

ESTUDIO QUÍMICO DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES EN EL
FRUTO DEL MOTILON (*Hieronima macrocarpa*)

JUAN PABLO JIMENEZ MORA
JOHN HENRY VILLARREAL LATORRE

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

ESTUDIO QUÍMICO DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES EN EL
FRUTO DEL MOTILON (*Hieronima macrocarpa*)

JUAN PABLO JIMENEZ MORA
JOHN HENRY VILLARREAL LATORRE

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

DIRECTORES:

NELSON H. HURTADO G., Ph. D.
SILVIA CRUZ S., Ph. D.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2008

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

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

Nota de Aceptación:

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2008.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores: Nelson Hurtado y Silvia Cruz, directores del grupo de investigación en productos de importancia biológica (GIPIB) (Universidad de Nariño), por habernos orientado en el transcurso de esta investigación.

A la Vicecancillería de Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) (Universidad de Nariño), por la financiación del proyecto.

A los grupos de investigación, entidades y amigos, que brindaron su apoyo durante el desarrollo de este trabajo:

Grupo de investigación en compuestos Heterocíclicos (Universidad de Nariño)

Grupo Aditivos Naturales de Aroma y Color (GANAC) (Universidad Nacional de Colombia)

Grupo de investigación en Productos Naturales Vegetales (Universidad Nacional de Colombia)

Asociación para el desarrollo Campesino (ADC) (Nariño)

Ángel Zamora, Juan Pablo Torres, David Arturo, Fabio Benavides y demás compañeros.

DEDICATORIA

Seres que grabaron sus iniciales en mi cabeza
Azucenas que toman mi mano con delicadeza
Imágenes especulares de gallardía en la adversidad
Luces de colores que atenuaron la oscuridad
Espíritu que ondea la bandera de su integridad

Épico el esfuerzo que regalaron para mi felicidad
Santos quienes emularon el milagro de la bondad
Océanos henchidos de gracia cantan con alegría:
Juntos dejamos las huellas que bailan de noche y de día.

A mi magna familia:

Carlos, Fanny, Daniela, Carlín, Eliza, Aleja, Natalia, Sebastián, Marisol, José Luís
y...

Recuerden que nunca saldrán de mi ventrículo derecho.

John Henry Villarreal Latorre

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la persona que ha estado, esta y seguirá estando a mi lado, a su amor y su apoyo, por ser inspiración de todo el proceso que hoy se conoce como mi vida, te dedico este trabajo por que aun lejos sigues estando en mi...

Gracias Mamá.

Juan Pablo Jiménez Mora

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. OBJETIVOS	22
1.1 OBJETIVO GENERAL	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
2. ANTECEDENTES	23
2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTAS	24
2.2 FLAVONOIDES	25
2.3 PIGMENTOS NATURALES	28
2.3.1 Clorofila	28
2.3.2 Carotenoides	29
2.3.3 Betalaínas	30
2.3.4 Pigmentos generados por la reacción de Maillard	31
2.4 ANTOCIANINAS	31
2.4.1 Estructura Química	32
2.4.2 Biosíntesis	35
2.4.3 Estabilidad	36
2.4.3.1 Factores estructurales	37
2.4.3.2 Influencia del pH	37
2.4.3.3 Acción de la temperatura	38
2.4.3.4 Influencia de la luz	38

2.4.3.5 Efecto del oxígeno	38
2.4.3.6 Influencia de iones metálicos	39
2.4.3.7 Efecto de los glicósidos	39
2.4.3.8 Interacción del ácido ascórbico	39
2.4.3.9 Reacciones enzimáticas	39
2.4.3.10 Copigmentación	39
2.5 PIGMENTOS NATURALES COMO COLORANTES	40
2.6 RADICALES LIBRES, ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS	41
2.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA	43
2.7.1 Métodos de extracción, separación y purificación de antocianinas	43
2.7.2 Métodos de detección y caracterización de antocianinas	44
2.7.2.1 Espectroscopía Ultravioleta–visible (Uv-vis)	44
2.7.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética protónica ¹ H	45
2.7.2.3 Espectrometría de masas	46
2.7.3 Métodos de determinación de actividad antioxidante	46
2.7.4 Otros métodos de análisis	48
2.7.4.1 Fenoles totales	48
2.7.4.2 Antocianinas monoméricas totales	48
2.7.4.3 Color polimérico	49
3. METODOLOGÍA	50
3.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	50
3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PULPA	50

3.2.1 Obtención de un extracto rico en polifenoles	50
3.2.2 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas	51
3.3 ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	51
3.4 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MAYORITARIAS	51
3.5 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	52
3.6 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES	52
3.7 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS	53
3.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	53
3.8.1 Método ABTS	53
3.8.2 Método DPPH	54
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE DE LA PLANTA	56
4.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA	57
4.3 SEPARACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS MAYORITARIAS	59
4.4 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	63
4.5 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES Y COLOR POLIMÉRICO	65
4.6 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MAYORITARIAS	66
4.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN-VITRO</i>	73
4.7.1 Método ABTS	73
4.7.2 Método DPPH	75
4.8 COMPARACIÓN ENTRE LA PULPA DEL MOTILÓN Y OTROS FRUTOS	85

5. CONCLUSIONES	88
6. RECOMENDACIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Efecto del pH en el color de un extracto de pulpa de Motilón	23
Figura 2. Espectro Uv-vis de un extracto de pulpa de Motilón	24
Figura 3. Clasificación de los compuestos fenólicos	25
Figura 4. Estructura básica de un flavonoide y sistema de numeración	26
Figura 5. Estructuras generales de los diferentes tipos de flavonoides	26
Figura 6. Posiciones comunes para la hidroxilación y la metoxilación	27
Figura 7. Sitios de O-glicosidación	27
Figura 8. Ejemplos de O-glicosidación y C-glicosidación	27
Figura 9. Estructura de las clorofilas a, b, d y c1, c2	29
Figura 10. Estructura química de algunos carotenos	30
Figura 11. Estructura química de las betalaínas	31
Figura 12. Estructura de antocianidinas (agliconas) comunes	32
Figura 13. Estructura química de antocianinas comunes	33
Figura 14. Estructuras de azúcares más comunes en antocianinas	33
Figura 15. Ácidos alifáticos y aromáticos en antocianinas	34
Figura 16. Estructura de la Antocianina: cianidina 3-[(2''-(6-cafeoil)-glucosil)-6''-(coumaroil)-glucosido]- 5-(6''-(metilmalonil)-glucósido)	35
Figura 17. Biosíntesis de antocianidinas	36
Figura 18. Variación estructural de antocianinas al cambiar el pH	38
Figura 19. Tipos de copigmentación en antocianinas	40
Figura 20. Clasificación de los antioxidantes	42
Figura 21. Estructura del ABTS	47
Figura 22. Estructura del radical DPPH	47
Figura 23. Árbol de Motilón (<i>Hyeronima macrocarpa</i>)	56
Figura 24. Maceración de la pulpa de Motilón	57
Figura 25. Ausencia de antocianinas en el residuo naranja obtenido en la elución con agua	58
Figura 26. Elución y concentración del extracto MPX	58
Figura 27. Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas	59
Figura 28. Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto MPX	60
Figura 29. Espectros de absorción UV-vis de los picos: b y c del extracto MPX	60
Figura 30. Espectro de absorción UV-vis del pico: a del extracto MPX	61
Figura 31. Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto MPM	62
Figura 32. Perfil cromatográfico de la de separación isocrática	63
Figura 33. Espectro Uv-vis de la antocianina b	67
Figura 34. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) del extracto MPX	67
Figura 35. Espectro de masas de la antocianina b del extracto MPX	68
Figura 36. Espectro de masas de la antocianina c del extracto MPX	68
Figura 37. Espectro de masas de la antocianina d del extracto MPX	69

Figura 38. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) del extracto MPM	69
Figura 39. Espectros de masas de las antocianinas presentes en el extracto MPM	70
Figura 40. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) de la fracción c	72
Figura 41. Espectros de masas de las antocianinas mayoritarias de la fracción FC	72

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Curva de calibración para determinación de fenoles totales con ácido gálico	64
Gráfico 2. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante en TEAC	74
Gráfico 3. Curva de absorbancia vs. Concentración de DPPH [•]	76
Gráfico 4. Curva para determinar el E_{c50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico	76
Gráfico 5. Curva para determinar el T_{Ec50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico	77
Gráfico 6. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido ascórbico Frente al radical DPPH [•]	78
Gráfico 7. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido gálico frente al radical DPPH [•]	78
Gráfico 8. Comportamiento del extracto MPC frente al radical DPPH [•]	80
Gráfico 9. Comportamiento del extracto MPX frente al radical DPPH [•]	80
Gráfico 10. Comparación del % inhibición en concentraciones similares de los extractos MPC y MPX	81
Gráfico 11. Comportamiento de la Dp-3-cum-hex frente al radical DPPH [•]	83
Gráfico 12. Comportamiento de la fracción FC frente al radical DPPH [•]	83
Gráfico 13. Comportamiento de la Pt-3-hex-hex frente al radical DPPH [•]	84
Gráfico 14. Fenoles totales presentes en la pulpa de varios frutos	86
Gráfico 15. Comparación de los antocianos totales del Motilón con los de frutos conocidos	87
Gráfico 16. Comparación de la actividad antioxidante de varios frutos	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Pigmentos naturales permitidos por la Comunidad Económica Europea	41
Tabla 2. Algunos desplazamientos químicos de protones presentes en las antocianinas	46
Tabla 3. Tiempos de retención en las antocianinas de los extractos MPX y MPM	61
Tabla 4. Resultados de la prueba de Folin Ciocalteu con patrones de ácido gálico	63
Tabla 5. Contenido de fenoles totales de los extractos MPC y MPX	64
Tabla 6. Contenido de antocianinas monoméricas totales en los extractos estudiados	65
Tabla 7. Porcentaje de color polimérico en los extractos estudiados	66
Tabla 8. Parámetros de espectroscopia Uv-vis en las antocianinas mayoritarias de la pulpa del fruto de Motilón	66
Tabla 9. Resultados de la prueba ABTS con patrones de trolox	73
Tabla 10. Resultados de TEAC en los extractos estudiados y en el patrón de ácido ascórbico	74
Tabla 11. Resultados de TEAC en las antocianinas aisladas y en la fracción FC	75
Tabla 12. Valores de absorbancia determinados En varias Concentraciones de DPPH*	75
Tabla 13. Eficiencia anti-radical en ácido ascórbico y gálico	77
Tabla 14. Eficiencia anti-radical en los extractos MPC y MPX	79
Tabla 15. Eficiencia anti-radical en las antocianinas monoméricas aisladas del fruto de Motilón y en la fracion FC	82
Tabla 16. Relaciones matemáticas para el cálculo de los parámetros Ec_{50} , T_{Ec50} en las antocianinas aisladas de la pulpa del Motilón y en la fracción FC	85
Tabla 17. Contenido de fenoles totales, antocianas totales y capacidad antioxidante de varios frutos	86

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs: Absorbancia
ABTS: 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)
CLAE: cromatografía líquida de alta eficiencia
CLAE-DAD: cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos
CLAE-EM: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
Cy-3-glu: cianidina-3-glucósido
Cy-3-hex-5-hex: cianidina-3-hexosa-5-hexosa
Cy-3-hex-hex: cianidina-3-hexosa-hexosa
CV: coeficiente de variación
DE: desviación estándar
Dp-3-glu: delphinidina-3-glucósido
Dp-3-cum-hex: delphinidina-3-cumaroil-hexosa
DPPH: 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo
FC: fracción rica en derivados de la cianidina
FT: fenoles totales
MPC: Extracto de pulpa crudo
MPM: Extracto de pulpa rico en antocianinas monoméricas
MPP: Extracto de pulpa rico en antocianinas poliméricas
MPX: Extracto de pulpa rico en antocianinas
Mv-3-glu: malvinidina-3-glucósido
m/z: Relación masa/carga
Pg-3-glu: pelargonidina-3-glucósido
Pn-3-glu: peonidina-3-glucósido
Pt-3-glu: petunidina-3-glucósido
Pt-3-hex-hex: petunidina-3-hexosa-hexosa
RMN: resonancia magnética nuclear
TEAC: Equivalentes trolox de capacidad antioxidante
Tr: Tiempo de retención

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Diagrama de flujo para la obtención de los 4 extractos estudiados a partir del fruto de Motilón (<i>Hyeronima macrocarpa</i>)	98
Anexo B. Procedimiento para la determinación de fenoles totales	99
Anexo C. Procedimiento para la determinación Antocianinas monoméricas totales	100
Anexo D. Procedimiento para la determinación de color polimérico	100
Anexo E. Procedimiento para el método ABTS	101
Anexo F. Procedimiento para el método DPPH*	102
Anexo G. Cromatogramas del extracto rico en antocianinas Poliméricas MPP	103

RESUMEN

El fruto del árbol de Motilón dulce (*Hyeronima macrocarpa*), tiene una pulpa de color púrpura, la cual fue procesada por técnicas como la extracción con solventes, cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia, con el fin de obtener extractos y aislar antocianinas, que posteriormente se utilizaron para estudiar el contenido fenólico, antociánico, su capacidad antioxidante y eficiencia antirradical *in-vitro* con los radicales 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}) y 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]). Por medio de un análisis de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas (CLAE-EM) y espectroscopia Uv-vis, se sugirió la posible estructura de 3 antocianinas mayoritarias aisladas de la pulpa del fruto: delphinidina-3-cumaroil-hexosa, cianidina-3-hexosa-hexosa y petunidina-3-hexosa-hexosa, además de encontrar derivados de todas las antocianidinas comunes con excepción de la pelargonidina. Los resultados obtenidos permitieron realizar una comparación de la pulpa de Motilón con la de otras frutas reconocidas por su valor alimenticio, concluyendo sobre la riqueza en pigmentos que posee la pulpa y los posibles beneficios que el Motilón puede traer a la salud humana, al hacerlo parte de la dieta.

ABSTRACT

The fruit of Motilón dulce (*Hieronima macrocarpa*) has a purple pulp; this pulp was processed by techniques like solvent extraction, column chromatography and high performance liquid chromatography to obtain extracts and to isolate monomeric anthocyanin, the extracts were used to study the phenolic and anthocyanic content, antioxidant capacity and anti-radical efficiency *in-vitro*, using the free radicals 2,2-azobis-(3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) y 2,2-diphenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]). With the High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS) and Uv-vis spectroscopy analysis, it was suggested the possible structure for three monomeric anthocyanins: delphinidin-3-cumaroil-hexose, cyanidin-3-hexose-hexose and petunidin-3-hexose-hexose. Also derivatives of all common anthocyanidins, except the pelargonidin was found. The obtained results allowed making a comparison between the pulp of Motilón and other fruits recognized by its nutritional value, concluding about the pigments richness in the pulp and about the possible benefits that the Motilón can bring to human health if it is implemented in diet.

INTRODUCCIÓN

En el municipio de El Encano (Nariño), crece un árbol conocido como Motilón dulce (*Hyeronima macrocarpa*) el cual posee frutos con pulpa y cáscara de color púrpura cuando se encuentran en estado maduro. El abundante color característico de la pulpa estimuló el interés por realizar un estudio de la composición química de las sustancias responsables de su color, debido a la gran aplicación de los colorantes naturales en la industria alimenticia.

Por medio de ensayos preliminares, se identificó la presencia de compuestos tipo antocianina en la pulpa del Motilón. Estas moléculas son conocidas como los metabolitos secundarios responsables de los colores rojo, azul y púrpura en flores, frutos y otras partes de las plantas. Esta coloración es de gran importancia biológica, al estar involucrada en los mecanismos de su reproducción atrayendo insectos que favorecen la polinización. Además este tipo de moléculas tienen la función de inhibir la oxidación de biomoléculas, ayudan a la conservación de alimentos y defienden a los seres vivos contra los procesos de oxidación, al ser excelentes captadores de radicales libres (Rodríguez 2001).

Se utilizaron métodos como la extracción con solventes y la cromatografía en columna para obtener varios extractos, de gran utilidad en el estudio de los pigmentos de la pulpa del fruto. La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) permitió aislar dos antocianinas mayoritarias, y los datos de esta técnica, junto con los de espectroscopía Uv-vis y espectrometría de masas, suministraron información para sugerir sus posibles estructuras moleculares.

La presente investigación es una contribución al conocimiento científico, sobre la composición química de los pigmentos tipo antocianina que posee la pulpa del Motilón. Los estudios realizados no solo permitieron sugerir la estructura de varias antocianinas monoméricas presentes en la pulpa, sino también llevar a cabo un análisis del contenido fenólico en general, la actividad antioxidante y la eficiencia anti-radical de la pulpa del fruto, aportando de esta manera una base para estudios de las posibles aplicaciones en el campo industrial, alimenticio y de la salud. Adicionalmente se comparó el contenido fenólico, antociánico y la actividad antioxidante de la pulpa de este fruto con la de otros frutos de gran valor alimenticio, mostrando la importancia de los compuestos fenólicos presentes en el fruto, que ha sido poco valorado como alimento y de baja utilización en procesos industriales.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar, purificar e identificar los pigmentos tipo antocianina mayoritarios, presentes en la pulpa del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*) y determinar su actividad antioxidante y eficiencia anti-radical *in-vitro*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Aislar y purificar los pigmentos mayoritarios tipo antocianina presentes en la pulpa del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*) haciendo uso de técnicas como la extracción con solventes, cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

Determinar el contenido fenólico y antociánico por medio de las técnicas: Folin Ciocalteau, pH diferencial y pH sustractivo en extractos obtenidos de la pupa del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*).

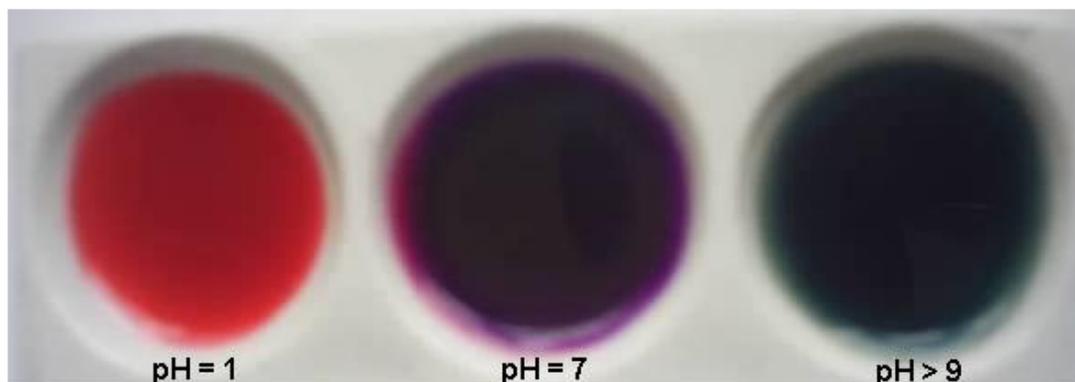
Proponer las posibles estructuras de las antocianinas mayoritarias presentes en la pulpa del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*) por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) y espectroscopía Uv-vis.

Determinar la actividad antioxidante y eficiencia anti-radical *in-vitro* de los distintos extractos obtenidos en la purificación de las antocianinas mayoritarias presentes en la pulpa del Motilón (*Hyeronima macrocarpa*) y en los compuestos aislados, por medio de los radicales: 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) (ABTS^{•+}) y 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]).

2. ANTECEDENTES

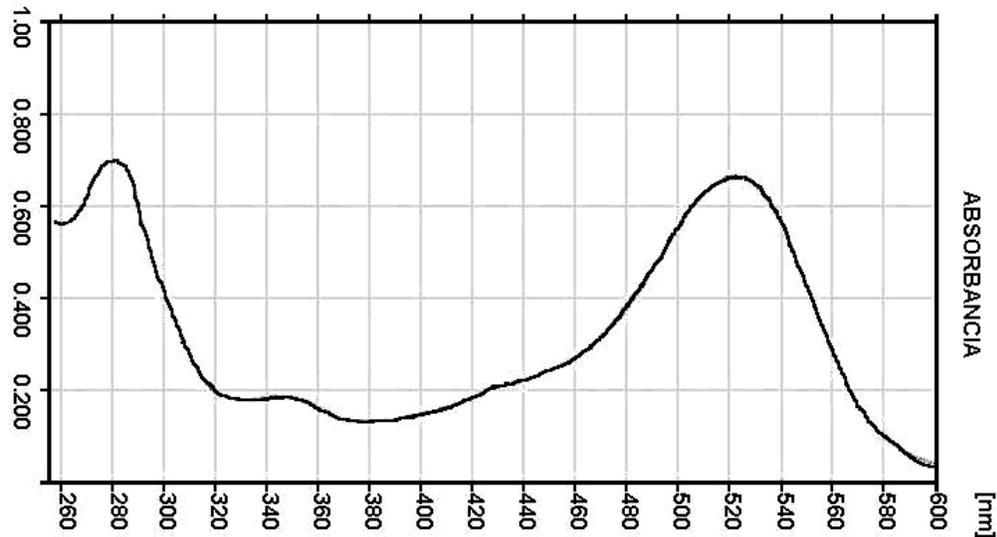
El fruto del Motilón dulce (*Hyeronima macrocarpa*) ha sido consumido por la comunidad Nariñense en bajas cantidades, pese a su sabor agradable. La pulpa del fruto tiene un color púrpura, que llevó a pensar en la presencia de antocianinas como los pigmentos responsables de su coloración característica. Estos pigmentos tienen la propiedad de modificar su color frente a variaciones de pH a causa de cambios estructurales (Darren 2005). Por esta razón, como una primera aproximación acerca de la presencia de antocianinas en la pulpa del fruto, se tomó un extracto directamente de la pulpa, el cual fue sometido a variaciones de pH por medio de soluciones de NaOH (0,00002 M, pH>9) y HCl (0,1 M, pH=1). A pH neutro el extracto conservó su color natural, en medio ácido cambió a un color rojo brillante y, un color verde oscuro fue observado en medio básico (figura 1).

Figura 1. Efecto del pH en el color de un extracto de pulpa de Motilón.



La presencia de antocianinas en la pulpa del Motilón fue confirmada al realizar un barrido Uv-vis de una solución acuosa (2% v/v) preparada a partir del extracto natural, observándose una banda a 520 nm, característica de los pigmentos tipo antocianina (Harborne 1975) (figura 2).

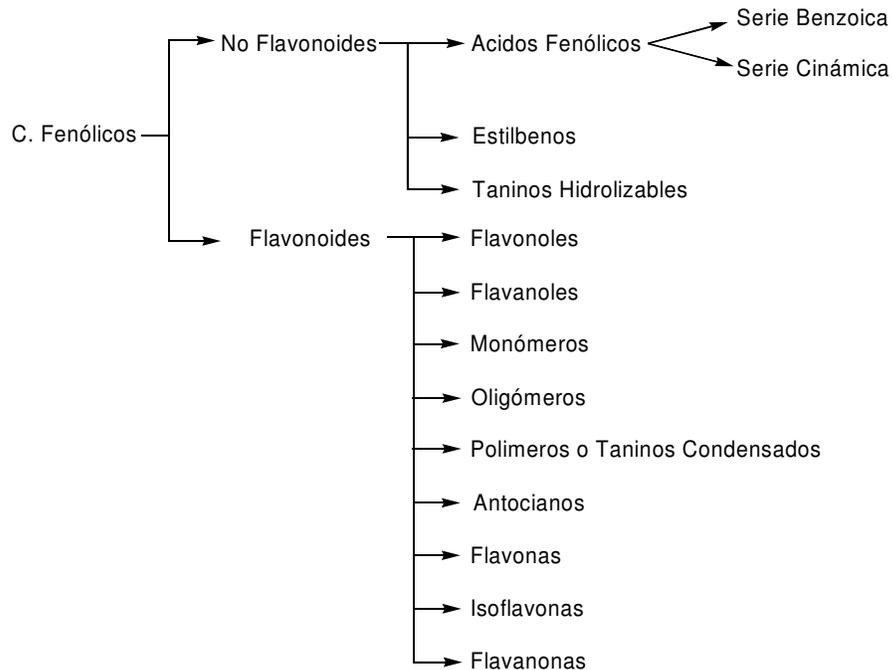
Figura 2. Espectro Uv-vis de un extracto de pulpa de Motilón.



2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS EN LAS PLANTAS

Los compuestos fenólicos son sustancias que se encuentran en las plantas como productos del metabolismo secundario. Poseen anillos aromáticos sustituidos por grupos hidroxilo y derivados funcionales de ésteres, metilésteres, glicósidos, etc. Existe una gran variedad que va desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta la formación de polímeros. La mayoría tienen una estructura química que les permite donar protones o electrones, lo cual les confiere propiedades antioxidantes (Kinsella 1993). Comúnmente, estos metabolitos se encuentran en forma de glicósidos solubles en agua y solventes orgánicos (Shahidi 1995). Actualmente este grupo de compuestos presentan un gran interés gracias a su actividad biológica. Además, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, son asociadas a la presencia de compuestos fenólicos (Martínez 2000). Se pueden clasificar en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (figura 3). Dentro de los cuales existen divisiones que difieren entre sí por varios factores como la estructura química de la molécula, el grado de oxidación de sus componentes etc. (García 2005).

