pH 5 no presentan buena estabilidad debida a que la estructura predominante es la base carbinol, y pierden sus propiedades organolépticas en un lapso corto de tiempo.

CONCLUSIONES

En los extractos obtenidos del fruto del motilón se encontraron características que le otorgan propiedades de tipo nutracéutico, tales características como el elevado contenido de fenoles, antocianinas y su buena capacidad antioxidante, son resultados muy altos comparados con los obtenidos en otros frutos.

Se encontró que por cada 100 g de pulpa se hallan 275.5 mg de antocianinas, este valor fue muy alto al ser comparado con otras fuentes alimenticias. Así mismo, la cantidad de fenoles encontrados en la fruta fue también alta, este valor fue comparado con los datos encontrados para la capacidad antioxidante, los cuales correlacionaron muy bien. Los valores de TEAC indicaron que para el extracto MPCC la capacidad antioxidante es mucho menor que para el extracto MPCR.

La resistencia frente a la degradación de los extractos del fruto del motilón en las diferentes pruebas realizadas se ve enormemente mejorada debido al proceso de refinamiento realizado.

El factor mas determinante en la estabilidad del extracto del fruto del motilón es el pH, se encontró que para valores de pH cercanos a 3 el extracto es altamente estable y que a valores de pH superiores como a pH 5 los extractos presentan baja estabilidad; además se observó que factores físicos como la luz y el aire afectan la estabilidad de los extractos en menor proporción que el pH.

También se observó que cuando se someten los extractos a la exposición simultánea de factores físicos como la luz y el aire los extractos del motilón se degradan más rápidamente que a la exposición de un solo factor.

Se pudo observar que las muestras refinadas (MPCR) presentaron mayor estabilidad que las muestras crudas (MPCC) al comparar los tiempo de vida media y las constantes de degradación, esto se debe principalmente a la presencia de otros metabolitos secundarios, tales como azúcares y ácidos orgánicos que influyen negativamente en la estabilidad de los compuestos coloreados de MPCC.

Los extractos obtenidos del fruto del motilón presentaron una alta estabilidad al calentamiento a 80°C siempre y cuando se contenga en una solución a pH 3, de igual forma a este mismo pH los extractos son altamente estables a 4°C.

RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores sobre pigmentos naturales se recomienda el uso del método colorimétrico CIELAB, con el objetivo de precisar el tipo de color obtenido.

Se recomienda realizar análisis in-vivo de la capacidad antioxidante para evidenciar las posibles propiedades terapéuticas que el fruto pueda tener.

Para estudios de estabilidad de pigmentos naturales se recomienda usar métodos de extracción de pigmentos donde no se emplee solvente o sustancias que puedan tener efectos nocivos a la salud humana

También se recomienda estudiar este pigmento en matrices como leche, yogurt, etc.

BIBLIOGRAFÍA

- BASU, Purmina. CHAND Surech. Anthocyanin accumulation in *Hyoscyamus mutis* L. Tissue cultures. *Journal of Biotechnology*. 52, 151-159 (1996)
- BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C.; Anthocyanins as natural food colours – select aspects. *Food Chemistry*. 58, 103-109, 1997
- BORDIGNON, L.; GAUCHE, C.; Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *Swiss Society of Food Science and Technology*. 02.022. (2006)
- CABRITA, Luis; FROYSTEIN, Nils; Anthocyanin trisaccharides in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Food Chemistry*. 69, 33-36 (2000)
- CAO, Guohua; SOFIC Emin. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure –Activity Relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 22 N°5 749-760 (1997)
- CLYDESDALE, F. M., MAIN, J. H., FRANCIS, F. J., y DAMON R.A., concord grape pigments as colorants for beverages and gelatin desserts. *J. food Sci.*, 43, 1687 (1978)
- DARAVINGAS, G. y CAIN, R. F., changes in the antocyanin pigments of raspberries during procesing and storage, *J. food Sci.*, 30, 400 (1965)
- EICHHORN, S.; WINTERHALTER P.; Anthocyanins from pigmented potato (*Solanum tuberosum* L.) varieties. *Food Research International*. 38, 943–948 (2005)
- FRANCIS, F. food colorants: anthocyanins. Department of food Science and nutrition. University of Massachusetts. Volume 28, Issue 4 (1989)
- GIUSTI, Monica, WROLSTAD Ronald., Characterization and measurement of anthocianyns by UV-visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry F1.2.1 – F1.2.13* (2001)
- GIUSTI, Monica., WROLSTAD Ronald., Acylated anthocyanins from edible sources an their applications in food systems. *Biochemical engineering Journal* 14 217-225. (2003)

GRIS, E.; FERREIRA E.; Caffeic acid copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts in model systems. *Food Chemistry*. 010-014 (2005)

HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J. Free radicals in biology and medicine. New York, Oxford University Press. Tercera Edición. (1999).

JANNA, A. KHAIRUL A. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. *Food Chemistry*. FOCH 5523. (2006)

KAUFMAN, meter. CSEKE, Leand. Natural Products from Plants. *Crs Press*. United states of America, pag 65-67, 1998

KIRCA Aysegu, MEHMET Ozkan. CEMEROGLU Bekir., Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars, *Food Chemistry*, 598–605 (2006)

KIRCA Aysegu, MEHMET Ozkan. Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. *Food Chemistry*. (2006)

KURESH A., McDONALD Jane. Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults *Journal of Nutritional Biochemistry* 13 282–288 (2002)

KUSKOSKI. Marta, ASUERO. Agustín. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 24(4): 691-693, (2004)

KUSKOSKI. Marta, ASUERO. Agustín. Aplicación de Diversos Metodos Quimicos para determinar la Actividad Antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 25(4): 726-732, (2005)

KUSKOSKY Marta, VEGA, Jose. Characterization of Anthocyanins from the Fruits of Baguacu (*Eugenia umbellifera* Berg). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 5450-5454, (2003)

LEE, Hyoung S. HONG, Victor. Chromatographic analysis of anthocyanins, *Journal of Chromatography*, 624, 221–234. (1992)

MACRAE R., ROBINSON R., SADLER, M. Encyclopedia of Food Science Food Technology and Nutrition. Catering – Down's Syndrome. Academic press. Volumen dos.

MANACH Claudin, SCALBERT Agustin. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*; 79, 727–47. 2004

MARIKEN J.T.J., DALLINGA J. Sebastian, A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry Analytical, Nutritional and Clinical Methods Section* 80 409–414 (2003)

MARTÍNEZ, GONZÁLEZ Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria. Nutr. Hosp.* XVII (6) 271-278 (2002)

MATSUMOTO Hitoshi, NAKAMURA Yuko. Comparative assessment of distribution of blackcurrant anthocyanins in rabbit and rat ocular tissues. *Experimental eye research.* 83 348-356 (2006)

MONTORO Paola., TUBEROSO Carlo. Stability and antioxidant activity of polyphenols in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 0731-7085 (2006)

NAKAJIMA, Jun-ichiro., TANAKA, Ippei., LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 241–247 (2004)

NEBESKY, E. A., ESSELEN. Stability of color in fruit juices. *Food res.*, 14, 261 (1949)

PAZMINO, DURAN, A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. *Food Chemistry*, 75, 211-216 (2001)

RE, Roberta., PELLIGRINI, Nicoleta., Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, Nos. 9/10, pp. 1231–1237, 1999

REYES L., CISNEROS-ZEVALLOS L.. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple and red – flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). *Food Chemistry.* (2005)

RODRIGUEZ-SAONA,. Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems. *Journal of Food Science*, 64(3), 451–456 (1999).

RUBINSKIENE M., VISKELIS P. Impact of various factors on the composition and stability of black currant anthocyanins. *Food Research International* 38 867–871 (2005)

SCHWARZ Michael, HILLEBRAND Silke. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal* 3705, 1–11(2003)

- SCORDINO, Monica. DI MAURO, Alfio. Adsorption of Flavonoids on Resins: Cyanidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 1965-1972 (2004)
- SHIMOI, Kayoco; MASUDA Shuichi;. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Fundamental and molecular mechanisms of Mutagenesis*. 350, 153-161 (1996)
- SLINKARD, K. SINGLETON, V. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55. (1977)
- STINTZING, Florian., TRICHTERBORN, Jan., Characterisation of anthocyanin–betalain mixtures for food colouring by chromatic and HPLC-DAD-MS analyses. *Food Chemistry* 94 296–309 (2006)
- TORSKANGERPOLL Kjell, ANDERSEN Oyvind. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry* 89 427–440 (2005)
- TRESSLER, D. K. y PEDERSON, C.S. preservation of grape juice. II factors controlling the rate of deterioration of bottled concord juice. *Food res.*, 1, 87 (1936)
- TYRAKOWSKA Bożena, SOFFERS Ans., SZYMUSIAK Henryk, TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 27, Nos. 11/12, pp. 1427–1436, (1999)
- TÜRKER, Nüzhet; ERDOĞDU Ferruh; Effects of pH and temperature of extraction medium on effective diffusion coefficient of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* var. L.) *Journal of Food Engineering* 76 579–583 (2006)