Figura 3. Clasificación de los compuestos fenólicos (Modificado de García 2005).



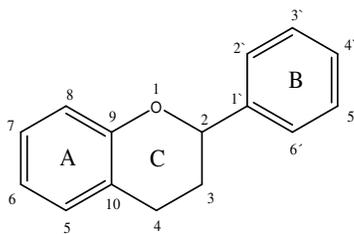
2.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son sustancias fenólicas que se han aislado de una amplia variedad de plantas vasculares, actuando en ellas como antioxidantes, antimicrobiales, foto-receptores, atrayentes visuales, repelentes a depredadores y como protectores contra la luz (Pieatta 2000). Entre los beneficios encontrados gracias a su actividad biológica se encuentran: efectos antialérgicos, antivirales, antiinflamatorios y, algunos son reconocidos por sus aplicaciones como colorantes naturales (Trease 1991; Hagiwaraa 2001; Kamei 1998; Koide 1997).

Los flavonoides, que se encuentran en estado libre y en forma de glicósido, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales (Harborne 1975; 2000). Estos se encuentran sobre todo en hojas, frutos y flores. Pueden estar disueltos como glicósidos en el jugo vacuolar, en cloroplastos y membranas. La luz no es esencial para su formación, pero influye cuantitativamente (Mabry 1970).

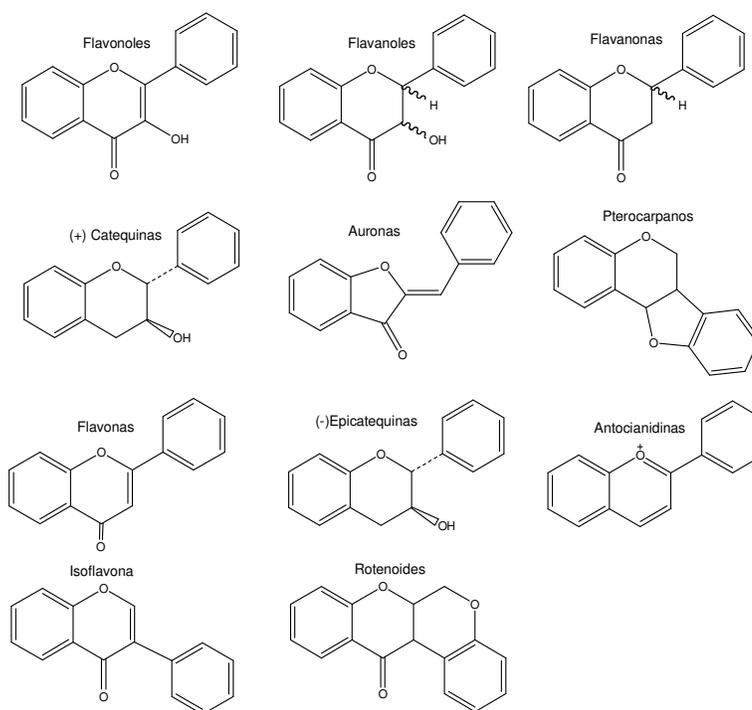
La estructura básica de los flavonoides consta de una cadena de 15 átomos de carbono de la forma C6-C3-C6 (figura 4). El anillo A es un derivado de la cadena policetídica, el anillo B es derivado del ácido shikimico y los tres átomos de carbono que unen los anillos A y B, corresponden a la parte alquílica del fenilpropano (Perez 2003).

Figura 4. Estructura básica de un flavonoide y sistema de numeración.



Existen más de 4000 flavonoides diferentes que se clasifican en varias familias según cambios en su estructura básica. Las principales clases de este tipo de compuestos difieren en el nivel de oxidación y en el patrón de sustitución del anillo C (figura 5), mientras que los compuestos individuales en cada clase difieren en el tipo de sustitución de los anillos A y B (Martínez 2002).

Figura 5. Estructuras generales de los diferentes tipos de flavonoides.



La estructura C6-C3-C6 puede presentar grupos hidroxilos y metoxilos. Generalmente el anillo A presenta hidroxilos, que se ubican principalmente en las posiciones 7 y 5. El anillo B presenta 1, 2 o 3 hidroxilos o metoxilos, que se ubican generalmente de la siguiente manera: si hay un solo hidroxilo/metoxilo se ubica en la posición 4', si hay dos hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3' y 4', y si hay tres hidroxilos/metoxilos se ubican en las posiciones 3', 4' y 5' (figura 6) (Pérez 2003). Además en la estructura básica, los flavonoides pueden estar en

forma de O-glicósido ó C-glicósido. Los azúcares forman O-glicósidos generalmente en las posiciones 3, 7, 3' y 4' (figura 7), y diglicósidos en posiciones 3 y 5, 3 y 7 ó en 7 y 4' (Marcano 1991).

Figura 6. Posiciones comunes para la hidroxilación y la metoxilación.

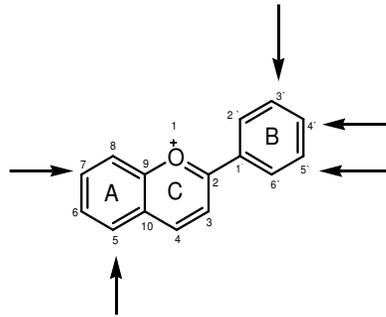
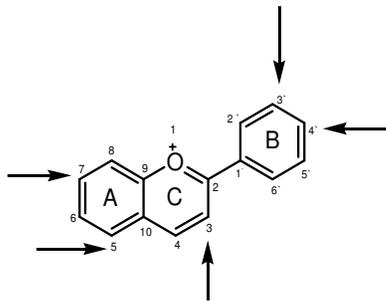
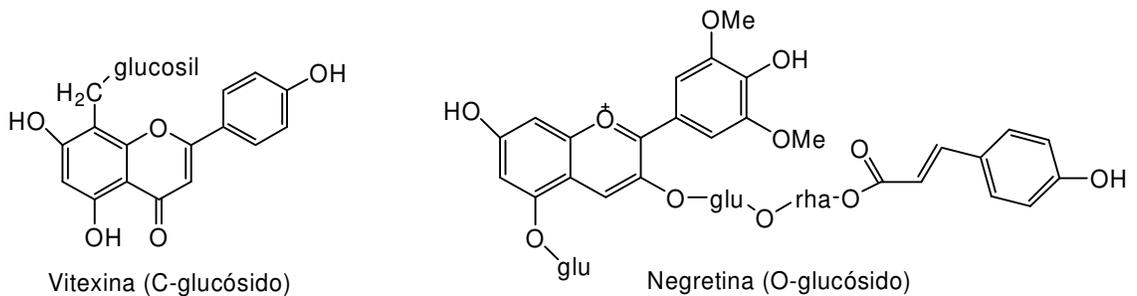


Figura 7. Sitios de O-glicosidación.



La C-glicosidación se presenta sobre C6 y C8. Los O-glicósidos dan hidrólisis por tratamiento con ácidos, lo cual no ocurre en los C-glicósidos (Marcano 1991). La vitexina y negretina (figura8) son ejemplos de flavonoides con el glicósido enlazado al sustituyente del carbono 8 (vitexina) y al carbono en posición 3 (negretina).

Figura 8. Ejemplos de O-glicosidación y C-glicosidación.



Los azúcares más comúnmente encontrados en esta clase de compuestos pueden ser mono-, di- y polisacáridos. Cabe resaltar que la unión de los azúcares es generalmente 1,2 ó 1,6, y son en su mayoría isómeros β (Marcano 1991).

2.3 PIGMENTOS NATURALES

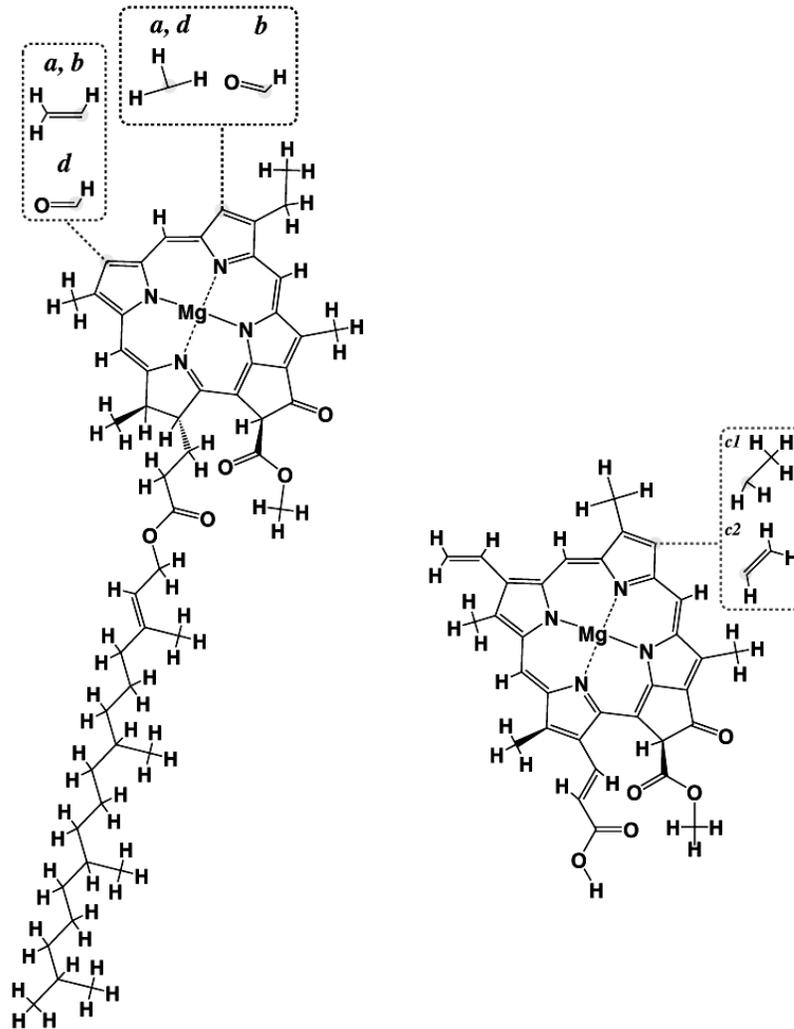
Son sustancias naturales que imparten color y se encuentran en las células y los tejidos de plantas y animales. Un tinte es un colorante certificado por la FDA (*Food and Drug Administration, administración de fármacos y alimentos*) de los Estados Unidos, con cierto grado de solubilidad en agua y utilizado en alimentos. También pueden utilizarse los colorantes exentos de certificación, conocidos como colorantes naturales (Saldaña 2004).

Como ejemplos de pigmentos en tejidos animales se encuentran los compuestos hemo como la hemoglobina, responsable del color de la carne. Esta contiene en su estructura hierro y un anillo de porfirina. Entre los pigmentos vegetales están las clorofilas, que son pigmentos encontrados también en algas y bacterias fotosintéticas, los carotenoides, que varían su coloración del amarillo al anaranjado y son sintetizados por algunas plantas, presentando funciones importantes en la fotosíntesis y la fotoprotección de los tejidos, las betalainas, que tienen coloraciones del rojo al amarillo, los flavonoides tipo antocianina, que proporcionan los colores azul rojo y violeta a los frutos, flores y hojas en la mayoría de las plantas (Saldaña 2004) y de los cuales se tratará especialmente más adelante.

2.3.1 Clorofila. Es una familia de pigmentos que se encuentran en las cianobacterias y en todos aquellos organismos que contienen plastos en sus células, lo que incluye a las plantas y a los diversos grupos de protistas que son llamados algas. Es el pigmento que capta la energía solar usada en la fotosíntesis (Héller 1975).

Todas las clorofilas muestran generalmente espectros similares de absorción en solventes orgánicos, pero con un máximo de absorción en diferentes longitudes de onda, en las regiones del espectro azul y roja. No absorben fuertemente en la región verde (490-550 nm), pero la transmitancia en esta región confiere su característico color verde. En las plantas se encuentra exclusivamente en la membrana del cloroplasto, donde forma asociaciones no covalentes con proteínas hidrofóbicas (Hopkins 1995). Su estructura tiene un anillo de porfirina formado por la unión de cuatro anillos pentagonales de pirrol que a su vez se enlazan con un átomo de magnesio (Mg) y una cadena larga llamada fitol. Hasta el momento, se conoce cuatro tipos de clorofila denominados: clorofila a, b, c1 y c2 (figura 9), en los que se aprecia la conjugación del anillo porfirínico (Héller 1975).

Figura 9. Estructura de las clorofilas a, b, d (Izquierda) y c1, c2 (Derecha).

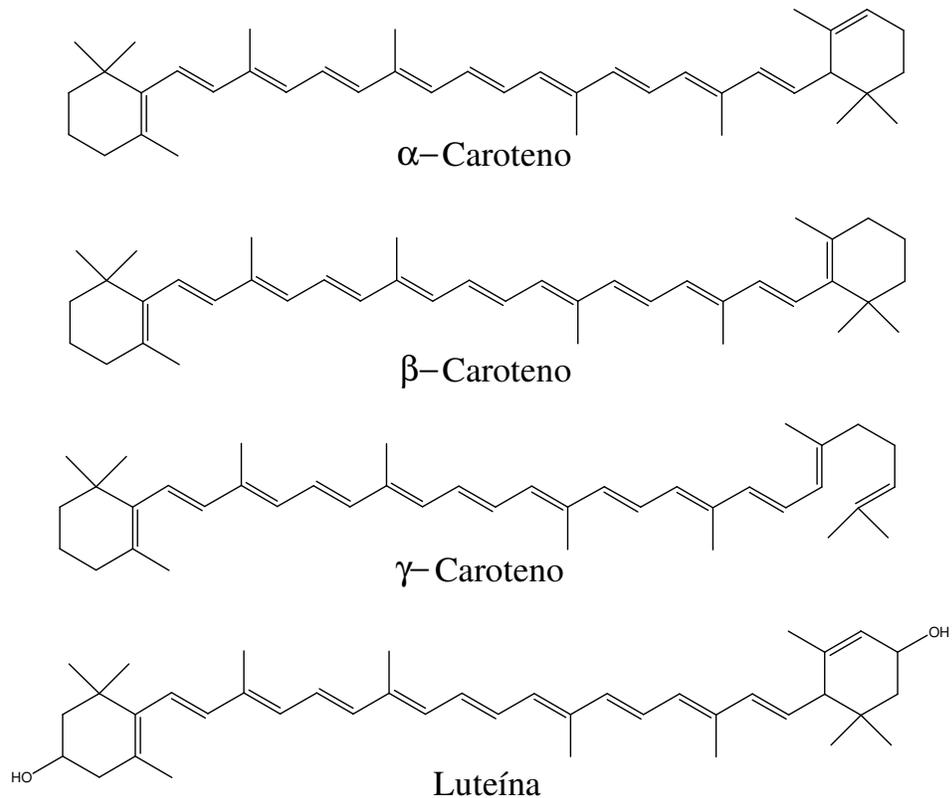


2.3.2 Carotenoides. Son una familia de pigmentos anaranjados y amarillos presentes en organismos fotosintéticos y se encuentran también en las plantas verdes. En el transcurso del año (*in-vivo*), los pigmentos de clorofila se degradan y los carotenoides más estables aparecen para dar una coloración brillante anaranjada y amarilla, característica del follaje en otoño (Hopkins 1995).

Estos son terpenoides C-40 biosintéticamente derivados de la ruta del isopreno. Se encuentran en membranas de cloroplastos o en organelos especializados llamados cromoplastos. La principal función de estos pigmentos tanto en vegetales como en bacterias, es captar energía luminosa, que es luego transferida a las clorofilas para ser transformada durante la fotosíntesis (Hopkins 1995). El color amarillo anaranjado y rojizo que proporcionan a frutos y verduras se debe a

la presencia en su molécula de un cromóforo, que consiste principalmente de una cadena de dobles enlaces conjugados (figura 10) (Héller 1975).

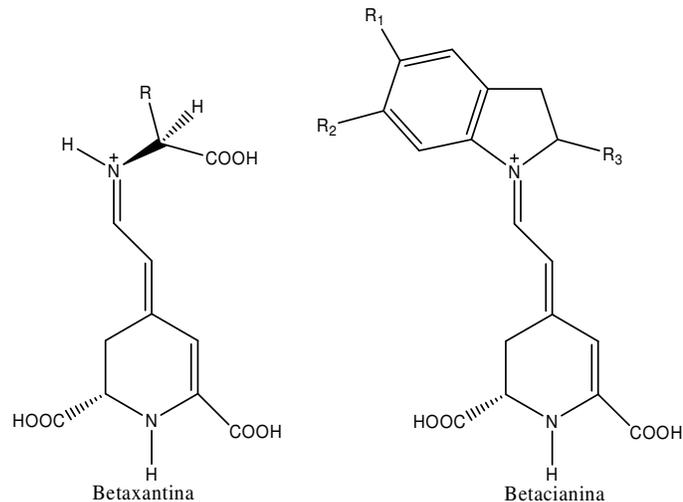
Figura 10. Estructura química de algunos carotenos.



2.3.3 Betalaínas. Son pigmentos naturales de importancia químico-taxonomía que se asocian a las plantas del orden de las *Caryophyllales*. Este tipo de pigmentos se distinguen de una antocianina por el nitrógeno en su estructura molecular y porque no responden reversiblemente al cambio de pH como lo hacen las antocianinas (Hopkins 1995).

La estructura química de estos pigmentos se deriva del ácido betalámico (Moreno 2004) y, dependiendo de los componentes que se unan a la estructura general, aparecen las betaxantinas (color amarillo) en las cuales los patrones de conjugación son aminoácidos o derivados de aminas y las betacianinas (color rojo) cuando el grupo es el 3,4-dihidroxifenilalanina, que puede estar o no glicosidado (figura 11) (Castellar 2003).

Figura 11. Estructura química de las betalaínas.



2.3.4 Pigmentos generados por la reacción de Maillard. Son pigmentos de origen natural, que se forman mediante procesos no enzimáticos. La generación de este tipo de pigmentos esta asociada con el calentamiento y es un tipo de “caramelización”, en la cual, la temperatura necesaria para la degradación de un azúcar reductor, se disminuye por la presencia de grupos amino catalíticos. El azúcar se degrada para producir grupos aldehído los cuales se polimerizan para formar cromóforos visibles (Macrae 2000). Esta reacción se conoce técnicamente como *glucosilación no enzimática de proteínas*. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas, que aportan sabor y aroma a los alimentos, aunque también pueden ser cancerígenas (Smith 1994).

2.4 ANTOCIANINAS

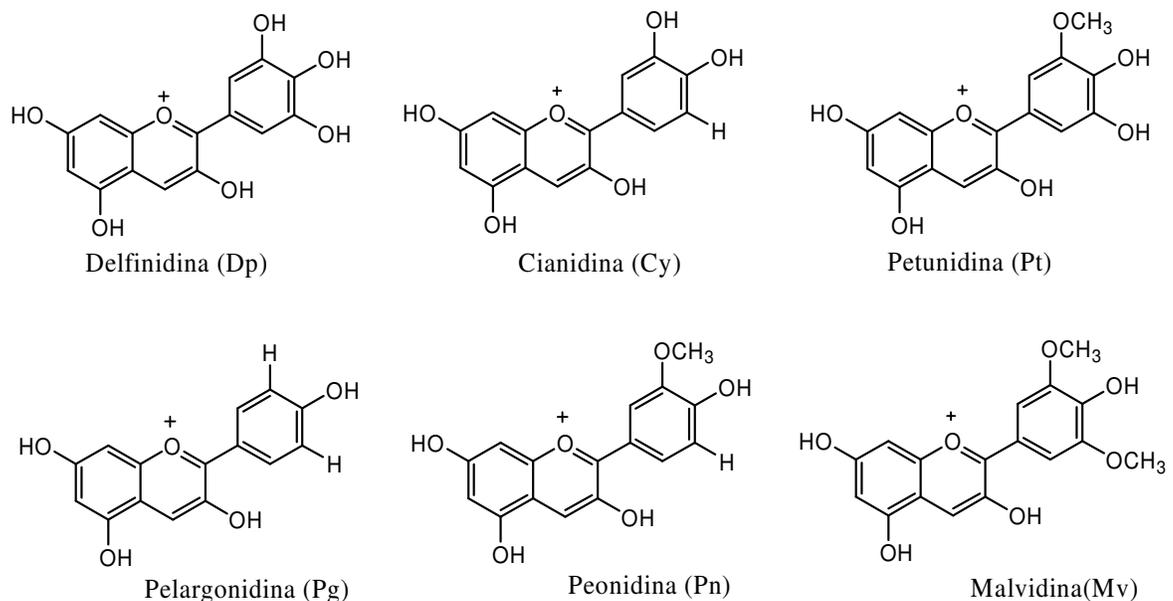
La palabra antocianina, se deriva de las palabras griegas *anthos* (flor) y *kyanos* (azul) y se usaba originalmente para describir los pigmentos azules de las flores de *Centaurea cyanus* (Marquart 1835). Estos son compuestos polifenólicos responsables de colores que van desde el rosado salmón, pasando por el violeta, hasta el azul oscuro en la mayoría de las flores, frutos, hojas y tallos de una gran variedad de plantas. La diferencia de color de las antocianinas se debe al grado de hidroxilación, metilación, y glicosidación de su estructura básica (Kurt 1997).

Este tipo de compuestos conforman un gran grupo de pigmentos solubles en agua. Durante los últimos diez años se ha aumentado significativamente la investigación y publicaciones de nuevas estructuras antociánicas, debido al efecto benéfico para la salud que estas moléculas pueden causar y al mejoramiento de técnicas analíticas para su estudio (Martínez 2002).

Las antocianinas están involucradas en la atracción de insectos y animales, que ayudan a la polinización y dispersión de las semillas, debido a que constituyen la base química del color de las flores en las angiospermas (Harborne 1995; 2000). Se han encontrado evidencias respecto a que las antocianinas, particularmente cuando se encuentran localizadas en la capa superior de las hojas o en las células epidémicas, cumplen un papel importante en la fisiología de supervivencia de la planta (Gould 2002). Esto último gracias a que se ha descubierto que las antocianinas se acumulan en el follaje joven, en respuesta a la deficiencia de nutrientes, cambios de temperatura o exposición a la radiación ultravioleta. Además, estas moléculas están asociadas a la defensa contra herbívoros o infecciones fúngicas patógenas (Gould 2002).

2.4.1 Estructura Química. Las antocianinas son derivados glicosidados del catión 3, 5, 7, 3'- tetrahidroflavilio (Hyoung 1992). Están formadas por una estructura base llamada aglicona o antocianidina cuya estructura es un esqueleto de quince carbonos (C₆-C₃-C₆). La gran mayoría de las antocianidinas se derivan de las seis más comunes; delphinidina, cianidina, petunidina, pelargonidina, peonidina, y malvidina (figura 12). Éstas solo difieren en el lugar de la hidroxilación y metoxilación en el anillo B (Hyoung 1992).

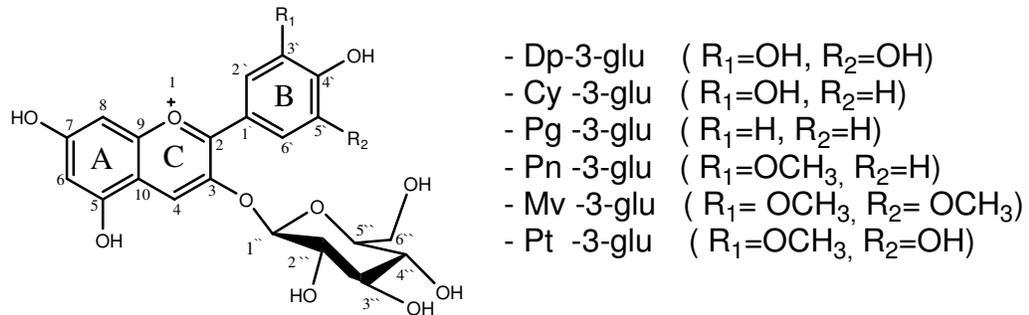
Figura 12. Estructura de antocianidinas (agliconas) comunes.



Las antocianinas difieren entre si por su glicosidación en los grupos hidroxilo, la naturaleza de las unidades glicosídicas, la forma en que están sustituidas y por la presencia de grupos acilo alifáticos y aromáticos (Andersen 2006). La mayoría de las antocianinas están mono-, di- ó tri- glicosidadas generalmente en el grupo

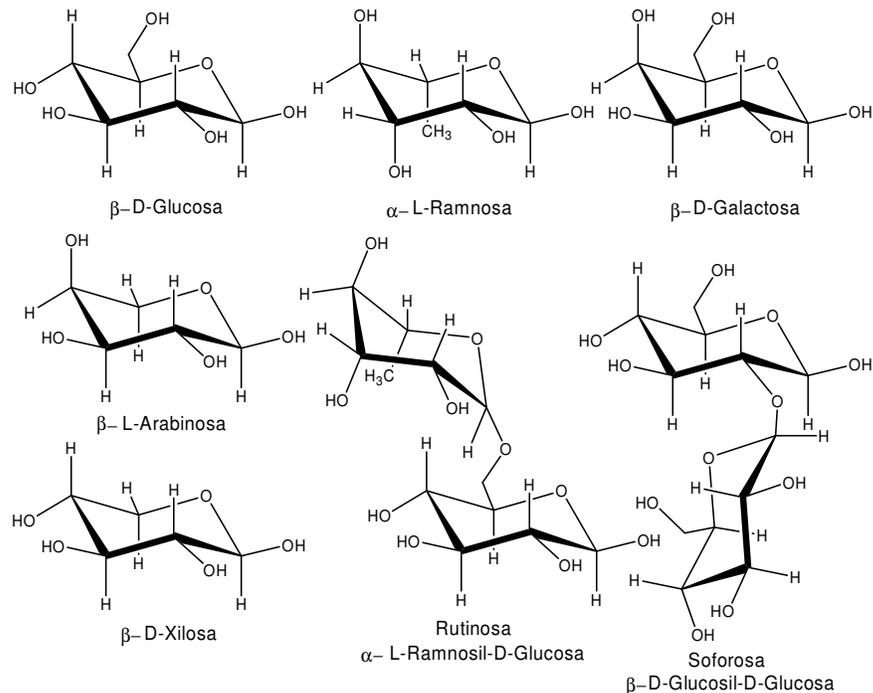
hidroxilo de la posición C-3, salvo dos raras excepciones que poseen siete unidades de azúcar, la tenatina A1 y la cianodelfinina. También existe glicosidación en las posiciones 5, 7, 3', 5' y en algunas ocasiones en la posición 4' (Brouillard 1988). El azúcar se encuentra enlazado a la antocianidina por medio de un enlace con el oxígeno (figura 13), aunque se han publicado casos de uniones a través de un átomo de carbono (Andersen 2006).

Figura 13. Estructura química de antocianinas comunes.



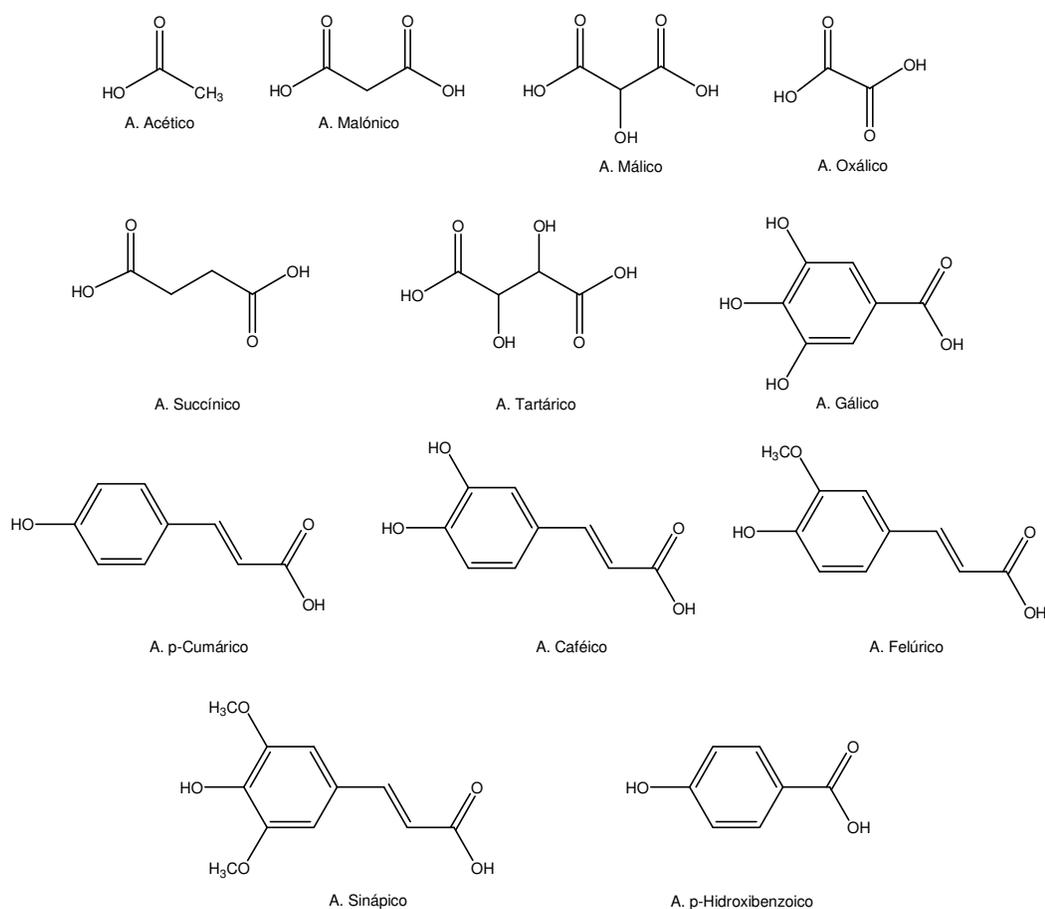
Los azúcares más comunes que se encuentran unidos a la estructura de la antocianidina son: glucosa (90%), seguido por ramnosa, galactosa, xilosa, arabinosa y disacáridos como la rutinosa y soforosa (figura 14) (Rein 2005).

Figura 14. Estructuras de azúcares más comunes en antocianinas (Modificado de Rein 2005).



Los azúcares de las antocianinas pueden tener enlazados grupos acilo alifáticos y/o aromáticos (figura 15) (Cabrita 1999). Los grupos acilo aromáticos incluyen varios ácidos hidroxicinámicos (ácidos *p*-cumárico, caféico felúrico, sinápico y 3,5-dihidroxicinámico) y dos ácidos *p*-hidroxibenzoicos (ácido *p*-hidroxibenzoico y gálico). La acilación con ácidos alifáticos incluye el ácido malónico (el más frecuente), ácido acético, málico, succínico, tartárico y oxálico (Jordheim 2007). Para los monosacáridos el enlace del ácido generalmente se encuentra en la posición 6 (Harborne 1964), aunque también existen publicaciones que muestran la elucidación de antocianinas sustituidas por grupos acilo en las posiciones 1, 2, 3 y 4 del azúcar (Cabrita 1999).

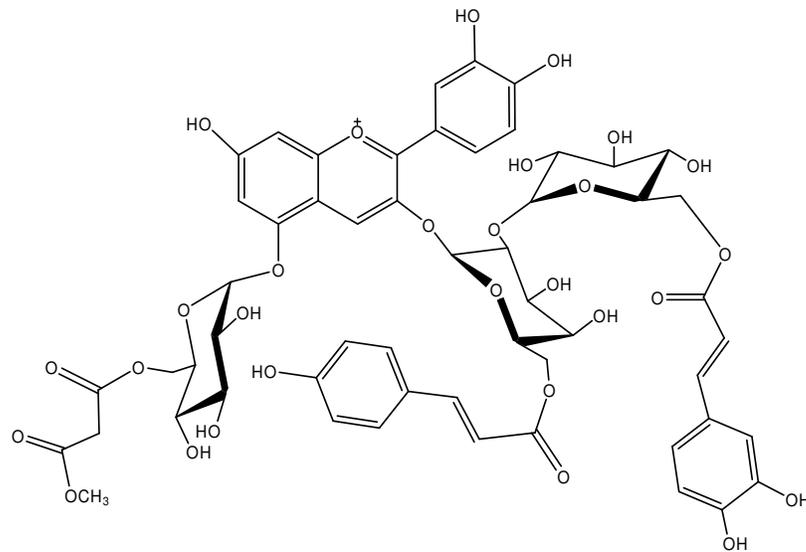
Figura 15. Ácidos alifáticos y aromáticos en antocianinas. (Tomado de Jordheim 2006).



La cianidina 3-[(2''-(6-cafeoil)-glucosil)-6''-(coumaroil)-glucosido]- 5-(6''-(metilmalonil)-glucósido) (figura 16) es un ejemplo de antocianina sustituida con azúcares y grupos acilo mencionados anteriormente. Los grupos acilo alifáticos pueden sufrir hidrólisis en procesos de análisis o almacenamiento en medio ácido.

Esto se debe a la naturaleza lábil del enlace tipo éster que forman (Takeoka 2002). Las antocianinas aciladas con ácidos dicarboxílicos pueden sufrir tanto hidrólisis como esterificación del grupo carboxilo libre, en soluciones alcohólicas ácidas (Andersen 2004).

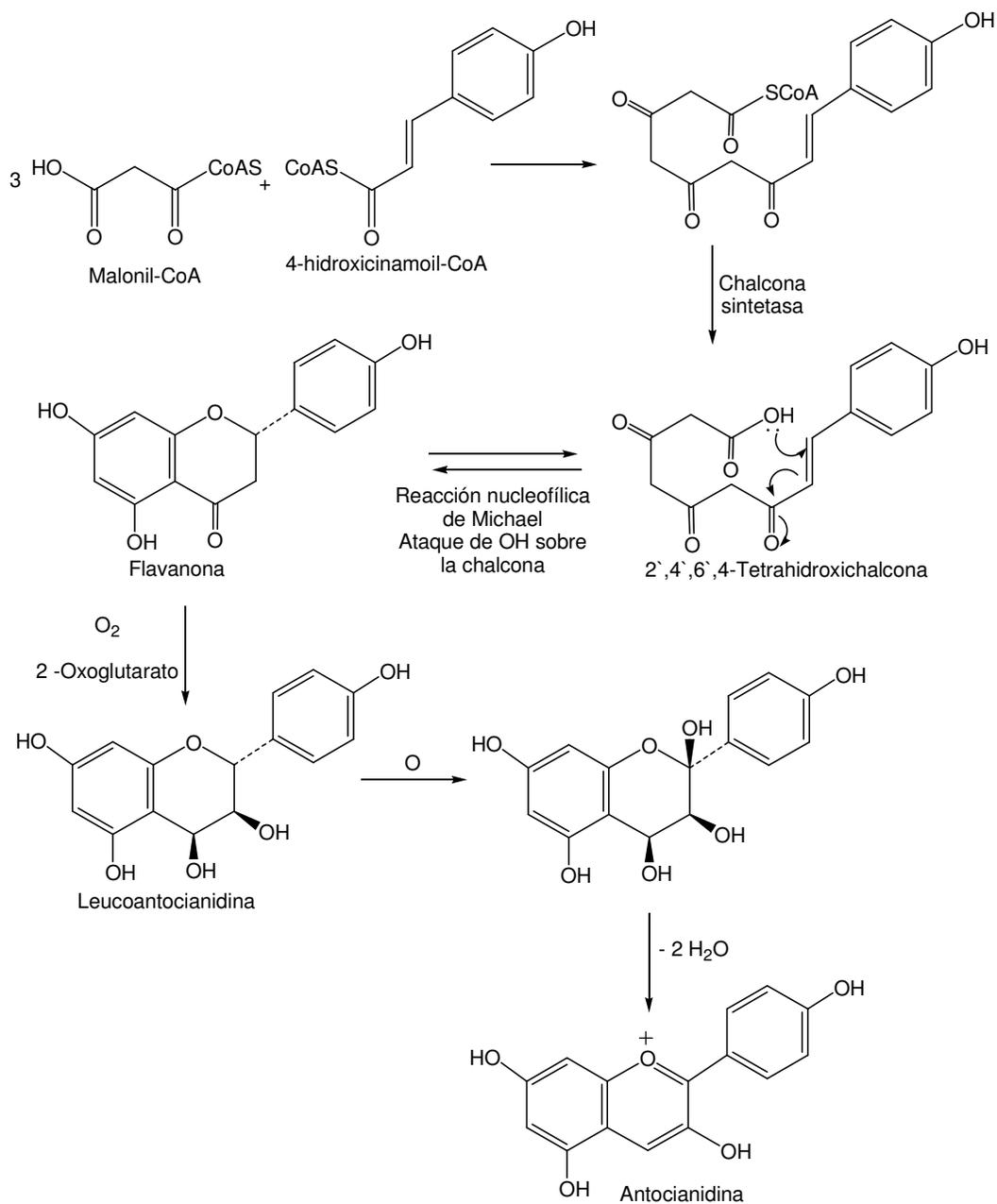
Figura 16. Estructura de la Antocianina: Cianidina 3-[(2''-(6-cafeoil)-glucosil)-6''-(coumaroil)-glucosido]- 5-(6''-(metilmaloni)-glucósido) (Tomado de Rein 2005).



2.4.2 Biosíntesis. Para las antocianinas y demás flavonoides, la biosíntesis (figura 17) inicia con la reacción en cadena entre la 4-hidroxicinamoil-CoA (viene de la fenilalanina) y 3 moléculas de maloni-CoA para producir un policétido (Dewick 2002), que se transforma a una 2', 4', 6', 4-tetrahidroxichalcona por la acción de la enzima chalcona sintetasa, formando el anillo A (Strack 1994). Este compuesto α,β -insaturado sufre un ataque nucleofílico tipo Michael por parte de un ión hidroxilo dando origen a un flavonoide tipo flavanona (Forkmann 1999). Este compuesto es el material de partida para producir un dihidroflavanol, del cual se derivan las leucoantocianidinas que finalmente forman las antocianidinas por pérdida de 2 moléculas de agua (Dewick 2002). Los pasos finales son la glicosidación y acetilación de la antocianidina, inicialmente en el C-3 para la estabilización del catión flavilio (Dewick 2002).

En la mayoría de las plantas, las antocianinas se encuentran generalmente disueltas en la solución vacuolar de las células epidérmicas. Sin embargo algunas veces estas se encuentran en secciones específicas de la vacuola en cuyo caso se conocen como cuerpos intravacuolares coloreados (Jordheim 2007).

Figura 17. Biosíntesis de antocianidinas (Adaptada de Dewick 2002; Jordheim 2007).



2.4.3 Estabilidad. Las antocianinas son moléculas muy reactivas, por lo cual presentan una alta tendencia a la degradación (Rein 2005). Factores como la estructura, concentración, variación de pH, temperatura, luz y oxígeno entre otros, afectan su color, algunas veces de manera instantánea y otras durante el almacenamiento (Fossen 1998).

2.4.3.1 Factores estructurales. Los grupos hidroxilo de la aglicona pueden estabilizar a las antocianinas, y posiblemente este efecto solo se genere en algunas condiciones de pH. Un ejemplo de esta afirmación es el de la delphinidina-3-glucósido en metanol acidificado, la cual resulta más estable que la cianidina-3-glucósido en las mismas condiciones (Dao 1998); pero en una solución buffer de pH 3,1 ocurre el efecto de estabilidad contrario (Cabrita 1999).

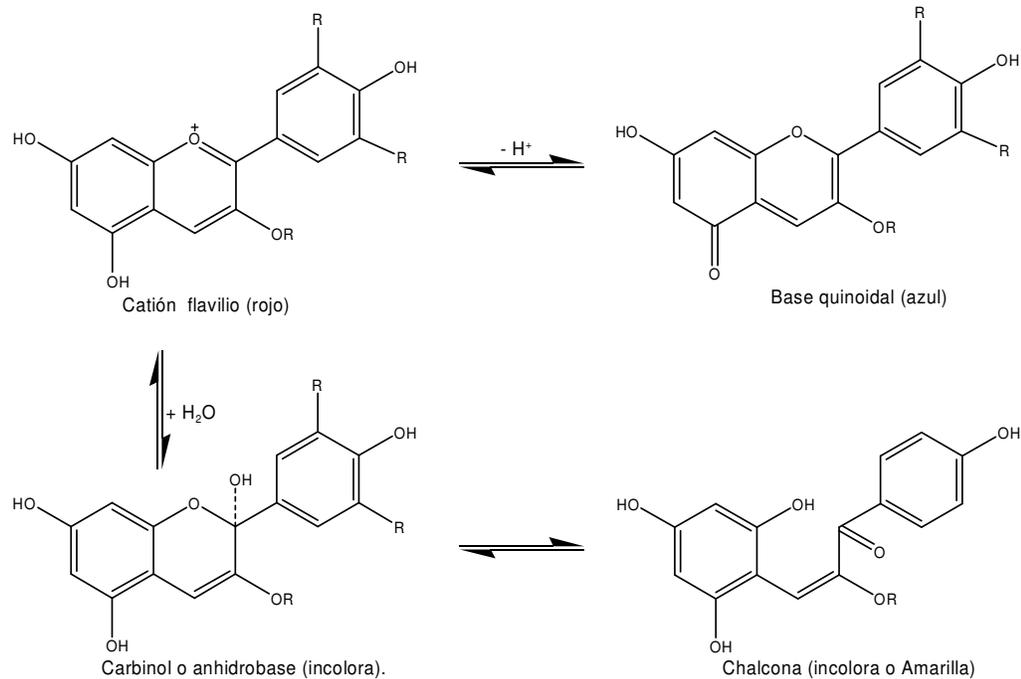
En la mayoría de casos, los grupos metoxilo disminuyen la estabilidad de las antocianinas (Rein 2005). Por ejemplo, la cianidina-3-glucósido resulta más estable comparándola con la petunidina-3-glucósido (Cabrita 1999). La peonidina-3-glucósido tiene un grupo metoxilo en posición 3' y presenta mayor estabilidad que la malvinidina-3-glucósido en cuya estructura se encuentran enlazados grupos metoxilo en posición 3' y 5' (Cabrita 1999).

Los glicósidos pueden ayudar a la estabilidad de las antocianinas, dependiendo el tipo y la posición en la que se encuentren enlazados a la aglicona (Leon 1931). El enlace de un glicósido en la posición 3 de la aglicona, proporciona más estabilidad que el mismo enlace en una posición diferente (Leon 1931). Entre monosacáridos, la galactosa confiere más estabilidad que la arabinosa (Starr 1968) y en general, un disacárido proporciona más estabilidad al pigmento que un monosacárido (Broennum 1985). Las acilaciones en los glicósidos aumentan la estabilidad de las antocianinas. A mayor número de acilaciones, las antocianinas presentan mayor estabilidad, la cual mejora si el grupo acilo enlazado al azúcar es aromático (Rein 2005).

2.4.3.2 Influencia del pH. Las antocianinas presentan gran estabilidad a pH bajos. Sin embargo, muestran una inmensa variedad de colores cuando se exponen a cambios de pH, gracias a la naturaleza iónica de su estructura (Rein 2005). De aquí su utilidad como indicadores ácido-base por su comportamiento anfótero (Jackman 1987).

Existen variaciones estructurales que presentan las antocianinas en solución acuosa, con el cambio de pH (figura 18). Cuando la solución se encuentra en un pH menor a 1, la estructura predominante es el catión flavilio con su color rojo característico (Rein 2005). El incremento de pH disminuye la concentración del catión flavilio y por lo tanto la intensidad del color rojo. Esto ocurre por un ataque nucleofílico con agua, produciendo la forma carbinol, en la cual se observa la pérdida de la conjugación molecular (Brouillard 1982) y un equilibrio químico con la forma chalcona, que puede ser incolora o de color amarillo. El catión flavilio puede perder un protón con el aumento de pH, cambiando su estructura a la forma quinoidal (Jackman 1987).

Figura 18. Variación estructural de antocianinas al cambiar el pH (Modificado de Darren 2005).



2.4.3.3 Acción de la temperatura. La estabilidad de las antocianinas, también es afectada por el efecto de la temperatura. Con el aumento de temperatura cuando la antocianina se encuentra en un pH entre 2 y 4, ocurre una hidrólisis del enlace glicosídico, disminuyendo la estabilidad al formarse la respectiva aglicona, por lo cual también disminuye la intensidad de color (Maccarone 1985). Además existen estudios que indican el cambio estructural del cation flavilio a la forma chalcona, siendo éste el primer paso de la degradación térmica que luego se acompaña de la formación de productos color marrón en presencia de oxígeno (Adams 1973; Markakis 1982). Los factores estructurales mencionados anteriormente, también mejoran la estabilidad de las antocianinas sometidas a calentamiento (Von 1996).

2.4.3.4 Influencia de la luz. La luz es otro factor que acelera la degradación de antocianinas, siendo esencial en la biosíntesis de antocianinas. Algunas publicaciones muestran que una antocianina sustituida en la posición 5, es degradada por la luz en menos tiempo (Delgado 2000).

2.4.3.5 Efecto del oxígeno. Este factor degrada a las antocianinas asociándose con otros factores como el pH la temperatura y la luz (Rein 2005). Sin embargo, existe un efecto de estabilización en presencia de oxígeno cuando se disminuye el pH, dentro de los límites normales de un jugo de fruta, debido a que en éstas

condiciones el equilibrio entre la forma catiónica coloreada y la pseudobase incolora, se desplaza hacia la estructura coloreada más estable (Aravena 2004).

2.4.3.6 Influencia de iones metálicos. Cuando las antocianinas forman complejos con diferentes iones metálicos cambian su color. Los iones aluminio, magnesio y estaño forman complejos con los grupos hidroxilo del anillo fenólico de las antocianinas, proporcionando en algunos casos, estabilidad a la molécula (Hernández 2003). Algunos iones pueden causar pérdida de color, ya que actúan como catalizadores redox, generando un efecto desfavorable a la estabilidad. Un ejemplo de este tipo de iones son los formados por el hierro y el cobre (Walford 1980).

2.4.3.7 Efecto de los glicósidos. Una alta concentración de azúcares estabiliza a las antocianinas debido a que se disminuye la actividad del agua, la cual es un factor degradativo que favorece el ataque nucleofílico al catión flavilio en el carbono 2, formando una base carbinol incolora. Si la concentración de azúcares es baja, la actividad del agua será alta, provocando que los productos de su degradación, como el hidroximetilfurfural y el furfural, aceleren la degradación (Hulme 1971).

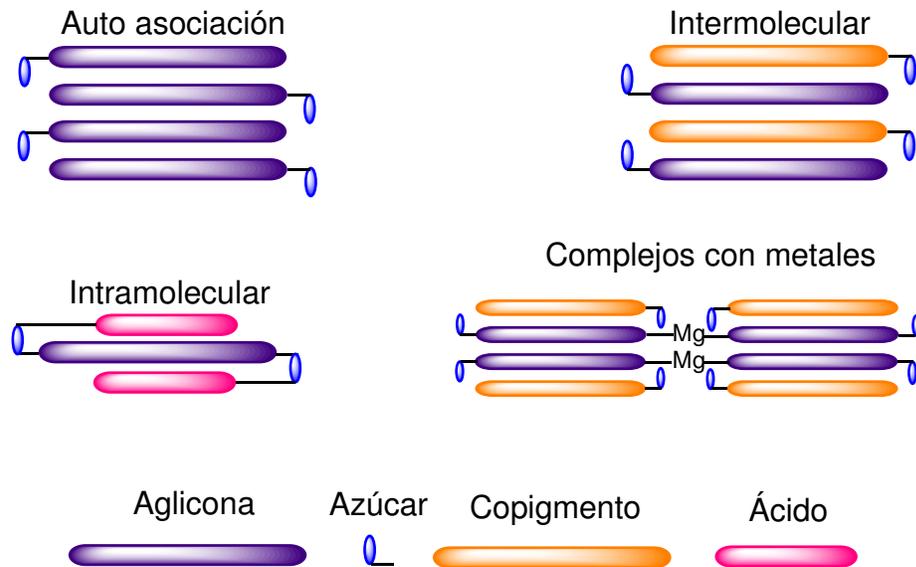
2.4.3.8 Interacción del ácido ascórbico. El ácido ascórbico es un compuesto que se encuentra presente en una gran variedad de frutas. Investigaciones de Jackman (1996) sugieren que la degradación máxima de antocianinas ocurre bajo condiciones más favorables de oxidación del ácido ascórbico (Iversen 1999). Este ácido en presencia de oxígeno degrada a las antocianinas, ya que forma peróxido de hidrógeno durante su oxidación, reacción que es acelerada por la presencia de iones cobre o es inhibida en presencia de flavonoides como la quercetina. El peróxido de hidrógeno rompe el anillo de pirilio atacando nucleofílicamente al C-2, produciendo ésteres incoloros y derivados de la cumarina que posteriormente se destruyen o polimerizan formando precipitados de color café en las soluciones antocianicas (Hernández 2003).

2.4.3.9 Reacciones enzimáticas. Existen varias enzimas asociadas a la pérdida de color de las antocianinas. Las enzimas son de tipo endógenas, están presentes en la mayoría de los tejidos vegetales y generalmente han sido identificadas como glucosidasas o polifenol oxidasas las cuales catalizan la oxidación de compuestos fenólicos (Jackman 1996).

2.4.3.10 Copigmentación. Es un fenómeno químico que permite a las antocianinas estabilizarse, cambiar, e incluso perder el color en algunas ocasiones (Hernández 2003). La copigmentación puede ocurrir cuando una aglicona interacciona con otros flavonoides, con ácidos carboxílicos, o cuando forma complejos con metales (que es cuando pueden cambiar o perder el color) (Fossen 2004). Además existen interacciones de auto-asociación, intermoleculares e intramoleculares (figura 19). Una consecuencia de la copigmentación, es el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorbancia en el espectro de

absorción UV-vis hacia una longitud de onda mayor (efecto batocrómico) ó menor (efecto hipsocrómico). Otro efecto que puede ocurrir en el fenómeno de la copigmentación es el hiperocrómico. Este se caracteriza por el aumento de la intensidad del color, lo cual se explica por el aumento de la absorbancia (Dangels 1997).

Figura 19. Tipos de copigmentación en antocianinas (Modificado de Rein 2005).



2.5 PIGMENTOS NATURALES COMO COLORANTES

Muchos de los pigmentos anteriormente mencionados son utilizados en la industria alimenticia, ya que no se conoce efectos nocivos debido a su uso. Tanto la FDA, como las regulaciones de la Comunidad Económica Europea, permiten el uso de pigmentos naturales en la industria de alimentos. La tabla 1 muestra ejemplos de pigmentos naturales utilizados en la industria (Macrae 2000).

Tabla 1. Pigmentos naturales permitidos por la Comunidad Económica Europea. (Tomada de Macrae 2000)

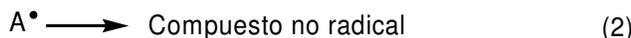
Color	Pigmento Natural
Rojo	<ul style="list-style-type: none"> • Alkannet • Carmino • Orchil
Rojo – Amarillo	<ul style="list-style-type: none"> • Carotenoides • Annatto • β-Caroteno • β-Apo-8`-carotenal • Etil éster del β-Apo-8`-carotenal • Cantaxatina • Xantofilas
Rojo – Púrpura	<ul style="list-style-type: none"> • Antocianinas • Pigmento de la raíz de remolacha
Amarillos	<ul style="list-style-type: none"> • Curcumina • Lactoflavina (Riboflavina) • Riboflavina-5`-fosfato
Verdes	<ul style="list-style-type: none"> • Clorofila • Cu-Clorofila
Café	<ul style="list-style-type: none"> • Caramelo
Negro	<ul style="list-style-type: none"> • Carbón vegetal negro

2.6 RADICALES LIBRES, ANTIOXIDANTES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE ANTOCIANINAS

Los radicales libres son especies químicas con un electrón desapareado o impar en el orbital externo de su estructura atómica. Esta característica hace que tengan una alta reactividad frente a moléculas presentes en la estructura de las células como: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y sus respectivos derivados (Halliwell 1989). La producción de radicales libres se debe al metabolismo normal de la célula, (siendo la mitocondria su principal productor) por lo tanto estos también se localizan en los tejidos (Rodríguez 2001). Cuando el tejido alberga una concentración elevada de radicales libres (estrés oxidativo), pueden presentarse problemas como la arteriosclerosis, el envejecimiento prematuro y el cáncer entre otros (Toshida 2003).

Debido a que la generación de radicales libres se da por el simple hecho de respirar, se necesita compuestos que impidan su formación y otros capaces de neutralizarlos, como es el caso de los antioxidantes, que son inhibidores de la oxidación de biomoléculas. Un antioxidante potente posee una habilidad

significativa para capturar el radical peroxilo por medio de la donación de su átomo de hidrógeno a la especie radical (Toshida 2003). La actividad antioxidante es una actividad típica basada en una reacción química como la que se indica a continuación (Toshida 2003).

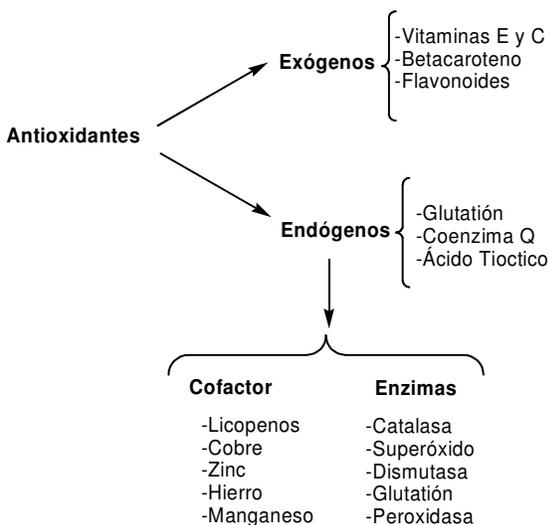


Donde S es el sustrato de la oxidación, AH es el antioxidante y A[•] es el radical generado a partir del antioxidante.

Entre las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, existe una que los divide en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimenticia y, endógenos que son sintetizados por la célula (figura 20). Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado radical libre o hacia varios (Rodríguez 2001).

Existen estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente con flavonoides, que demuestran su capacidad antioxidante (Kuskoski 2004). Su potencial antioxidante es dependiente del número y de la posición de los grupos hidroxilos y su conjugación, así como de la presencia de electrones donadores en el anillo estructural, debido a la capacidad que posee el grupo aromático de soportar el desapareamiento de electrones por desplazamiento del sistema de electrones-π (Ramírez 2001).

Figura 20. Clasificación de los antioxidantes (Modificada de Rodríguez 2001).



Las antocianinas, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, donar electrones a los radicales libres o bien atraparlos y desplazarlos en su estructura aromática. Una actividad

antioxidante óptima se relaciona con la presencia de grupos hidroxilos en las posiciones 3' y 4' del anillo B, los cuales confieren una elevada estabilidad al radical formado. Los grupos hidroxilo libres en la posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A también son donadores de electrones (Duthie 2004).

2.7 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA

2.7.1 Métodos de extracción, separación y purificación de antocianinas. La extracción de las antocianinas, a partir de tejidos vegetales frescos, se realiza comúnmente en frío, utilizando solventes orgánicos polares como el etanol o el más comúnmente usado metanol (Hyoung 1992; Escribano 2004). El etanol es útil cuando se desea usar el extracto en alimentos, sin embargo no se obtiene buenos rendimientos y eliminarlo es mucho más difícil. Estos solventes generalmente se tratan con pequeñas cantidades de ácido, para obtener las antocianinas en forma del catión flavilio previniendo la degradación (Escribano 2004).

Anteriormente la extracción con metanol que contiene ácido mineral era la más usada, sin embargo esta técnica puede descomponer muchas de las antocianinas que sean lábiles a pequeños cambios de pH (Harborne 1975). Además los ácidos minerales pueden causar hidrólisis de algunas antocianinas aciladas por lo cual se prefiere usar ácidos orgánicos más débiles, como el ácido acético, ácido fórmico y, en el caso de extracciones para alimentos, el ácido cítrico. Algunas veces el extracto vegetal puede contener otro tipo de compuestos como aceites, clorofilas etc. En este caso se usa la extracción líquido-líquido con solventes orgánicos como el acetato de etilo y el hexano (Harborne 1975; Escribano 2004).

Para la separación de las antocianinas de otros compuestos fenólicos, se utiliza la cromatografía de papel (CP), cromatografía de capa delgada (CCD) y cromatografía en columna (CC), que permite separar mayores cantidades de muestra. En la cromatografía de columna se usa resinas como la amberlita XAD, la polivinilpirrolidina (PVP), Sephadex, talco y resinas de intercambio iónico (Harborne 1975; Escribano 2004).

Para la purificación de antocianinas la técnica más usada es la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) de tipo analítica y preparativa, usada debido a la naturaleza no volátil, térmicamente lábil de las antocianinas y, porque permite separar, identificar y cuantificar (Escribano 2004). La mejor separación se logra usando CLAE en fase reversa (CLAE-FR), la cual permite realizar excelentes separaciones en tiempos cortos de análisis (Hyoung 1992). La CLAE-FR puede combinarse con un detector electroquímico (DE) o uno de arreglo de diodos (DAD), que proporciona alguna información básica sobre la naturaleza de la aglicona, el lugar de glicosidación de la antocianina y si se encuentra acilada (Da Costa 2000).

Las columnas que generalmente se usan en la separación de antocianinas son columnas C₁₈ con un tamaño de la partícula empaquetada que varía de 3 a 10µm. Los análisis con columnas de partículas más pequeñas permiten separaciones rápidas, sin embargo existen muchos trabajos con partículas de 5 a 6 micrómetros que ofrecen buenos resultados en términos de eficiencia y vida de la columna. Además en el análisis de uvas, vinos rojos y algunas bayas se usa columnas de sílica dopadas con alcanos de seis y ocho carbonos (Hyoung 1992).

Existen varios tipos de fases móviles utilizadas en CLAE-FR. Cuando las antocianinas que se desea separar presentan gran similitud estructural se utiliza gradientes de elución binarios y cuando la mezcla es muy compleja se emplea gradientes de elución ternarios (Hyoung 1992). Los solventes orgánicos más utilizados son el acetonitrilo y el metanol, los cuales deben mantenerse a un pH menor a 2, para lo cual se usa ácido fórmico, acético o trifluoroacético. El uso de fases móviles que se encuentren a pH superiores a 2.5 causa picos ensanchados, por lo tanto baja la resolución y disminuyen los límites de detección ya que la variación estructural en el equilibrio entre el catión flavilio y la base quinoidal es muy lenta (Da Costa 2000).

Teniendo en cuenta las columnas, las fases móviles utilizadas y la estructura de las antocianinas, se puede predecir el orden de elución durante un análisis CLAE-FR preparativo. Las antocianinas con mayor número de grupos hidroxilo en el anillo B tienen mayor polaridad reteniéndose menos en la columna, mientras que las antocianinas que contengan mayor número de grupos metoxilo son menos polares y eluyen más lentamente. El orden de elución que se ha observado en las antocianidinas es el siguiente: delfinidina, cianidina, pelargonidina, petunidina, peonidina y malvidina. Cuando la antocianidina se encuentra unida a un azúcar su polaridad aumenta, por lo cual si contienen el mismo azúcar el orden de elución se conservara y el tiempo de retención es menor. Además si existen dos azúcares el tiempo de retención disminuye más, ya que la polaridad aumenta. Los grupos acilo por el contrario aumentan el tiempo de retención lo cual indica que disminuyen la polaridad de la antocianina (Escribano 2004).

2.7.2 Métodos de detección y caracterización de antocianinas. Existen muchos métodos para caracterizar las antocianinas, como la espectroscopia Uv-vis, la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) (Macrae 2000). La recopilación de información de la mayoría de estas técnicas permite identificar la estructura química o realizar una buena aproximación (Jordheim 2007).

2.7.2.1 Espectroscopía Ultravioleta –visible (Uv-vis). Las antocianinas presentan longitudes de onda de máxima absorción entre 480 y 550nm, lo cual está relacionado con la estructura molecular. La longitud de onda de máxima absorción depende del tipo de antocianidina, la posición del azúcar, y la presencia de grupos acilo (Jordheim 2007).

Existe una diferencia, en la longitud de onda de máxima absorbancia, de las antocianinas que poseen dos sustituyentes en el anillo B y las que poseen tres. Por lo tanto la longitud de onda máxima de la cianidina y peonidina es 11nm menor que en el caso de la delfinidina, petunidina y la malvidina (Escribano 2004). En algunos monoglicósidos se observa un hombro en la región de 440 nm, ausente en diglicósidos 3,5. Respecto a los grupos acilo solo los aromáticos producen máximos adicionales u hombros como el caso de ácido caféico (326-329nm) o el *p*-cumárico (308-313nm) (Escribano 2004).

Gracias a la relación estructura-longitud de onda máxima absorción (λ_{max}), se pueden calcular algunos valores que proporcionan una información diagnóstica sobre la estructura de la antocianina. La relación entre la absorbancia a 440nm y la absorbancia a la longitud de onda máxima ($\lambda_{440}/\lambda_{vis-max}$), indica la posición de la glicosidación, de manera que valores entre 0,2-0,3 ó mayores indican que el glicósido esta en posición 3 y si el resultado está entre 0,1 y 0,2 se localiza en posición 5. Además al relacionar $\lambda_{uv-max} / \lambda_{vis-max}$ se puede determinar la presencia de grupos acilo aromáticos, por lo tanto valores entre 0,6-1,3 determinan la presencia de acilos mono-aromáticos, si el valor es mayor se debe a que existen más grupos aromáticos. Algunos autores publican estos valores en porcentaje (Jordheim 2007).

Existe otro fenómeno que puede utilizarse para diferenciar las antocianinas por medio de la espectroscopía Uv-vis, que se basa en el cambio batocrómico que experimentan la delfinidina, la petunidina y la cianidina, en presencia de cloruro de aluminio ($AlCl_3$), este cambio no se aprecia en la malvidina y la peonidina (Escribano 2004).

2.7.2.2 Espectroscopía de resonancia magnética protónica 1H . La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica muy utilizada para estudiar todos los tipos de flavonoides, gracias a que estudios hechos en 1964 por Batterham y Higet que usaron el hexadeuteriodimetilsulfoxido ($DMSO-d_6$) como solvente, permitieron analizar los flavonoides insolubles en cloroformo o tetracloruro de carbono deuterados. Además en 1964 y 1965 estudios hechos por Weiss y Mabry, completaron el análisis de todos los tipos de flavonoides ya que iniciaron el estudio de derivados de flavonoides solubles en CCl_4 a partir de trimetilsilil éter (TMS-éter) (Harborne 1975). La estructura de la mayoría de las antocianinas ha sido confirmada o determinada por esta técnica. En la espectroscopía actualmente se usa metanol deuterado como solvente (Escribano 2004). Los experimentos de RMN 1H dan información sobre la estructura base de la aglicona, del azúcar, su posición y sus posibles grupos acilo (Jordheim 2007; Kuskoski 2003). Para complementar en su totalidad el estudio de la estructura química de la antocianina, se realizan experimentos complementarios en una dimensión como el ^{13}C y en dos dimensiones como el COSY y el HMBC (Escribano 2004). Los desplazamientos típicos que se encuentran en un espectro RMN 1H de las antocianinas se muestran en la tabla 2 (Martínez 2005).

Tabla 2. Algunos desplazamientos químicos de protones presentes en las antocianinas (Modificado de Martínez 2005).

Desplazamiento δ (ppm)	Protón
8.9	Posición 4
6.8-8.0	aromáticos Del Anillo B
3.7-4.1	Metoxilos aromáticos
3.0-4.8	azúcares
4.1-6.0	H" del carbono anomérico del azúcar

2.7.2.3 Espectrometría de masas. Debido a la baja volatilidad de las antocianinas, analizarlas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es difícil y costoso, debido a que implica el uso de técnicas de derivatización (Macrae 2000). Por este motivo en los últimos años se utiliza la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) para estudiar las antocianinas en una mezcla compleja, ya que es un método que permite seleccionar las antocianinas, mediante la cromatografía líquida e identificarlas por medio de las masas de sus iones moleculares (Da Costa 2000; Escribano 2004).

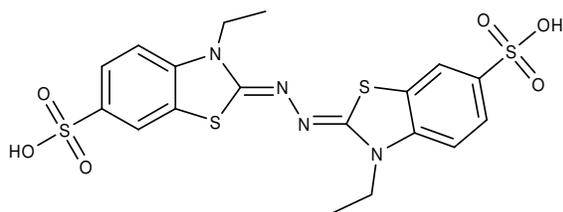
Los espectros de masas de las antocianinas no tienden a ser muy complejos y prácticamente dependen de la identidad del azúcar que se encuentra unido a la aglicona. De esta manera, el espectro de las antocianinas que tienen un monoglucósido en posición 3, muestra un fragmento con la relación masa/carga (m/z) de la aglicona y el ión molecular. Los diglicósidos que presentan el azúcar en posición 3 y 5, además del ión molecular y el fragmento de la aglicona, muestran los iones de la antocianidina sustituida con el azúcar en la posición 3 ó en 5. Cuando el azúcar es un disacárido (biósido), solo se formaran el ión molecular y el fragmento de la aglicona, a excepción de la rutinosa (una unidad de glucosa y otra de ramnosa) que algunas veces produce un fragmento adicional correspondiente a la molécula que ha perdido únicamente la ramnosa (Escribano 2004).

2.7.3 Métodos de determinación de actividad antioxidante. Para la determinación de la actividad antioxidante de extractos vegetales o metabolitos, existen diversos métodos, que se basan principalmente en la generación de un radical libre el cual es sometido a la acción del antioxidante y su efecto se analiza por métodos como la espectroscopia Uv-vis (Re 1998).

En el análisis de la actividad antioxidante de antocianinas existe una técnica muy utilizada conocida como "Método ABTS". Este se basa en la formación del catión radical libre 2,2 azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico), conocido como radical ABTS^{•+}. El radical se prepara luego de hacer reaccionar ABTS (figura 21) con persulfato potásico (Kuskoski 2004). La ventaja del radical es su estabilidad cuando se encuentra en refrigeración y lejos de la luz. Estos factores permiten

almacenar una solución de trabajo por aproximadamente seis meses. Además este absorbe en la región cercana al infrarrojo (645, 734 y 815nm), evitando interferencias con las antocianinas (Kuskoski 2004; Okezie 2002).

Figura 21 Estructura del ABTS.

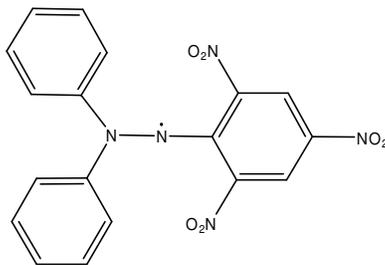


2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)

El método permite expresar los resultados de acuerdo a la capacidad del antioxidante para donar un hidrógeno y estabilizar al radical $ABTS^{\bullet+}$. La decoloración que la solución de $ABTS^{\bullet+}$ experimenta en la reacción, se compara con la decoloración hecha por un antioxidante patrón derivado de la vitamina E conocido como Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), mediante una curva de calibración. Por esta razón el resultado se expresa como capacidad antioxidante en equivalentes trolox ó TEAC (del inglés: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Okezie 2002).

Otro método ampliamente utilizado se conoce como "Método DPPH[•]". El procedimiento desarrollado por Brand-Williams en 1995 y descrito para diferentes patrones de antioxidantes por Sánchez en 1997, utiliza como radical libre el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH[•]) (figura 22), de color violeta.

Figura 22. Estructura del radical DPPH[•].



Cuando el radical libre reacciona con el compuesto antioxidante (antocianina), este último le dona un protón y produce una decoloración que puede medirse a través del tiempo por medio de la absorbancia de la mezcla (Okezie 2002). La decoloración de la mezcla se debe a la aparición de la forma reducida del radical,

cambiándolo así, de un color violeta a un amarillo con el transcurso del tiempo (Molyneux 2004).

Con los datos de absorbancia y utilizando diferentes concentraciones de antioxidante, se puede calcular la concentración del radical en el medio de reacción y también el porcentaje de DPPH[•] remanente. Estos resultados y las diferentes concentraciones permiten encontrar el parámetro EC₅₀ el cual indica la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración de radical inicial a la mitad y el T_{EC50}, es decir el tiempo que tarda el EC₅₀ para alcanzar el estado estacionario. Sánchez en 1997 incorpora el término eficiencia anti-radical el cual permite clasificar los antioxidantes y compararlos en términos de eficiencia anti-radical (EA). El parámetro se calcula de la siguiente manera:

$$EA = 1/(EC_{50} \times T_{EC50})$$

Cualitativamente los clasifica en: “Bajos” (EA ≤ 1x10⁻³), “Medios” (EA entre 1x10⁻³ y 5x10⁻³), “Altos” (EA entre 5x10⁻³ y 10x10⁻³) y “Muy altos” (EA > 10x10⁻³)

2.7.4 Otros métodos de análisis

2.7.4.1 Fenoles totales. Para determinar la cantidad de fenoles en una muestra, existe un método desarrollado por Folin y Ciocalteu en 1927. Este método consiste en someter la muestra a la acción del reactivo Folin-Ciocalteu el cual está formado por mezcla de ácido fosfotúngstico (H₃HW₁₂O₄₀) y ácido fosfomolibdico (H₃PMo₁₂O₄₀). Los compuestos fenólicos se reducen generando una mezcla de óxidos azules de wolframio (W₈O₂₃) y molibdeno (Mo₈O₂₃) produciendo un espectro de absorción con una λ_{máx} de 765 nm proporcional al contenido de fenoles en la muestra. Para determinar la cantidad de fenoles se realiza una curva de calibración con ácido gálico y se expresa los resultados como mg de ácido gálico/100 g de muestra (Aravena 2004).

2.7.4.2 Antocianinas monoméricas totales. Existe un método para determinar la cantidad de antocianinas monoméricas presentes en un extracto. Este se conoce como “método del pH diferencial” y se fundamenta en la capacidad que poseen las antocianinas monoméricas de cambiar su estructura a diferentes valores de pH de manera reversible. Este cambio reversible no lo experimentan las antocianinas poliméricas (Wrolstad 2005). La metodología propuesta por Giusti en 2001 consiste en disolver el extracto en dos soluciones buffer, uno a pH 1 y el otro a pH 4.5. A las dos soluciones se mide la absorbancia a la longitud de onda máxima y a 700nm y se aplica la siguiente relación (Giusti 2001):

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

La diferencia en las absorbancias se debe solo a las antocianinas monoméricas y se expresan como mg de cianidina-3-glucósido/ litro de solución (por ser la más abundante) con la siguiente relación:
Pigmentos antociánicos monoméricos

$$(\text{mg/L}) = (A \times \text{PM} \times \text{FD} \times 1000) / (\epsilon \times 1)$$

Donde:

- A = Absorbancia de la muestra diluida
- PM = peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol),
- FD = factor de dilución,
- ϵ = absortividad molar de la cianidina-3-glucósido (29600).

2.7.4.3 Color polimérico. Existe un método para determinar la cantidad de color debido a la presencia de antocianinas poliméricas en una muestra. Este se basa en la reacción de las antocianinas monoméricas con metabisulfito de sodio, experimentando una decoloración, permitiendo determinar la contribución de color por parte de las antocianinas poliméricas, utilizando espectroscopía Uv-vis (Wrolstad 2005). La densidad de color de la muestra control (tratada con agua) se calcula con la siguiente relación (Giusti 2001):

$$\text{Densidad de color} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})] * \text{DF}$$

El color polimérico de la muestra decolorada con bisulfito se obtiene con la siguiente relación (Giusti 2001):

$$\text{Color polimérico} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700})] * \text{DF}$$

$$\% \text{ de color polimérico} = (\text{color polimérico} / \text{densidad de color}) * 100$$

3. METODOLOGÍA

La metodología para el estudio de los pigmentos de la pulpa del Motilón, fue enfocada en tres etapas: primero la obtención del extracto crudo de pigmentos en la pulpa, después la purificación y finalmente el estudio de actividad antioxidante de los extractos y antocianinas monoméricas mayoritarias.

3.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección de los frutos de Motilón fue realizada en la reserva natural El Vicundo del municipio El Encano (Nariño). Las características fisiológicas del árbol y su clasificación taxonómica se determinaron en el herbario de la Universidad de Nariño, utilizando muestras de tallo, hoja, flor y fruto de un ejemplar ubicado en la reserva. Con un total de 7,2 Kg de frutos tomados al azar en una hectárea de la reserva, se llevó a cabo un cuarteo para obtener de esta manera, una muestra de 1,8 Kg de fruto. De esta muestra, y por medio de una separación manual, se obtuvieron 469,0 g de pulpa.

3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE PULPA

Para realizar la extracción de los pigmentos presentes en las pulpas de Motilón recolectadas, se siguió la metodología de Pomar (2005) con algunas modificaciones. Los pigmentos se obtuvieron por maceración con agua destilada, en un tiempo de 96 horas a 5 °C aproximadamente y cambiando el solvente hasta la decoloración de la pulpa. Con ayuda de un embudo Buchner y haciendo lavados de la pulpa con agua, se recolectó todo el extracto y posteriormente se llevó a centrifugación (9000 rpm 5 minutos). El agua fue evaporada hasta la quinta parte de su volumen inicial por medio de un rotoevaporador Heidolph a 35 °C. Finalmente el extracto se envió a la universidad Nacional de Colombia (Bogotá), donde se sometió a un proceso de liofilización, obteniendo un peso de 75,26 g de extracto crudo (MPC), los cuales fueron conservados a 5 °C aproximadamente. (Anexo A)

3.2.1 Obtención de un extracto rico en polifenoles. Para obtener un extracto con mayor concentración de polifenoles a partir de 35,00 g de extracto crudo (MPC), fue necesario realizar extracciones con n-hexano y acetato de etilo para eliminar compuestos lipofílicos y medianamente polares respectivamente. Después de las extracciones, la fase acuosa fue cargada en una columna cromatográfica de 80 x 2 cm, empacada con una resina de amberlita XAD-7 (absorbente polimérico no iónico) activada con agua – HCl 0,01%. Los azúcares, ácidos orgánicos y sales fueron separados del extracto, al eluirlos con 18 litros de agua destilada. Finalmente, el extracto se recuperó con una mezcla de metanol-ácido acético en proporciones 19:1 y después de la evaporación del solvente, este también fue

liofilizado, para obtener el extracto rico en polifenoles (MPX), el cual se conservó a 5 °C aproximadamente (Anexo A).

3.2.2 Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas. Utilizando una columna cromatográfica de 40 x 2 cm empacada con resina Lipophilic Sephadex LH-20 Sigma, se obtuvo fracciones de antocianinas monoméricas y poliméricas a partir de 0,5 g del extracto purificado MPX, disueltos en 50 mL de metanol. La fracción de compuestos con bajo peso molecular (antocianinas monoméricas), se obtuvo con una mezcla de metanol-agua 1:4 con ácido fórmico 0,1%. Las antocianinas poliméricas fueron eluidas con una mezcla de acetona-agua 2:1 con ácido fórmico 0,1 %. Las dos fracciones fueron evaporadas a sequedad, para obtener un extracto rico en antocianinas monoméricas (MPM) y otro rico en antocianinas poliméricas (MPP) (Anexo A).

3.3 ANÁLISIS DE ANTOCIANINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

El extracto rico en polifenoles MPX, las fracciones MPM y MPP separadas por Sephadex, fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia analítica en un equipo Merck-Hitachi con detector de arreglo de diodos (Hitachi L-4500) y equipado con una columna C-12 Phenomenex Synergi MAX-RP80R (250 x 6,00mm, 4 µm). Para el análisis fue necesario utilizar dos fases móviles compuestas de agua, acetonitrilo y ácido fórmico. Las proporciones de la fase móvil A fueron 87:3:10 y 40:50:10 para la fase móvil B. Con la fase móvil A fueron diluidas las muestras a 0,1 mg/mL y empleando un flujo de 0,8 mL/minuto se realizó la corrida cromatográfica utilizando el siguiente gradiente lineal: 0-6% de B (0-10 minutos); 6-20% de B (10-20 minutos); 20-40% de B (20-30 minutos); 40-50% de B (30-35 minutos) y 50-6% de B (35-40 minutos).

La separación de 3 pigmentos mayoritarios presentes en el fruto del Motilón fue realizada al extracto MPX con CLAE preparativa, empleando una columna C-18 Phenomenex Gemini G-4435-NO (250 x 10,00mm 5 µm). Para encontrar la mejor forma de separar los pigmentos, fue necesario realizar un ensayo preliminar utilizando un gradiente lineal de 35-40% de B (0-7minutos); 40- 50% de B (7-10min), luego elución isocrática con 50% de B (10-13min) y por último un gradiente lineal de 50-35% de B (13-17min). Finalmente la separación fue realizada con elución isocrática, utilizando una mezcla de las fases móviles A:B (75:25). Utilizando la fase móvil A se diluyó el extracto a una concentración de 354,17 mg/mL, para inyectar 40 µL de solución y realizar la corrida cromatográfica a un flujo de 3,5 mL/minuto.

3.4 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MAYORITARIAS

El extracto rico en polifenoles (MPX), la fracción rica en antocianinas monoméricas (MPM), separada por Sephadex y 3 fracciones purificadas por CLAE preparativa,

se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM), en un equipo Shimadzu QP-5000α, equipado con una columna C-18 Phenomenex Luna (5 μm). Las fases móviles y el gradiente de elución utilizado en la separación, fueron los mismos empleados en la metodología de cromatografía líquida de alta eficiencia analítica (sección 2.3.2), el volumen de inyección fue de 5μL.

El voltaje del detector fue de 1,5 Kv, se trabajó en un rango de masas de 100-800, el voltaje y la temperatura del CDL fueron de 150 v y 300°C respectivamente, se utilizó un flujo de gas nebulizador de 0,5 L/min y la temperatura Block fue de 300°C.

Para sugerir la posición del azúcar en las 3 antocianinas mayoritarias, se utilizó un barrido espectral UV-Vis, con el cual se determinó la relación $A_{\lambda 440} / A_{\lambda \text{max-vis}}$. Además, por medio la relación $A_{\lambda \text{UV-Max}} / A_{\lambda \text{max-vis}}$ se obtuvo información sobre la presencia o ausencia de acilaciones.

3.5 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles totales fue determinado en soluciones preparadas a partir del extracto crudo (MPC; 2500 ppm) y del extracto rico en polifenoles (MPX; 540 ppm), utilizando el método publicado por Folin y Ciocalteau (1927).

La reacción fue realizada con 0,1 mL de la solución a analizar, 0,5 mL del reactivo de Folin Ciocalteau y 1,5 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio Na_2CO_3 al 20 % p/v; aforando a 10 mL con agua destilada. Transcurridas 2 horas se tomó lectura de absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 11 (Kuskoski 2005).

De igual manera se realizó una curva de calibración de ácido gálico con soluciones de 50, 100, 150, 250 y 500 ppm, para expresar los resultados en mg de ácido gálico/ 100 g de extracto liofilizado. Todos los análisis fueron realizados por triplicado (Anexo B).

3.6 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES

El contenido de antocianinas monoméricas en los extractos MPC, MPX, MPM y MPP se determinó por espectroscopia Uv-vis con el método del pH diferencial (Giusti 2001)

En el análisis se utilizó soluciones tampón de ácido clorhídrico /cloruro de potasio 0,025 M pH 1 y ácido acético /acetato de sodio 0,4 M pH 4,5.

Para cada extracto se prepararon dos soluciones de igual concentración. Una con el tampón pH 1 y la otra con el tampón pH 4,5. La solución preparada con tampón

pH 1, se utilizó para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia y el factor de dilución adecuado para que las mediciones de absorbancia de las muestras sean menores a 1, siguiendo la ley de Beer (Skoog 2003). El equipo utilizado fue un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 11.

Las concentraciones de las soluciones preparadas con los tampones para el extracto MPC fueron 4000 ppm, 2000 ppm para el extracto MPX y 1400 para los extractos MPM y MPP. Aplicando el factor de dilución determinado y después de un reposo de 15 minutos, se midió la absorbancia de cada solución en la longitud de onda de máxima absorbancia y a 700 nm. Como blanco se utilizó agua destilada. Los resultados se expresaron en mg de cianidina-3-glucósido/100 g de extracto liofilizado y la metodología se realizó por triplicado (Anexo C).

3.7 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS POLIMÉRICAS

El contenido de antocianinas poliméricas en los extractos de MPC, MPX, MPM y MPP fue determinado con el método del pH sustractivo (Giusti 2001). Se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente un tampón de ácido clorhídrico /cloruro de potasio 0,025 M pH 1. Se utilizaron las concentraciones, factores de dilución y longitudes de onda de máxima absorbancia calculados en la metodología de pH diferencial (sección 2.5). Se transfirieron 2,8 mL de muestra diluida en 2 tubos de ensayo. Al primer tubo se le adicionó 0,2 mL de metabisulfito de sodio al 40% en agua y al segundo tubo se le agregó 0,2 mL de agua destilada. Transcurridos 15 minutos se midieron absorbancias a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorbancia y a 700 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 11, utilizando como blanco agua destilada. La metodología se realizó por triplicado (Anexo D).

3.8 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

3.8.1 Método ABTS. Con este método se estudió la actividad antioxidante de soluciones p/v de MPC (0,25%), MPX (0,05%), MPM (0,25 %), MPP (0,25%) y de las 3 fracciones purificadas por HPLC preparativa. (b= 0,012%; c= 0,020% d= 0,035%). Las soluciones se prepararon usando ácido clorhídrico 0,1%, en metanol.

Se generó el radical $ABTS^{\bullet+}$ tras la reacción de ABTS 7 mM con persulfato potásico 2,45 mM. Se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16h. Una vez formado el radical $ABTS^{\bullet+}$ se diluyó con metanol hasta obtener un valor de absorbancia de $0,7 \pm 0,2$ en una longitud de máxima absorbancia de 734 nm (Re 1999).

Para la reacción se tomó 1 mL de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ y se agregó 20 microlitros (μ L) de la solución a estudiar. Agitando constantemente durante 1 minuto y transcurridos 6 minutos de reposo se tomó lectura de la absorbancia a

734 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 11 (Re 1999).

Por medio de una curva de calibración con soluciones de Trolox a concentraciones de 0,5; 1,5 y 2 mM y siguiendo la metodología antes descrita se expresó los resultados en μmol ó en mmol de trolox/g de extracto de acuerdo a los requerimientos de cada muestra. La funcionalidad del método se verificó con un patrón de ácido ascórbico 5 mM (Anexo E) y el método se desarrolló por triplicado.

3.8.2 Método DPPH. Con este método publicado por Brand y Williams en 1995 se estudió la eficiencia anti-radical de soluciones de MPC, MPX y de las 3 fracciones purificadas por HPLC preparativa.

Se preparó una solución de DPPH^{*} a una concentración de 0,0756 mM. A partir de esta se obtuvieron diluciones a 0,0025; 0,0050; 0,0075 mM; 0,01 y 0,025 x mM, para realizar una curva de calibración de absorbancia contra concentración de DPPH^{*} a una longitud de onda de 515 nm, utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer modelo Lambda 11.

Para la reacción se tomó 3,9 mL de solución de DPPH^{*} 0,0756 mM y se midió su absorbancia a 515 nm. Posteriormente se adicionó 0,1 mL de la solución a analizar y se registró la disminución de absorbancia hasta la estabilización de la solución. El proceso se repitió con 3 soluciones de diferentes concentraciones para cada extracto. Los tiempos finales de reacción están sujetos a la naturaleza de las muestras (Anexo F).

La funcionalidad del método se verificó con patrones de ácido ascórbico y ácido gálico.

Con los resultados se graficó:

1. Absorbancia vs. [DPPH]
2. % $[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ vs. tiempo
3. % $[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ vs. tiempo del estado estacionario
4. % $[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ vs. [Antioxidante] a tiempo t
5. % de Inhibición vs. tiempo

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente expresión (Sanchez 1998):

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{\text{Absorbancia}_0 - \text{Absorbancia}_1}{\text{Absorbancia}_0} \right] * 100$$

El % $[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ se calculó utilizando la siguiente expresión (Sanchez 1998):

$$\%[\text{DPPH}^\bullet]_{\text{Remanente}} = [\text{DPPH}^\bullet]_t / [\text{DPPH}^\bullet]_{t=0}$$

El EC_{50} se define como la concentración de antioxidante necesaria para disminuir la $[\text{DPPH}^\bullet]_{\text{Remanente}}$ al 50% y el $T_{\text{EC}_{50}}$ es el tiempo en el que se obtiene el EC_{50} . Los dos parámetros resultan de las gráficas 3 y 4 y sirven para obtener la eficiencia anti-radical AE.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CLASIFICACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE DE LA PLANTA

Según los análisis desarrollados por el herbario de la Universidad de Nariño a un ejemplar de Motilón de la reserva natural El Vicundo (El Encano) (figura 23), la planta fue clasificada como *Hyeronima macrocarpa*. El herbario conserva un ejemplar de esta especie (código 031182), y la describe como sigue:

El tamaño de los árboles se encuentra entre los 3 y 5 metros, tienen hojas simples alternas de base y ápice obtuso, con un largo de 5 a 7 centímetros y un ancho de 4 a 4,5 centímetros con indumento lepidoto. La hoja cuenta con vellosidades pequeñas en la vena central hacia el lado del envés con exudado hialino al cortarse. Tienen flores dispuestas en panojas, inflorescencias de tipo ciatio con una flor central femenina y varias flores masculinas alrededor. Los frutos se encuentran dispuestos en panojas de tipo drupa, y el mesocarpio es de color azul púrpura al igual que la pulpa.

Figura 23. Árbol de Motilón (*Hyeronima macrocarpa*)



4.2 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

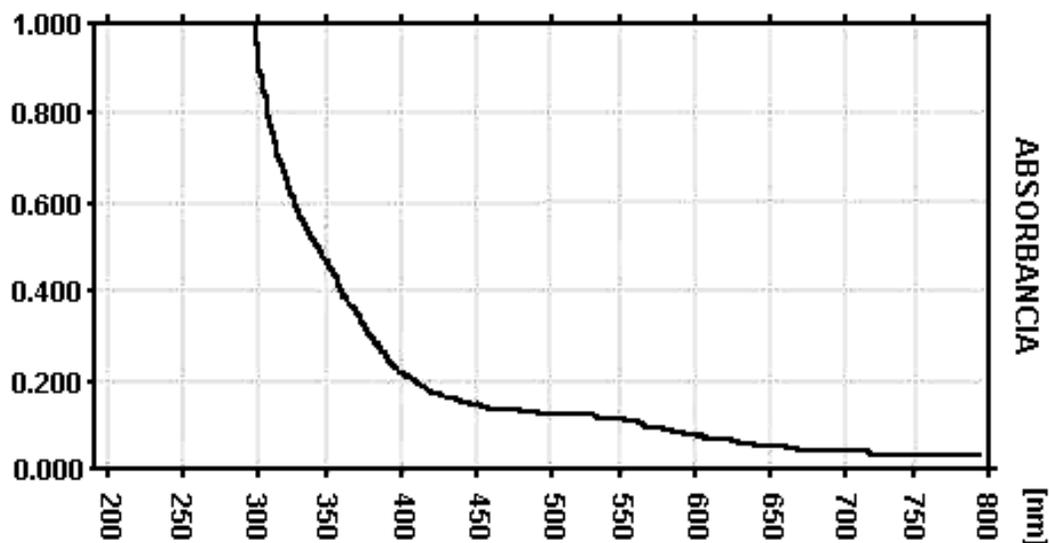
En el proceso de separación manual, se obtuvo 469,0 g de pulpa, 427,8 g de cáscara y 585,6 g de semilla. El peso del extracto crudo liofilizado (MPC) fue 75,26 g, representando el 16 % del peso total de la pulpa. Vale la pena destacar que la modificación hecha a la metodología desarrollada por Pomar (2005) fue en el proceso de maceración química (figura 24). En esta investigación se llevó cabo con agua destilada-ácido acético 19:1 y, habitualmente el solvente utilizado para este fin es una mezcla de metanol-ácido acético en proporciones 19:1. El cambio se justifica por la buena solubilidad de los pigmentos de interés en agua, demostrando que el extracto cumple con un gran requisito para ser propuesto como colorante natural en la industria alimenticia, al no necesitar solventes nocivos para la salud humana para su obtención.

Figura 24. Maceración de la pulpa de Motilón



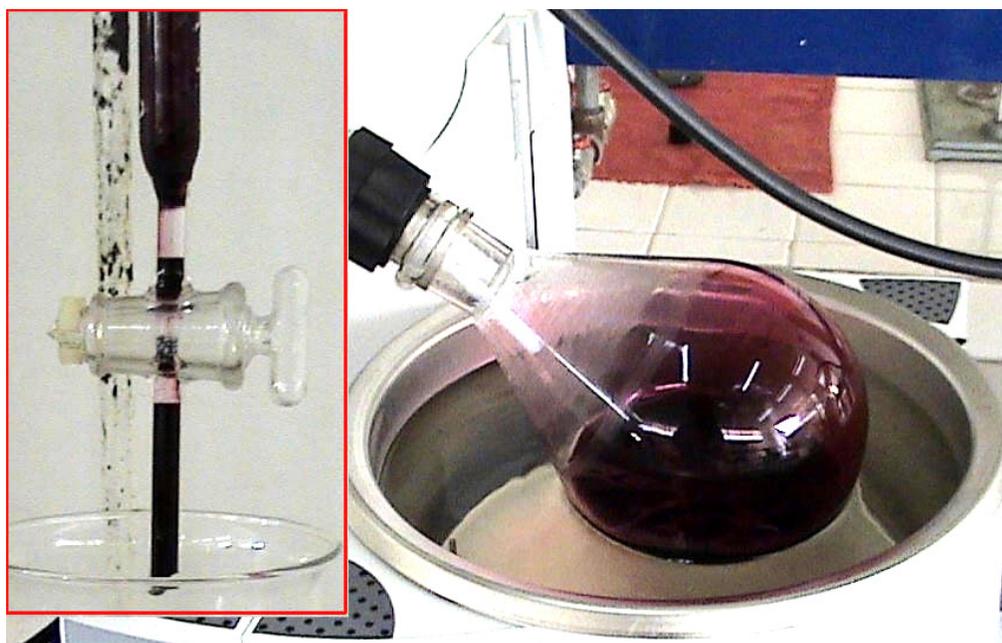
Durante los lavados con agua para la elución de azúcares y sales, en la obtención del extracto rico en polifenoles (MPX), las sustancias eluidas con agua presentaron una coloración naranja, que fue analizada por espectrofotometría UV-vis para demostrar la ausencia de pigmentos tipo antocianina (figura 25). Esto fue evidente al no presentar la banda característica de los pigmentos de estudio entre los 480 y 550 nm (Jordheim M 2007).

Figura 25. Ausencia de antocianinas en el residuo naranja obtenido en la elución con agua.



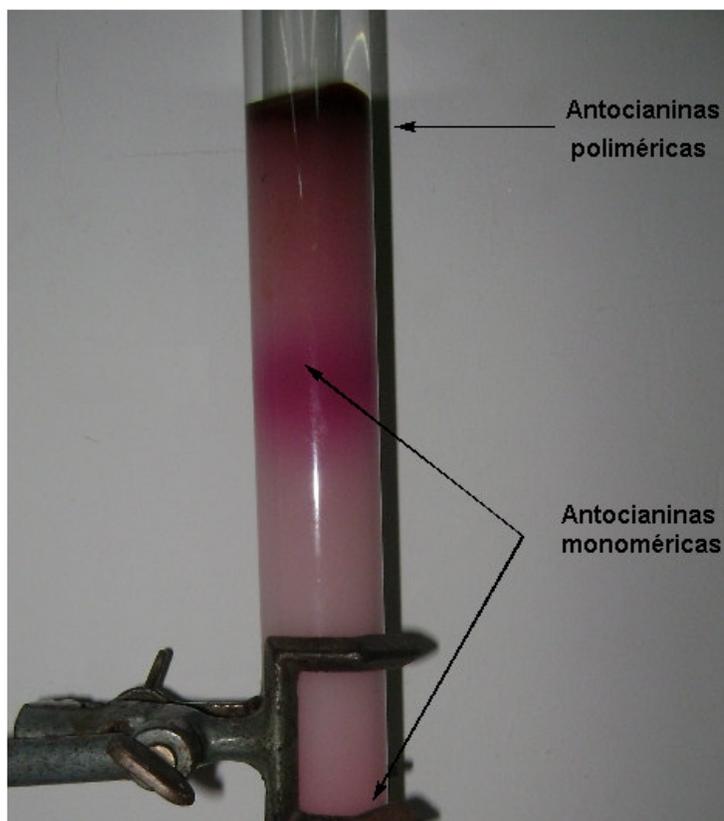
El extracto retenido en la resina, conservó su coloración visual inicial después de la elución de azúcares y sales. En el proceso de recuperación con metanol acidificado, la coloración del extracto cambió ligeramente a un color vinotinto debido a la mayor concentración de catión flavilio por influencia de la fase móvil con pH ácido (figura 26).

Figura 26. Elución y concentración del extracto MPX



En el proceso de separación de las antocianinas monoméricas y poliméricas a partir del extracto MPX, con una mezcla de metanol-agua 1:4 /ácido fórmico 0,1%, se obtuvieron dos fracciones monoméricas con diferente coloración (figura 27). Sin embargo, estas fracciones ricas en antocianinas monoméricas, fueron recolectadas en un mismo recipiente, para formar así el extracto MPM.

Figura 27. Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas



4.3 SEPARACIÓN DE LAS ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS MAYORITARIAS

El perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto rico en polifenoles MPX a una longitud de onda de 520 nm (figura 28), indica la presencia tres picos mayoritarios (b, c, d) entre los 12 y 16 minutos, quienes poseen la mayor absorbancia. También, muestra una señal con menor tiempo de retención (pico a, $t_r = 4,71\text{min}$). Los espectros de absorción Uv-vis (figura 29), permiten observar una banda característica de las antocianinas monoméricas entre los 480 y 550 nm para los picos mayoritarios b, c y d, confirmando así la presencia estos compuestos. Esta banda es muy débil para el pico a (figura 30), lo que puede evidenciar la existencia de antocianinas de tipo polimérico.

Figura 28. Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto MPX.

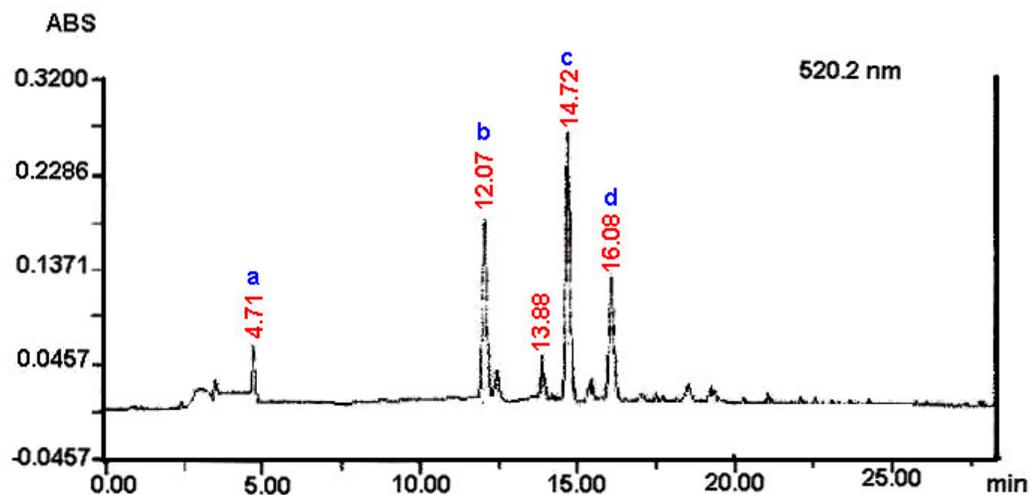


Figura 29. Espectros de absorción UV-vis de los picos: b y c del extracto MPX.

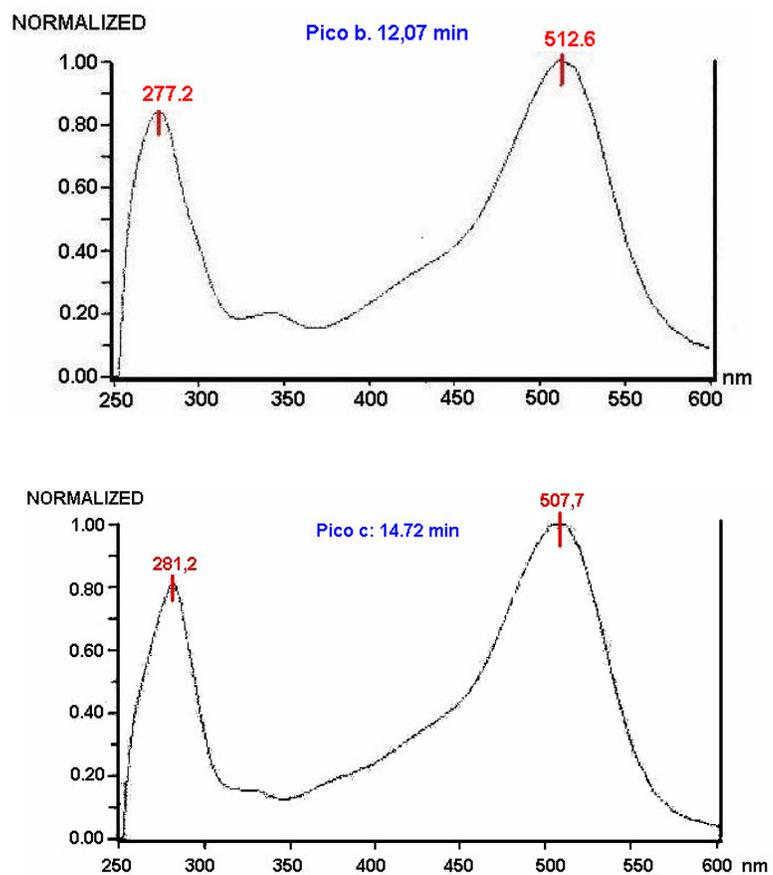


Figura 29. Espectro de absorción UV-vis del pico: d del extracto MPX (Continuación).

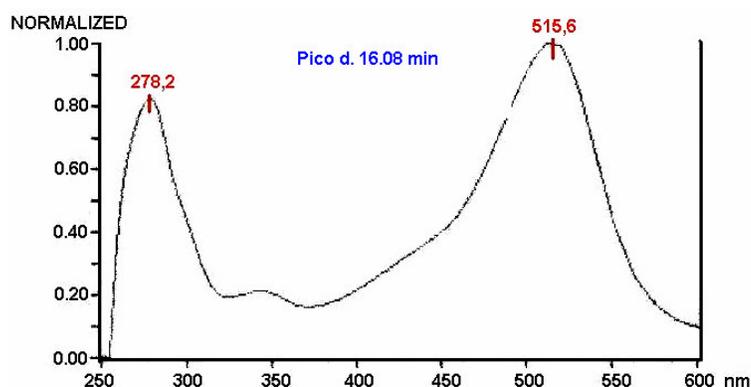
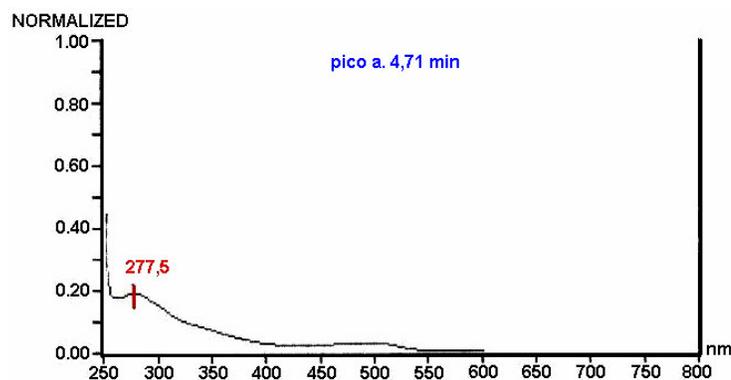


Figura 30. Espectro de absorción UV-vis del pico: a del extracto MPX.

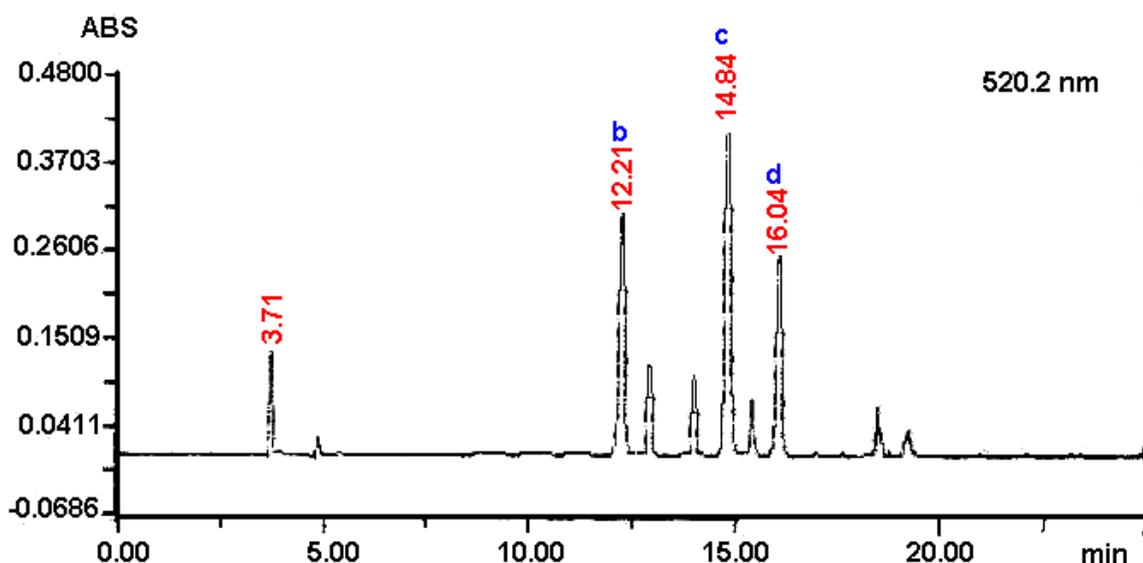


Al comparar el perfil cromatográfico del extracto rico en antocianinas monoméricas (MPM) (figura 31) respecto al perfil CLAE-DAD del extracto MPX se observó una notable disminución en la señal del pico a asignada a antocianinas poliméricas, debido a la purificación con Sephadex LH-20, incrementando la absorbancia de las señales correspondientes a antocianinas monoméricas. Los tiempos de retención de los picos b, c y d son similares en los perfiles de los dos extractos como lo indica la tabla 3.

Tabla 3. Tiempos de retención en las antocianinas de los extractos MPX y MPM.

Extracto	Tiempo de retención		
	b	c	d
MPX	12,07	14,72	16,08
MPM	12,21	14,84	16,04

Figura 31. Perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto MPM

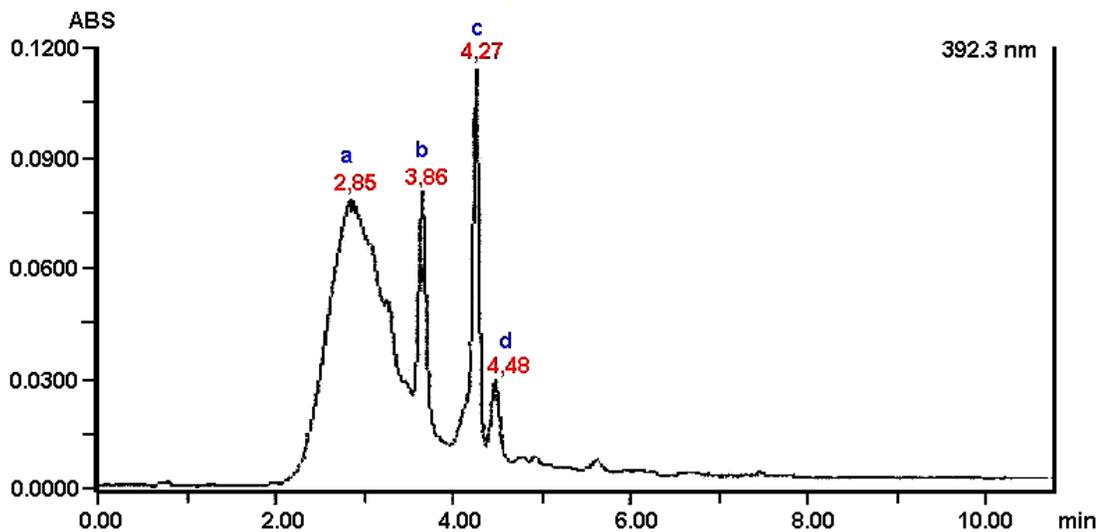


La fracción rica en antocianinas poliméricas (MPP) también fue analizada por medio de CLAE-DAD. Los cromatogramas muestran un gran número de señales, como se mencionó anteriormente, posiblemente originadas por compuestos de tipo polimérico que requieren un estudio diferente al de esta investigación. En la sección de anexos (Anexo G) se muestra los perfiles obtenidos, como un posible antecedente para posteriores investigaciones.

Así, Comparando el perfil cromatográfico (CLAE-DAD) del extracto rico en polifenoles (MPX; figura 28) con el del extracto rico en antocianinas monoméricas (MPM; figura 31), se observó una gran similitud entre los dos. Por esta razón la separación de antocianinas por CLAE preparativa, se realizó al extracto MPX, atendiendo a la baja complejidad de su perfil cromatográfico. Esto evitó la separación cromatográfica por Sephadex LH-20 de una cantidad mayor del extracto MPX, economizando tiempo y disminuyendo el costo de los análisis.

El perfil cromatográfico obtenido por medio de un método de separación isocrático (figura 32), permitió purificar las antocianinas mayoritarias, que eluyeron en un tiempo de análisis menor a 8 minutos. Los pesos obtenidos en este proceso para las antocianinas monoméricas b, c, y d fueron: 3,5; 1,1 y 1,9 mg respectivamente.

Figura 32. Perfil cromatográfico de la de separación isocrática.



4.4 DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

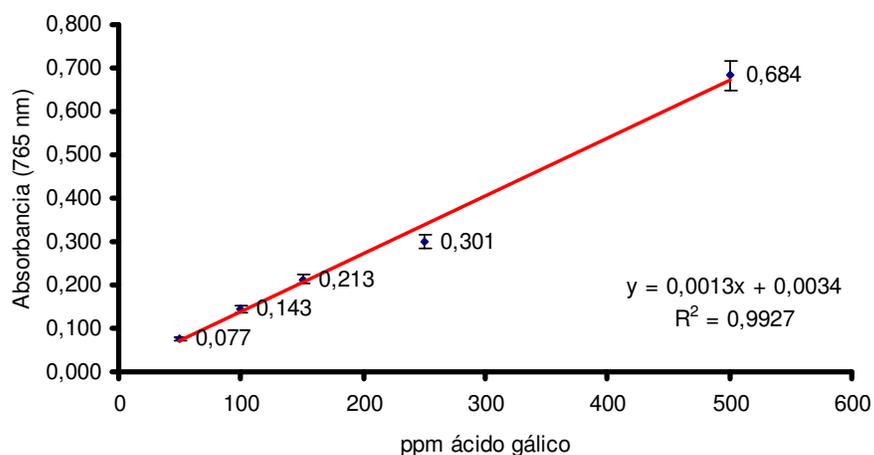
La tabla 4 muestra los resultados por triplicado de la prueba de Folin Ciocalteu en 5 patrones de ácido gálico, utilizados para realizar una curva de calibración promedio, que en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación : $y = 0,0013x + 0,0034$ (R^2 0,9927) (gráfico 1). La intensidad de la coloración azul observada para cada patrón es función de la cantidad de fenoles encontrados en cada una de ellas.

Tabla 4. Resultados de la prueba de Folin Ciocalteu con patrones de ácido gálico.

A. gálico ppm	Abs ^a 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	DE ^b	CV ^c
50	0,071	0,085	0,076	0,077	0,007	9,174
100	0,139	0,149	0,142	0,143	0,005	3,580
150	0,208	0,216	0,214	0,213	0,004	1,958
250	0,297	0,306	0,299	0,301	0,005	1,572
500	0,672	0,691	0,688	0,684	0,010	1,494

a: Absorbancia; b: Desviación estándar; c: Coeficiente de variación.

Gráfico 1. Curva de calibración para determinación de fenoles totales con ácido gálico.



La tabla 5 muestra el contenido de fenoles totales obtenidos para el extracto crudo (MPC) y el extracto rico en polifenoles (MPX). El extracto MPC, presentó un contenido de fenoles totales igual a 3895,385 ($\pm 30,769$) mg de ácido gálico /100 g de extracto, mientras que el contenido fenólico del extracto MPX fue de 35508,072 ($\pm 358,492$), equivalente a un incremento aproximadamente de 10 veces en cantidad de polifenoles. Este valor muestra el enriquecimiento de antocianinas proporcionado por la purificación del extracto MPC por medio de la columna con resina XAD-7.

Tabla 5. Contenido de fenoles totales de los extractos MPC y MPX.

Extracto	Réplica	ppm A. gálico	Fenoles Totales ^a
MPC	1	97,385	3895,385
	2	96,615	3864,615
	3	98,154	3926,154
	Promedio	97,385	3895,385
	DE ^b	0,769	30,769
	CV ^c	0,790	0,790
MPX	1	193,538	35840,456
	2	192,000	35555,556
	3	189,692	35128,205
	Promedio	191,744	35508,072
	DE	1,936	358,492
	CV	1,010	1,010

a: mg de ácido gálico/100 g de extracto.

b: Desviación estándar; c: Coeficiente de variación.

4.5 DETERMINACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS TOTALES Y COLOR POLIMÉRICO

La tabla 6 muestra el contenido de antocianinas monoméricas totales en los extractos: crudo (MPC), rico en polifenoles (MPX), rico en antocianinas monoméricas (MPM) y rico en antocianinas poliméricas (MPP), determinado por medio del método del pH diferencial.

Tabla 6. Contenido de antocianinas monoméricas totales en los extractos estudiados.

Réplica	Antocianinas monoméricas totales ^a			
	Extracto MPC	Extracto MPX	Extracto MPM	Extracto MPP
1	2387,523	8629,984	10093,760	887,426
2	2410,901	8603,265	10019,331	906,511
3	2422,591	8683,420	9981,162	896,969
Promedio	2407,005	8638,890	10031,418	896,969
DE ^b	17,856	40,813	57,264	9,542
CV ^c	0,742	0,472	0,571	1,064

a: mg de cianidina-3-glucósido/ 100 g de extracto.

b: Desviación estándar; c: Coeficiente de variación.

El extracto de pulpa crudo (MPC) presentó un contenido de 2407,005 ($\pm 17,856$) mg de antocianina/100 g de extracto, mientras que en el extracto rico en polifenoles (MPX), el contenido de antocianinas totales se incrementó más de 3 veces gracias a la purificación hecha con resina XAD-7. Además se observa una relación entre el contenido de fenoles totales retenidos en la resina XAD-7 y el contenido de antocianinas, demostrando la afinidad de este tipo de soportes por los pigmentos antociánicos.

Como era de esperarse, el extracto rico en antocianinas monoméricas (MPM) presentó el mayor contenido de antocianinas monoméricas entre los demás extractos (10031,418 ($\pm 57,264$) mg de antocianina/100 g de extracto), mientras que la cantidad de estos metabolitos en el extracto MPP fue aproximadamente 11 veces menor, demostrando la eficiencia del proceso de separación por sephadex LH-20.

La tabla 7 muestra los porcentajes de color polimérico en los extractos MPC, MPX, MPM y MPP determinados con el método del pH sustractivo. El extracto MPC tiene un porcentaje de color polimérico igual a 4,15 % ($\pm 0,13$). Para el extracto MPX este porcentaje aumentó a 38,83% ($\pm 1,23$), confirmando que estos compuestos (más polares) son igualmente retenidos en XAD-7. Además el

extracto de mayor % de color polimérico fue el extracto MPP y el de menor fue el MPM, mostrando la buena separación con Sephadex LH-20.

Tabla 7. Porcentaje de color polimérico en los extractos estudiados.

Réplica	% De color polimérico			
	Extracto MPC	Extracto MPX	Extracto MPM	Extracto MPP
1	4,31	39,38	2,53	77,39
2	4,08	37,44	2,54	78,84
3	4,07	39,70	2,53	76,70
Promedio	4,15	38,83	2,53	77,64
DE ^a	0,13	1,23	0,00	1,09
CV ^b	3,21	3,16	0,16	1,40

a: Desviación estándar; b: Coeficiente de variación.

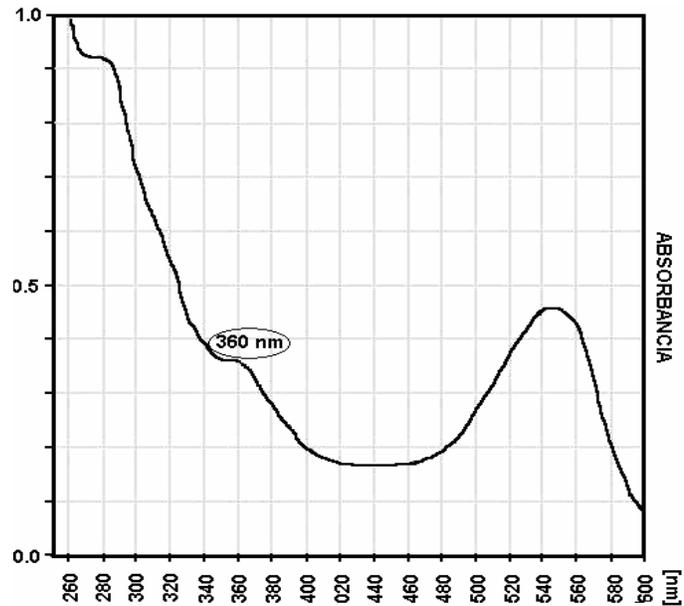
4.6 IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS MAYORITARIAS

La tabla 8 muestra los resultados de los parámetros calculados por medio de espectroscopia Uv-vis. Las relaciones de $A_{\lambda 440}/A_{\lambda \text{vis-max}}$ mayores a 0,2 en las tres antocianinas, sugieren que el azúcar se encuentra enlazado al carbono 3 de la aglicona (Jordheim M 2007). El bajo valor encontrado para la relación $A_{\lambda \text{Uv max}}/A_{\lambda \text{vis-max}}$ en las antocianinas c y d, indica la ausencia de grupos acilo en la molécula (Jordheim 2007), mientras que en la antocianina b (figura 33), este valor, sugiere la existencia de un sustituyente acilo aromático en la estructura (Heidari 2004).

Tabla 8. Parámetros de espectroscopia Uv-vis en las antocianinas mayoritarias de la pulpa del fruto de Motilón.

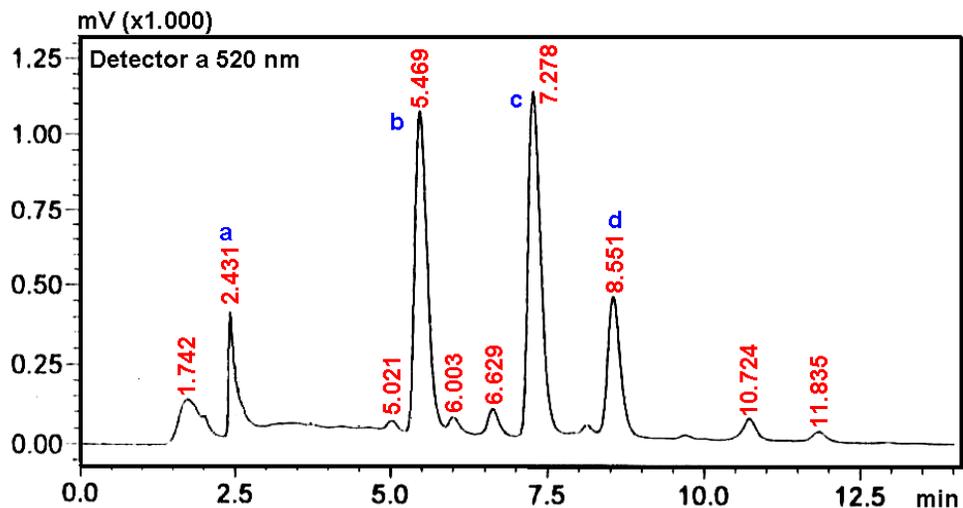
Antocianina	$\frac{A_{\lambda 440}}{A_{\lambda \text{vis max}}}$	$\frac{A_{\lambda \text{Uv max}}}{A_{\lambda \text{vis max}}}$
b	0,418	0,636
c	0,214	0,186
d	0,251	0,222

Figura 33. Espectro Uv-vis de la antocianina b.



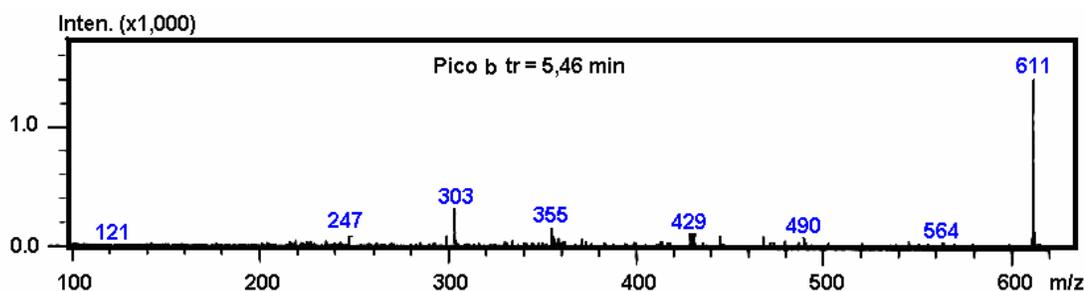
El perfil obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) del extracto rico en polifenoles (MPX) (figura 34), es semejante al del análisis con CLAE-DAD, aunque se alteran los tiempos de retención, como producto de las diferencias en las condiciones de separación. Los picos de las antocianinas b, c y d fueron analizados por espectrometría de masas, con el fin de identificar los iones fragmento, pertenecientes a las 3 señales. El pico a, no fue analizado por espectrometría de masas, porque pertenece a compuestos de tipo polimérico, que no son objeto de este estudio.

Figura 34. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) del extracto MPX.



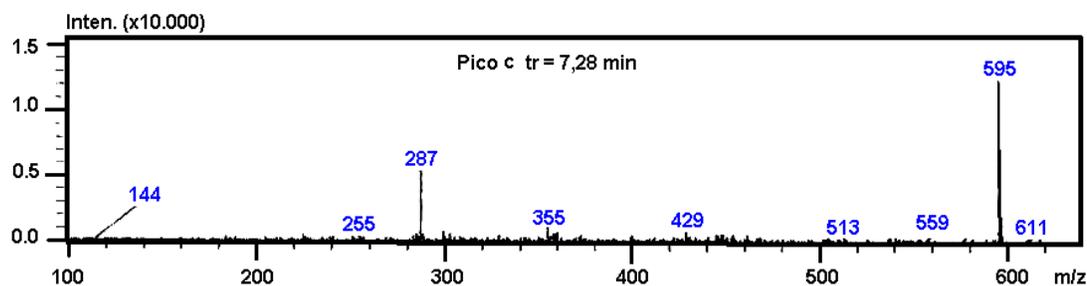
La antocianina b, muestra un espectro en el que sobresalen dos señales intensas (figura 35). La señal de mayor relación masa carga (m/z) 611, corresponde al ión molecular $[M]^+$ de la antocianina, que se fragmenta hasta llegar a una m/z de 303, perteneciente a la delphinidina (Wang 2003). El ión molecular de m/z 611 podría pertenecer a la estructura de la delphinidina-3-rutinósido, sin embargo según lo discutido anteriormente con los datos Uv-Vis es posible que en la estructura exista un grupo acilo. De esta manera la estructura más probable es la delphinidina-3-cumaroil-hexosa, al ser consistente con las dos señales que se observan en el espectro de masas, originando el fragmento de la aglicona, por la pérdida del azúcar y el grupo acilo ($[M - C_{15}H_{17}O_7]^+$). Comúnmente la hexosa presente en el 90 % de las antocianinas es la glucosa (Rein 2005), pero la espectrometría de masas no permite diferenciar entre ésta y sus demás isómeros. Por esta razón es necesario llevar a cabo un análisis de resonancia magnética nuclear, para la elucidación estructural de la molécula.

Figura 35. Espectro de masas de la antocianina b del extracto MPX.



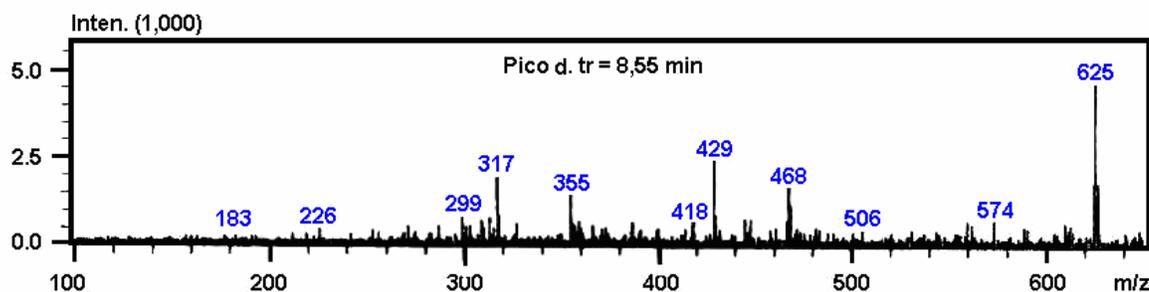
En el espectro de masas de la antocianina c (figura 36), se observa una señal con m/z de 595, y un fragmento de m/z 287 perteneciente a la molécula de cianidina (Wang 2003). El ión molecular con m/z de 595 sugiere que la aglicona puede estar enlazada a un biósido hexosa-hexosa ó una hexosa acilada con un grupo cumaroilo. El análisis por espectroscopía Uv-vis, permitió descartar la presencia de un grupo acilo en la molécula y sugerir que el enlace aglicona-azúcar se presenta en el carbono 3. De ésta manera la estructura más probable para la antocianina c es la cianidina-3-hexosa-hexosa.

Figura 36. Espectro de masas de la antocianina c del extracto MPX



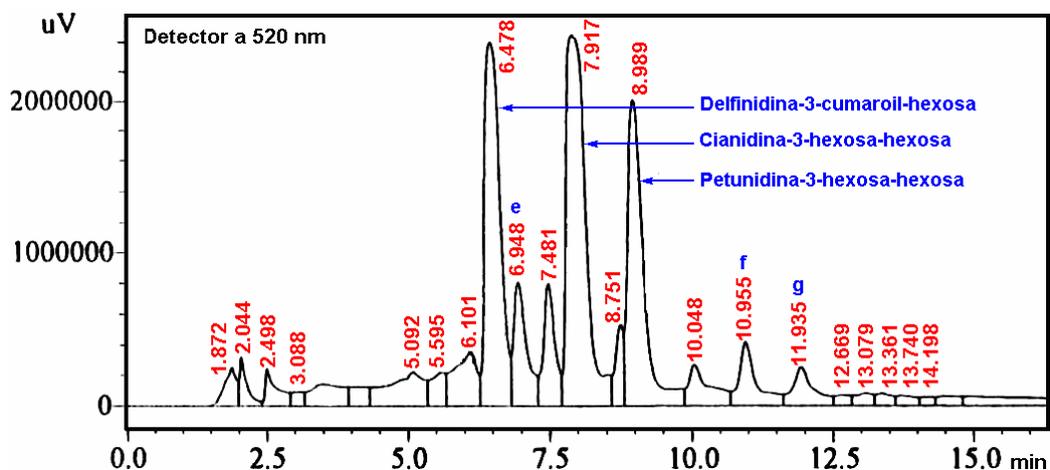
Para el caso del pico d, el espectro de masas (figura 37) presentó un ión molecular $[M]^+$ de m/z 625, que se fragmenta hasta una m/z de 317 $[M - C_{12}H_{21}O_9]^+$ correspondiente a la petunidina (Wang 2003). La información de Uv-vis sugiere un enlace aglicona-azúcar en el carbono 3 y ausencia de grupos acilo. Estos datos indican que la petunidina-3-hexosa-hexosa, es la antocianina más probable.

Figura 37. Espectro de masas de la antocianina d del extracto MPX.



El perfil cromatográfico (CLAE-EM) del extracto rico en antocianinas monoméricas (MPM) (figura 38), muestra otras señales, que se discuten a continuación, con sus respectivos sus espectros de masas (figura 39).

Figura 38. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) del extracto MPM



El pico e con tiempo de retención (tr) de 6,95 minutos (figura 38), exhibe en su espectro de masas tres señales con características que sugieren la presencia de un compuesto antocianico 3,5-diglicosidado (Escribano 2004; Wang 2003). La señal con m/z de 611 (de baja intensidad) corresponde al ión molecular $[M]^+$, la segunda pertenece al fragmento con m/z de 449, originado por la pérdida de una hexosa ($[M - C_6H_{11}O_5]^+$) y la tercera señal es el fragmento con m/z de 287 ($[M - C_6H_{11}O_5 - C_6H_{11}O_5]^+$) que caracteriza a la aglicona. Podrían existir dudas frente a la

posibilidad de que la antocianina no fuera un diglicósido sino un monoglicósido, debido a la baja intensidad de la señal que se propone como ión molecular. Pero es conocido que la polaridad de las antocianinas sustituidas con un monosacárido es menor que las sustituidas por un disacárido (Escribano 2004). Por lo tanto, la antocianina no corresponde a una cianidina-3-hexosa, porque la polaridad del compuesto hace que su tiempo de retención sea menor incluso que el de la cianidina-3-hexosa-hexosa (biósido), la cual es mucho más polar que la cianidina-3-hexosa. Esto indica que la estructura de la cianidina-3-hexosa-5-hexosa (diglicósido) resulta más probable. Los picos f ($t_r = 10,955$) y g ($t_r = 11,935$), presentan fragmentos de aglicona con m/z de 301 (peonidina) y 331 (malvidina) respectivamente, pero en la literatura científica no se encontraron datos sobre los pesos moleculares.

Figura 39. Espectros de masas de las antocianinas presentes en el extracto MPM.

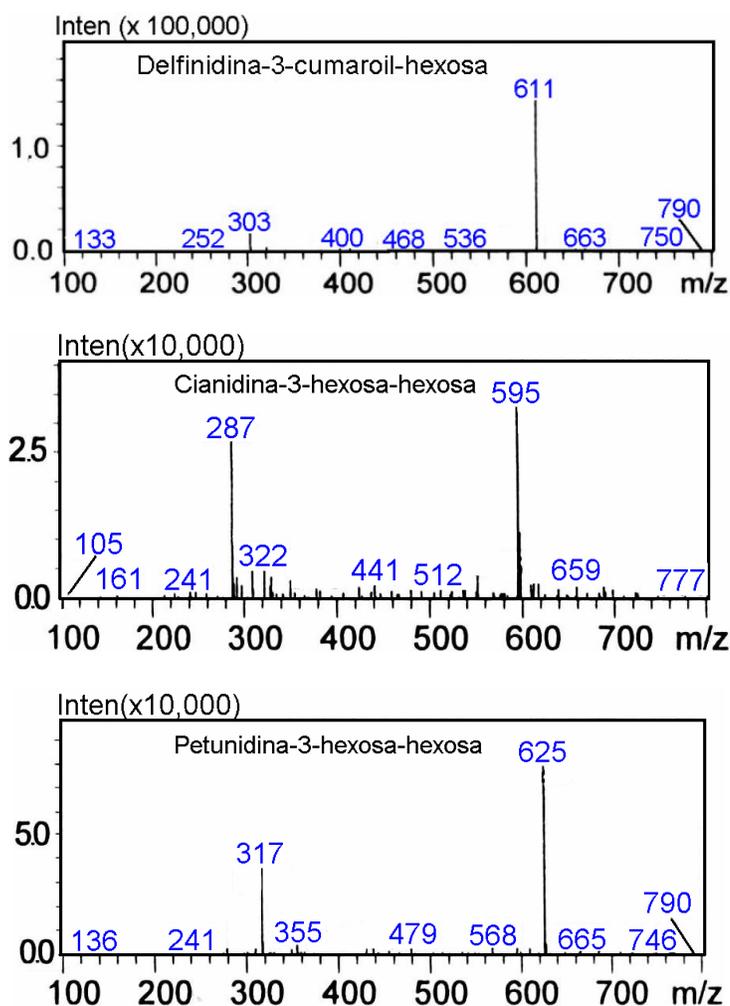
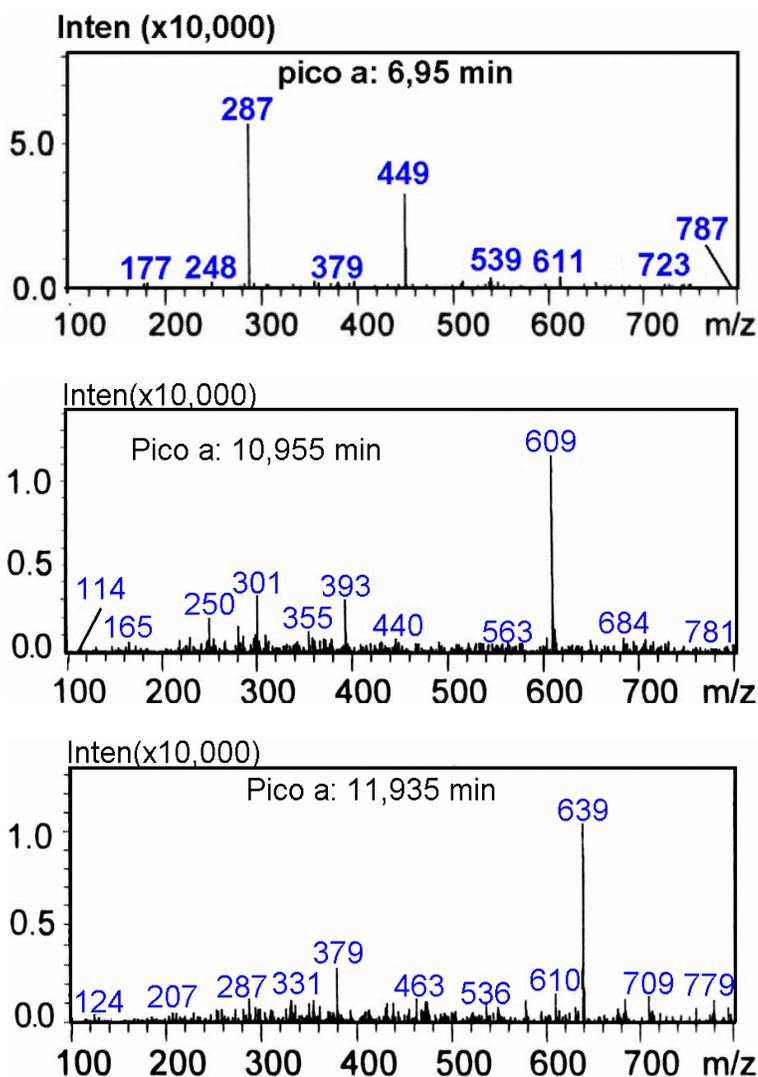
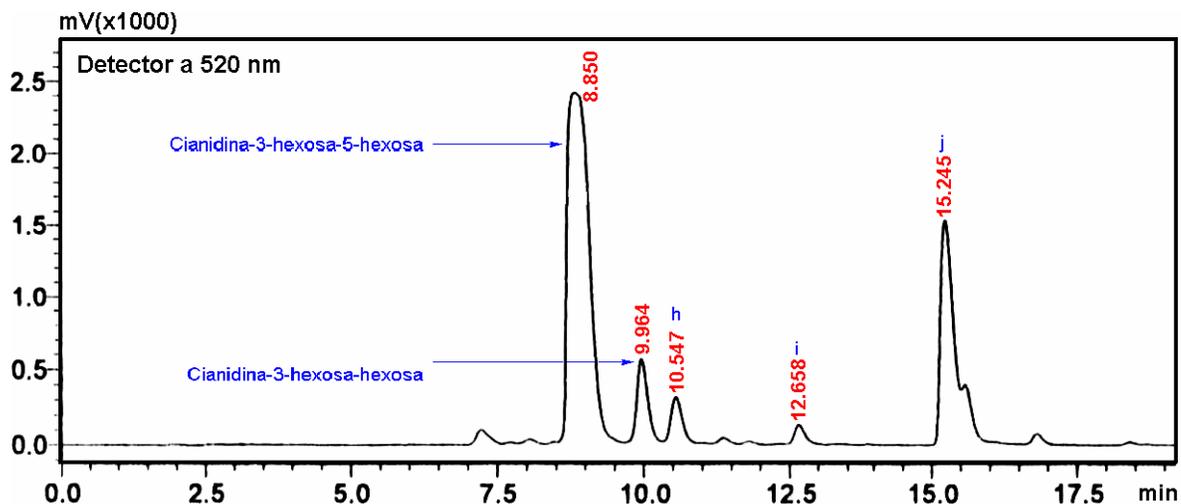


Figura 39. Espectros de masas de las antocianinas presentes en el extracto MPM (continuación)



Al comprobar la pureza de las antocianinas separadas por cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa, se obtuvo resultados satisfactorios para la delfinidina-3-cumaroil-hexosa (b, figura 32) y petunidina-3-hexosa-hexosa (d, figura 32), mientras que el compuesto c, que se creía puro, finalmente resultó una mezcla (fracción c), que mostró la presencia de 3 derivados de la cianidina, un derivado de la petunidina y otro de la peonidina, según el perfil CLAE-EM (figura 40) y los respectivos espectros de masas (figura 41).

Figura 40. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) de la fracción c.



Los espectros de masas de los picos con tiempo de retención (tr) de 8,850 y 9,964 minutos, son los mismos a los asignados para la cianidina-3-hexosa-5-hexosa y cianidina 3-hexosa-hexosa y propuestos para las señales e (figura 38) y c (figura 34) respectivamente. Los picos h, i y j, indican señales con m/z de 317(h), 301(i) y 287 (j) que corresponden a las agliconas: petunidina poeonidina y cianidina respectivamente. No es posible sugerir una estructura de estos compuestos, ya que la señal de los iones moleculares, no coinciden con los iones moleculares publicados en la literatura para antocianinas que poseen azúcares y/o grupos acilo comunes.

Figura 41. Espectros de masas de las antocianinas mayoritarias de la fracción FC

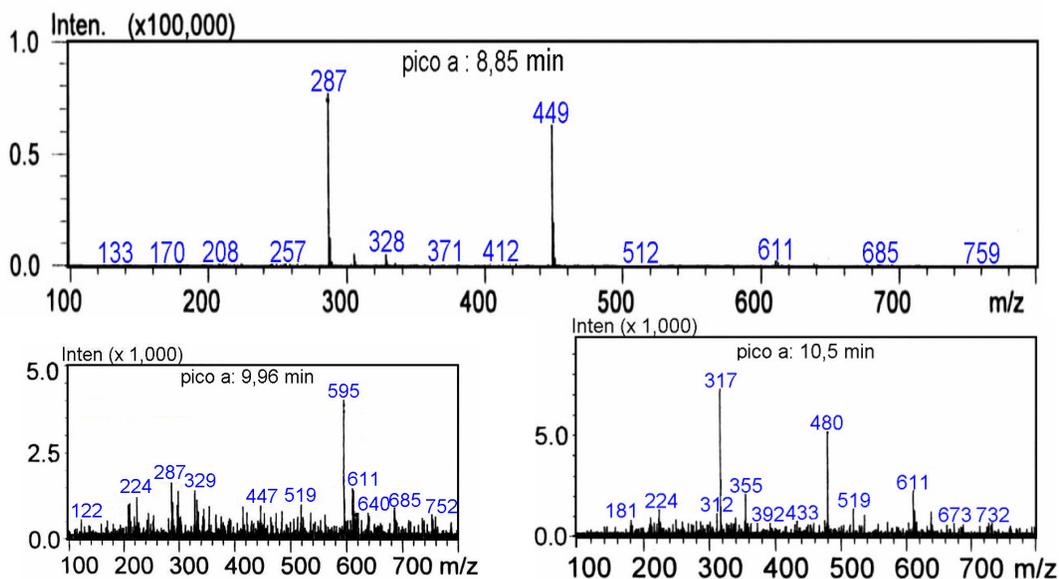
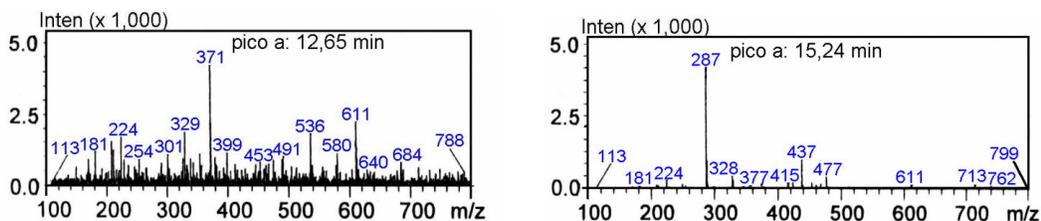


Figura 41. Espectros de masas de las antocianinas mayoritarias de la fracción FC (continuación).



En resumen, por medio de cromatografía (CLAE), espectroscopía Uv-vis y espectrometría de masas, se sugieren como antocianinas mayoritarias en la pulpa del Motilón las siguientes: delfinidina-3-cumaroil-hexosa, cianidina-3-hexosa-5-hexosa, cianidina-3-hexosa-hexosa, petunidina-3-hexosa-hexosa y algunos derivados de peonidina, malvinidina, cianidina y petunidina con pesos moleculares no publicados en la literatura científica.

4.7 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN-VITRO*

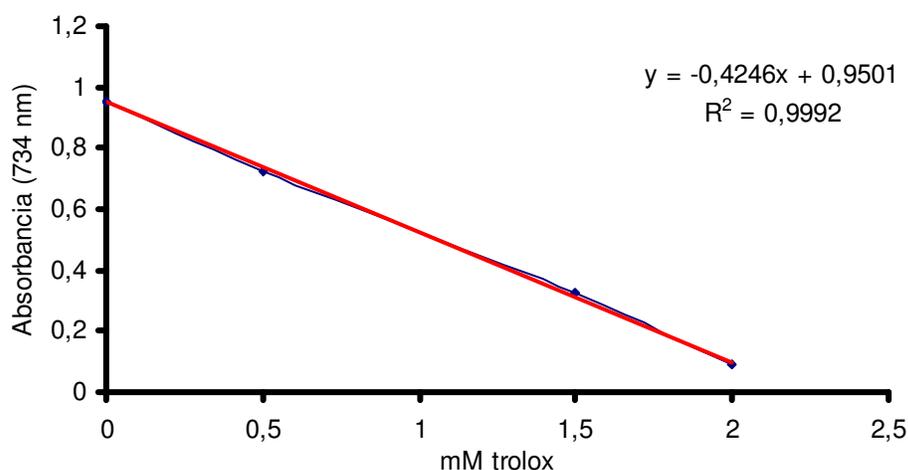
4.7.1 Método ABTS. La curva de calibración con patrones de trolox realizada por triplicado, arrojó la siguiente relación promedio (gráfico 2): $y = -0,4246x + 0,9501$ ($R^2 = 0,9992$). La pendiente negativa indica la decoloración que sufre el catión radical ABTS al reaccionar con el antioxidante. Las concentraciones y absorbancias obtenidas se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados de la prueba ABTS con patrones de trolox

Trolox (mM)	Abs ^a 1	Abs 2	Abs 3	Promedio	DE ^b	CV ^c
0	0,955	0,955	0,955	0,955	-	-
0,5	0,734	0,717	0,729	0,727	0,009	1,202
1,5	0,31	0,341	0,328	0,326	0,016	4,770
2	0,092	0,101	0,089	0,094	0,006	6,644

a: Absorbancia; b: Desviación estandar; c: Coeficiente de variación

Gráfico 2. Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante en TEAC.



La funcionalidad del método se comprobó utilizando un patrón de ácido ascórbico 5 mM, del cual se obtuvo un valor de 0,999 (\pm 0,019) mM de trolox (tabla 10), similar al resultado publicado por Re en 1999 ($1,05 \pm 0,02$). En la tabla 10 se presenta los resultados de actividad antioxidante para los extractos: crudo (MPC), rico en polifenoles (MPX), rico en antocianinas monoméricas (MPM) y rico en antocianinas monoméricas (MPP).

Los extractos de mayor actividad antioxidante fueron el MPX ($1,729 \pm 0,005$ mmol de trolox/g extracto) debido a la mayor concentración de polifenoles y, el MPM ($1,474 \pm 0,029$ mmol de trolox/g extracto) debido a la mayor concentración de antocianinas monoméricas. Esto evidencia una buena eficiencia del proceso de separación cromatográfica y una clara relación entre el contenido de antocianinas (polifenoles) con la capacidad antioxidante del extracto.

Tabla 10. Resultados de TEAC en los extractos estudiados y en el patrón de ácido ascórbico.

Réplica	TEAC ^a				
	Extracto MPC	Extracto MPX	Extracto MPM	Extracto MPP	Ácido ascórbico ^d
1	0,247	1,734	1,465	1,009	0,978
2	0,243	1,729	1,451	1,017	1,004
3	0,245	1,724	1,506	0,986	1,015
Promedio	0,245	1,729	1,474	1,004	0,999
DE ^b	0,002	0,005	0,029	0,016	0,019
CV ^c	0,769	0,273	2,008	1,603	1,931

a: mmol de trolox/g extracto; b: Desviación estándar
c: Coeficiente de variación; d: mM Trolox.

En la tabla 11 se presenta los resultados de la prueba ABTS para las antocianinas aisladas de la pulpa de Motilón y para la fracción rica en derivados de la cianidina (FC). Los resultados muestran a la delfinidina-3-cumaroil hexosa (Dp-3-cum-hex), como el compuesto con mayor actividad antioxidante, seguido por la fracción FC y la petunidina-3-hexosa-hexosa (Pt-3-hex-hex).

Tabla 11. Resultados de TEAC en las antocianinas aisladas y en la fracción FC.

Réplica	TEAC ^a		
	Dp-3-cum-hex	FC	Pt-3-hex-hex
1	2,572	1,767	0,956
2	2,552	1,779	0,942
3	2,591	1,755	0,949
Promedio	2,572	1,767	0,949
DE ^b	0,020	0,012	0,007
CV ^c	0,763	0,667	0,719

a: mmol de trolox/g antocianina; b: Desviación estándar
c: Coeficiente de variación

Según Kuskoski (2004), la mayor actividad antioxidante de la Dp-3-cum-hex, se explica por la presencia de sus 3 grupos hidroxilo en las posiciones 3` 4` y 5`. La fracción FC sigue en orden de actividad antioxidante, gracias a que las estructuras de los derivados de la cianidina, tienen en la aglicona dos grupos hidroxilo en posición 3` y 4`. Finalmente la menor actividad antioxidante de la Pt-3-hex-hex, se debe a la presencia de grupos hidroxilo en las posiciones 4`y 5` pero con un metoxilo en 3`que causa mayor disminución de esta función que el hidrógeno.

4.7.2 Método DPPH. El primer paso en el desarrollo de este método es la preparación de una curva de calibración de absorbancia vs. $C_{DPPH^{\bullet}}$ (tabla 12 y gráfico 3) para obtener la siguiente relación matemática: $Y = 10,4X + 0,0026$ ($R^2 = 0,9998$), que sirve para calcular la $[DPPH^{\bullet}]$ a tiempo t.

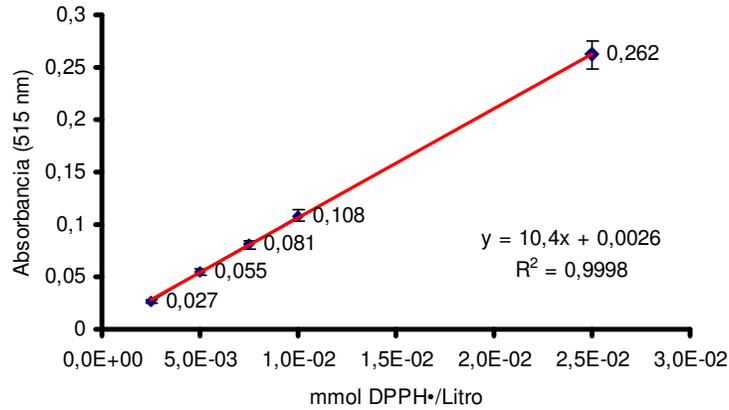
Tabla 12. Valores de absorbancia determinados en varias Concentraciones de DPPH[•].

$C_{DPPH^{\bullet}} (x10^{-3})^a$	2,5	5	7	10	25
Absorbancia	0,027	0,055	0,081	0,108	0.262

a: Expresado en mmol/litro de solución.

Para tener un punto de referencia sobre la eficiencia anti-radical (EA), se desarrolló la prueba del radical DPPH[•] a patrones de ácido ascórbico (alta eficiencia) y ácido gálico (mediana eficiencia) estudiados anteriormente por Sánchez (1997).

Gráfico 3. Curva de absorbancia vs. Concentración de DPPH*.



La tabla 13 muestra los resultados de la prueba para estos patrones. El $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ y el tiempo presentados en la tabla para las diferentes concentraciones de patrón, corresponden a la concentración DPPH* que permanece en solución, al llegar a su estado estacionario y cuanto tarda para dicho fin. Estos resultados permitieron elaborar una gráfica de $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ vs. concentración de antioxidante, con la cual se obtuvo la concentración de antioxidante necesaria para disminuir el $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ al 50% (Ec_{50}) por medio de la expresión: $Y = 72,713e^{-0,0048x}$ ($R^2=0,999$) para el ácido ascórbico (gráfico 4) e $Y = 75,896e^{-0,0161x}$ ($R^2= 988$) para el ácido gálico. Para obtener el tiempo necesario para alcanzar el Ec_{50} ($T_{\text{Ec}50}$), la gráfica realizada con el $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$ a diferentes concentraciones de patrón vs. tiempo, respondió a la expresión: $Y = -0,724x + 100,16$ ($R^2=0,9983$) para el ácido ascórbico (gráfico 5) e $Y = -12,311x + 235,69$ ($R^2 0,992$) para el ácido gálico.

Gráfico 4. Curva para determinar el Ec_{50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico.

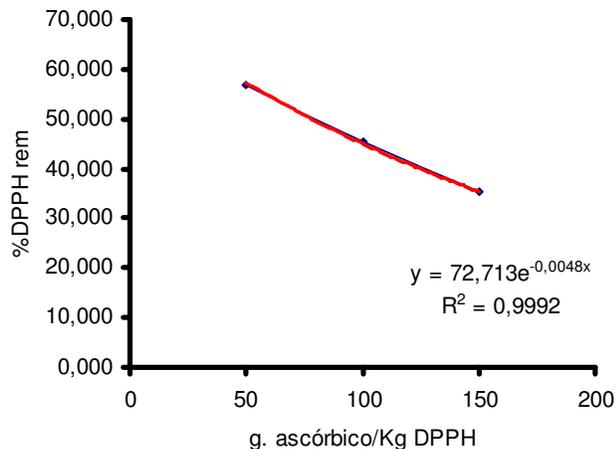
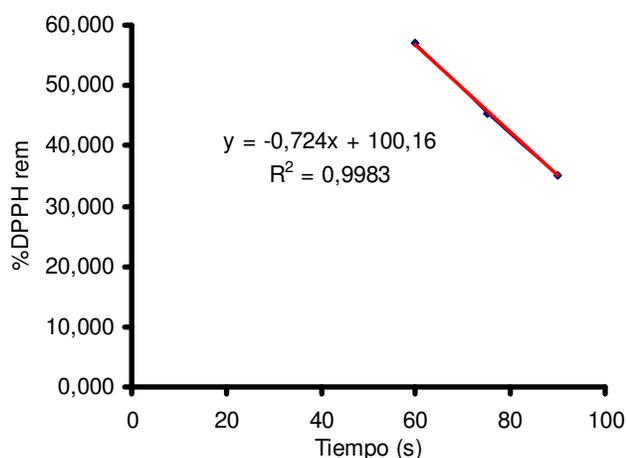


Gráfico 5. Curva para determinar el T_{EC50} con diferentes concentraciones de ácido ascórbico.



Las concentraciones de los patrones fueron expresadas como g de antioxidante/Kg DPPH[•], con el fin de comparar los resultados obtenidos con los desarrollados por Sánchez (1997). Esta forma de expresar las concentraciones se obtiene con el producto de la concentración de antioxidante (g/L) por el volumen de antioxidante utilizado (numerador) y el producto de la concentración (Kg/L) de DPPH[•] por el volumen de DPPH[•] utilizado para llevar a cabo la reacción (denominador).

Tabla 13. Eficiencia anti-radical en ácido ascórbico y gálico.

Patrón	$C_{\text{patrón}}^a$	%[DPPH [•]] Rem	Tiempo (min)	EC_{50}	T_{EC50} (min)	EA $\times 10^{-3}$	EA ^b $\times 10^{-3}$
Ácido ascórbico	50	56,98	1	78,020	1,155	11,100	11,440
	100	45,34	1,25				
	150	35,26	1,5				
Ácido gálico	20	52,30	15	25,922	15,083	2,558	2,620
	50	36,81	16				
	100	14,73	18				

a: g de antioxidante/Kg de DPPH; b: Tomado de Sanchez 1997.

El comportamiento de las diferentes concentraciones de los patrones antioxidantes frente al radical DPPH[•] (gráficos 6 y 7) muestra que una mayor concentración de antioxidante deja menor %[DPPH[•]]_{Remanente} y tiene mayor porcentaje de inhibición radical, aunque tarda más tiempo en reaccionar. Es importante resaltar que se trabajó en un rango de concentraciones dentro del cual la prueba responde a un comportamiento directamente proporcional.

Gráfico 6. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido ascórbico frente al radical DPPH[•]

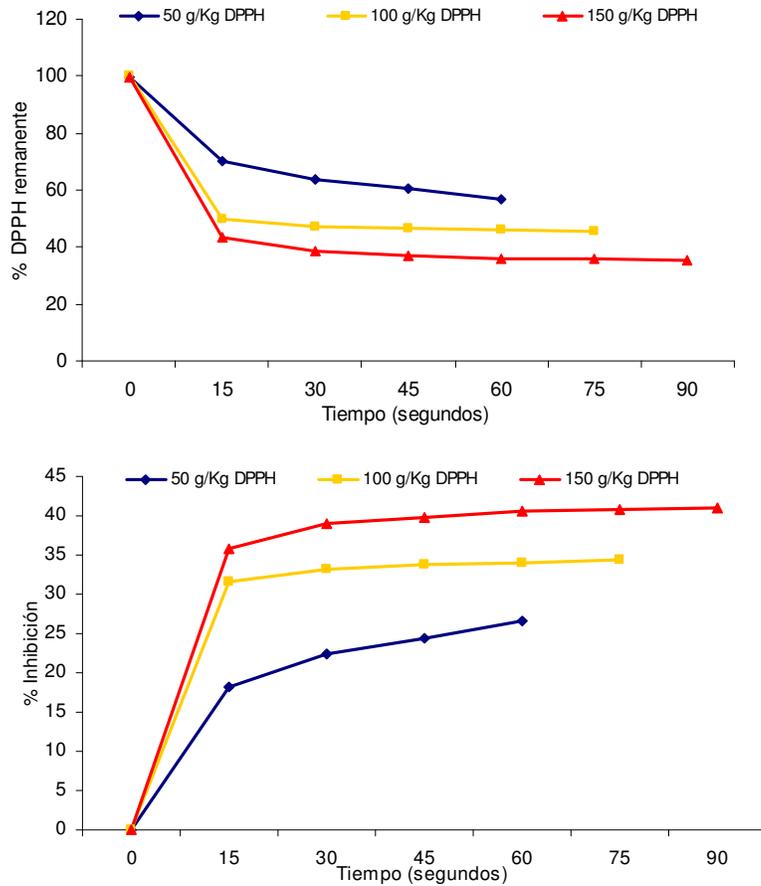


Gráfico 7. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido gálico frente al radical DPPH[•].

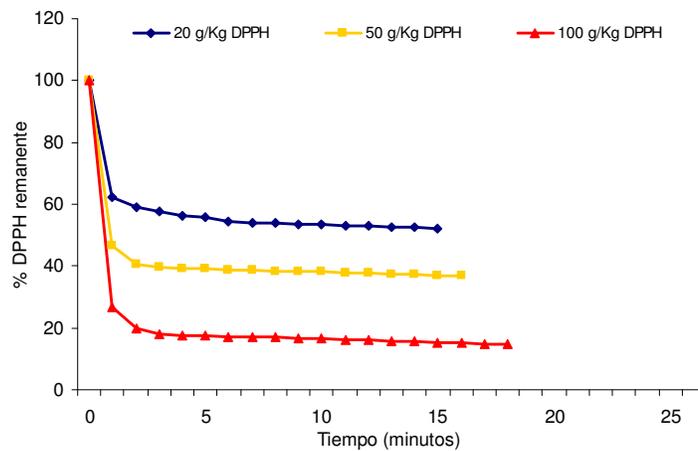
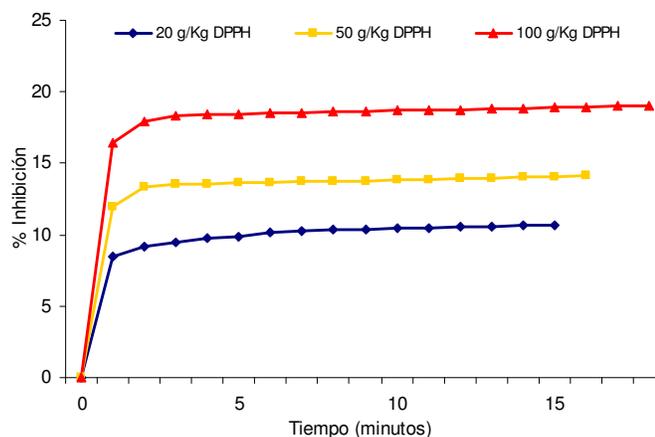


Gráfico 7. Comportamiento de diferentes concentraciones de ácido gálico frente al radical DPPH[•] (continuación).



En la tabla 14 se presenta los resultados de la prueba de DPPH en el extracto crudo (MPC) y en el rico en polifenoles (MPX). Las concentraciones de cada extracto fueron seleccionadas de tal manera que exhiban un comportamiento similar al de los patrones de ácido ascórbico y gálico, con respecto al tiempo.

Mediante la gráfica de $\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{Remanente}}$ vs. concentración de antioxidante se obtuvo la expresión: $Y = 75,421e^{-0,0142x}$ ($R^2=0,9991$) para el extracto MPC e $Y = 94,289e^{-0,0175x}$ ($R^2 = 0,9187$) para el extracto MPX, con las cuales se calculó el respectivo E_{C50} . El $T_{E_{C50}}$ de los extractos se obtuvo con las expresiones: $Y = 1,3748x + 7,4129$ ($R^2 = 0,9574$) e $Y = 1,9168x - 21,431$ ($R^2 = 0,9634$) para los extractos MPC y MPX respectivamente, mediante la gráfica de $\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{Remanente}}$ vs. tiempo.

Tabla 14. Eficiencia anti-radical en los extractos MPC y MPX.

Extracto	$C_{\text{patrón}}^a$	$\%[\text{DPPH}^{\bullet}]_{\text{Remanente}}$	Tiempo (min)	E_{C50}	$T_{E_{C50}}$ (min)	EA X 10 ³
MPC	72,12	26,9	16	28,948	30,977	1,095
	36,06	45,8	25			
	14,42	60,9	40			
MPX	73,29	23,9	25	36,248	37,266	0,740
	45,81	50,4	35			
	15,26	66,5	47			

a: g de extracto/Kg de DPPH.

El comportamiento de los extractos MPC y MPX a diferentes concentraciones frente al radical DPPH[•] con respecto al tiempo (gráficos 8 y 9) indica que pese a

las diferencias en eficiencia anti-radical (EA), el comportamiento en los dos extractos es similar al de los patrones de ácido ascórbico y gálico, frente a la concentración de antioxidante y a la cantidad de DPPH remanente, pero contrario al tiempo. Es decir, una mayor concentración de antioxidante deja menor $\%[\text{DPPH}^*]_{\text{Remanente}}$, tiene mayor porcentaje de inhibición radical pero tarda menos tiempo en reaccionar.

Gráfico 8. Comportamiento del extracto MPC frente al radical DPPH*.

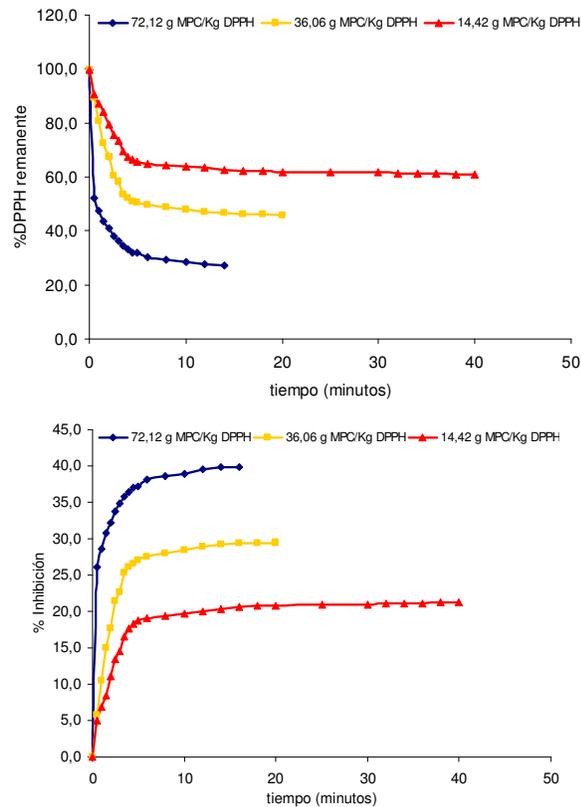


Gráfico 9. Comportamiento del extracto MPX frente al radical DPPH*.

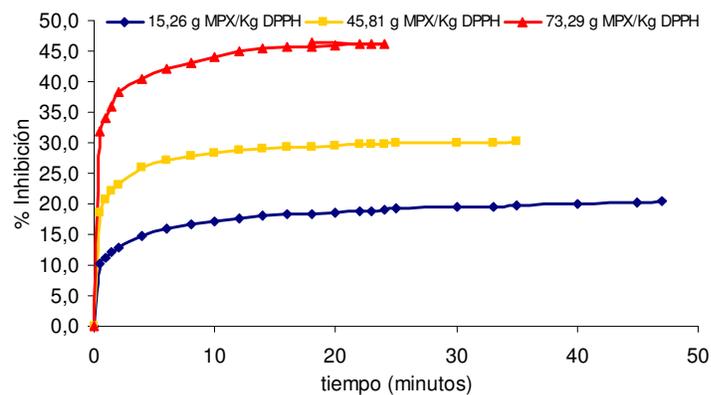
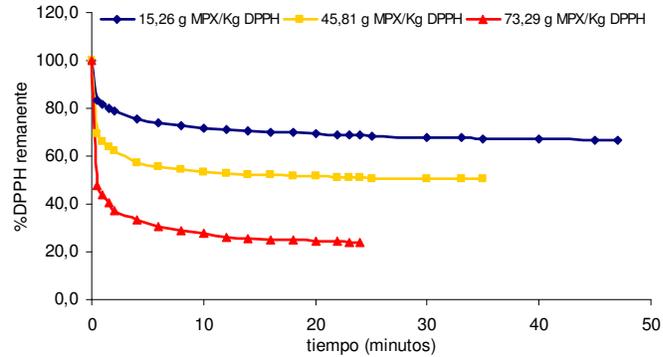
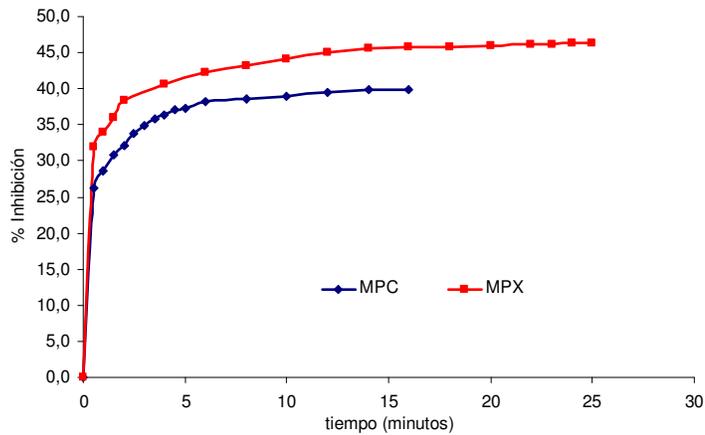


Gráfico 9. Comportamiento del extracto MPX frente al radical DPPH[•] (Continuación).



El gráfico 10 muestra una comparación entre los dos extractos a una concentración similar (MPC= 72,12 y MPX= 73,29 g de extracto/Kg DPPH). El extracto crudo (MPC) inhibe menos moléculas de DPPH[•] que el extracto rico en polifenoles (MPX) y llega al estado estacionario en un tiempo menor. En estas circunstancias se podría afirmar que el extracto MPX es el de mayor eficiencia. Pero al analizar el EC_{50} de los dos extractos, se observa que en el MPC, es necesaria una menor concentración de antioxidante para reaccionar con la mitad del radical y a un tiempo aproximadamente 10 veces menor, por lo cual su eficiencia es mayor. Esto muestra que el concepto de eficiencia anti-radical, es un parámetro más útil, en la comparación de extractos con características antioxidantes.

Gráfico 10. Comparación del % inhibición en concentraciones similares de los extractos MPC y MPX.



Según la clasificación cualitativa realizada por Sánchez (1997), el extracto MPC presenta una eficiencia anti-radical “media” mientras que la del extracto MPX es “baja”. Al relacionar estos resultados con los de la prueba ABTS se puede apreciar, el extracto MPX presenta 7 veces mayor actividad antioxidante respecto al extracto MPC, pero en términos de eficiencia anti-radical esta diferencia solo se aproxima al doble. Este efecto demuestra la necesidad de aplicar las dos pruebas (ABTS y DPPH) en valoración de extractos con actividad antioxidante, ya que cada una brinda informaciones diferentes pero a la vez complementarias en el estudio de los extractos.

Los resultados de la prueba de DPPH obtenidos para la delfinidina-3-cumaroil-hexosa (Dp-3-cum-hex), petunidina-3-hexosa-hexosa (Pt-3-hex-hex) y la fracción rica en derivados de la cianidina (FC) se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Eficiencia anti-radical en las antocianinas monoméricas aisladas del fruto de Motilón y en la fracción FC.

Antocianina	C _{patrón} ^a	%[DPPH*] Remanente	Tiempo (min)	EC ₅₀	T _{EC50} (min)	EA X 10 ³
Dp-3-cum-hex	226,42	9,113	34	2,075	136,803	3,522
	145,17	14,904	64			
	8,32	49,213	132			
FC	164,76	9,551	40	6,511	109,165	1,407
	80,82	24,784	55			
	9,64	46,824	105			
Pt-3-hex-hex	203,13	9,15	46	7,250	122,988	1,122
	117,19	13,198	66			
	15,625	52,773	126			

a: g de extracto/Kg de DPPH.

El comportamiento de las antocianinas frente al radical DPPH* se muestra a continuación (gráficos 11-13). El comportamiento común para los tres casos, es que a mayor concentración del antioxidante, hay mayor porcentaje de inhibición y la reacción tarda menos tiempo para llegar al estado estacionario.

Gráfico 11. Comportamiento de la Dp-3-cum-hex frente al radical DPPH* .

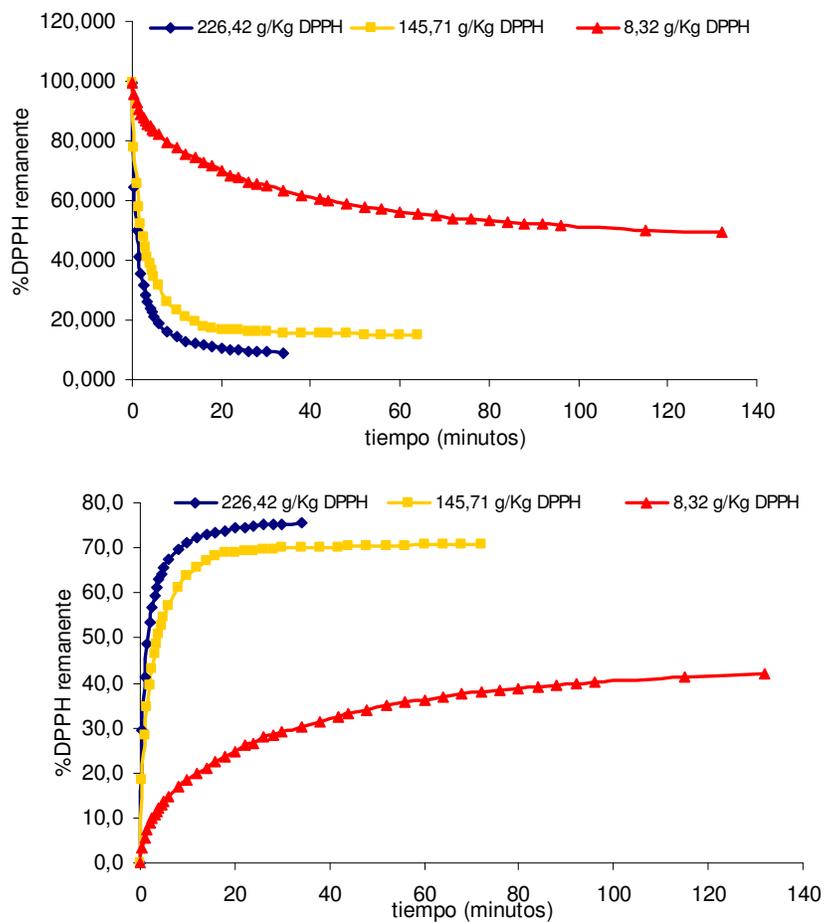


Gráfico 12. Comportamiento de la fracción FC frente al radical DPPH* .

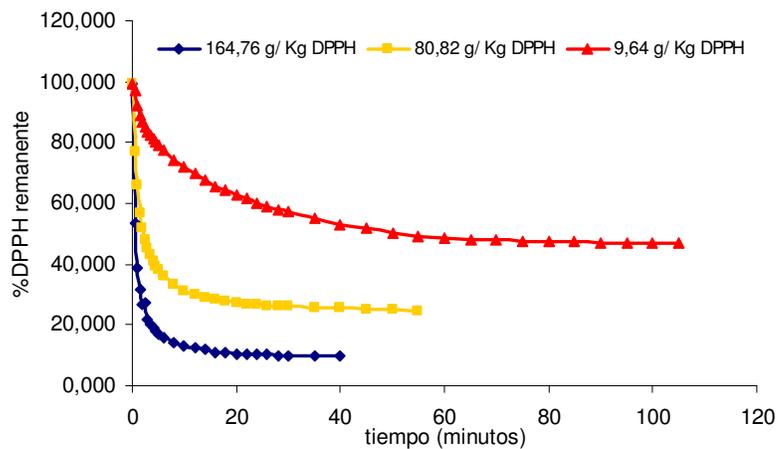


Gráfico 12. Comportamiento de la fracción FC frente al radical DPPH* (Continuación).

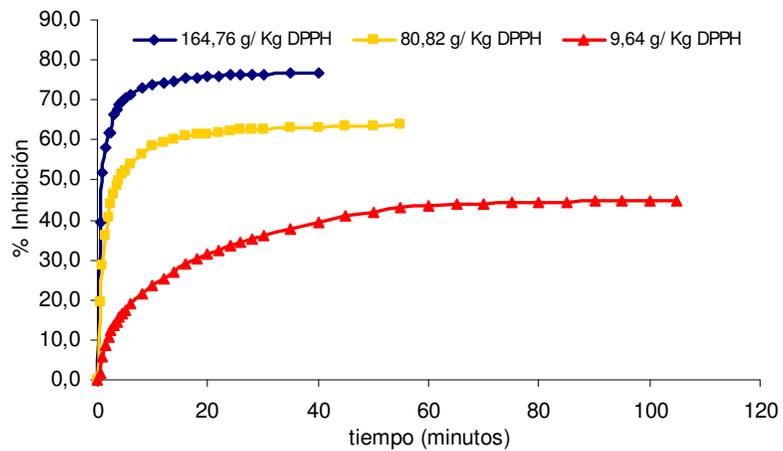
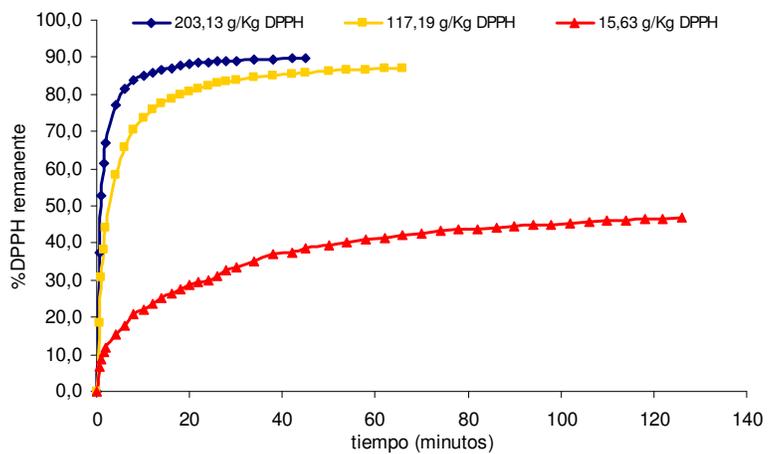
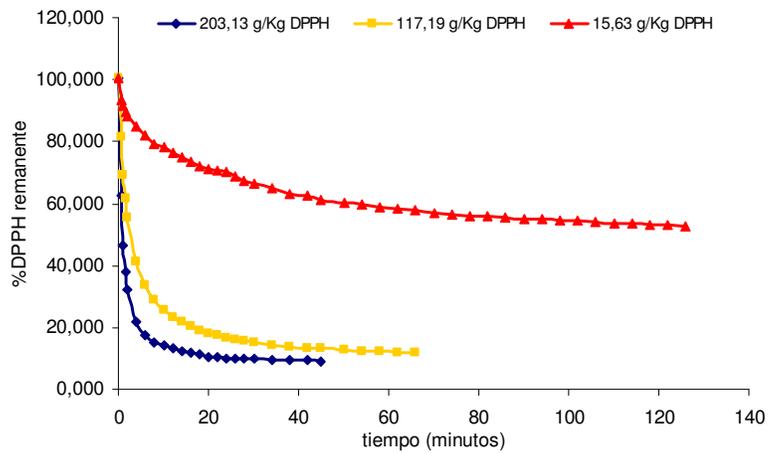


Gráfico 13. Comportamiento de la Pt-3-hex-hex frente al radical DPPH*.



La tabla 16 muestra las relaciones matemáticas utilizadas para obtener el Ec_{50} y el T_{Ec50} de la Dp-3-cum-hex, Pt-3-hex-hex y la fracción rica en derivados de la cianidina (FC)

Tabla 16. Relaciones matemáticas para el cálculo de los parámetros Ec_{50} , T_{Ec50} en las antocianinas aisladas de la pulpa del Motilón y en la fracción FC.

Antocianina	Relación Ec_{50}	R^2	Relacion T_{Ec50}	R^2
Dp-3-cum-hex	$y = 50,81e^{-0,0078x}$	0,991	$y = 0,425x - 8,209$	0,971
FC	$y = 53,46e^{-0,0103x}$	0,995	$y = 0,54x - 8,949$	0,961
Pt-3-hex-hex	$y = 53,56e^{-0,0095x}$	0,925	$y = 0,571x - 20,31$	0,975

La mayor eficiencia anti-radical proviene de la delfinidina-3-cumaroil-hexosa (Dp-3-cum-hex), seguida por la fracción rica en derivados de la cianidina (FC) y por último, petunidina-3-hexosa-hexosa (Pt-3-hex-hex). El factor más importante para que la eficiencia se comporte de esta manera, es sin duda, la presencia de grupos hidroxilo en la estructura de las agliconas. Cuando se relaciona estos resultados con los de la prueba ABTS, se observa que la Dp-3-cum-hex tiene la mayor actividad y la mayor eficiencia entre las demás antocianinas. Al comparar la fracción FC y la Pt-3-hex-hex se observa que la actividad antioxidante determinada por la prueba ABTS, es mucho mayor (casi el doble) para la fracción FC que para la Pt-3-cum-hex, mientras que en términos de eficiencia anti-radical, se conserva este mismo efecto, pero con valores más estrechos (1,407 y 1,122 respectivamente). Al analizar el comportamiento de las diferentes concentraciones de antocianina, frente a la reacción con DPPH*, se observa que para la Dp-3-cum-hex y la Pt-3-hex-hex, la concentración más alta y la siguiente, tienen porcentajes de inhibición similares cuando la reacción llega a su estado estacionario, pese a la notable diferencia en sus concentraciones y a los tiempos de reacción (gráficos 11 y 13).

4.8 COMPARACIÓN ENTRE LA PULPA DEL MOTILÓN Y OTROS FRUTOS

Resulta interesante llevar a cabo una comparación de la pulpa del Motilón, con otras pulpas de frutos conocidos y consumidos normalmente en la dieta alimenticia. Para este fin, se toma como referencia los estudios realizados por Kuskoski (2005), debido a que las metodologías y las condiciones desarrolladas por este autor son similares a las presentadas en esta investigación. La tabla 17 presenta los resultados del estudio del contenido fenólico (FT), antociánico (AT) y capacidad antioxidante por el método ABTS (TEAC) de la pulpa de Motilón y de las pulpas de varios frutos estudiados por Kuskoski (2005).

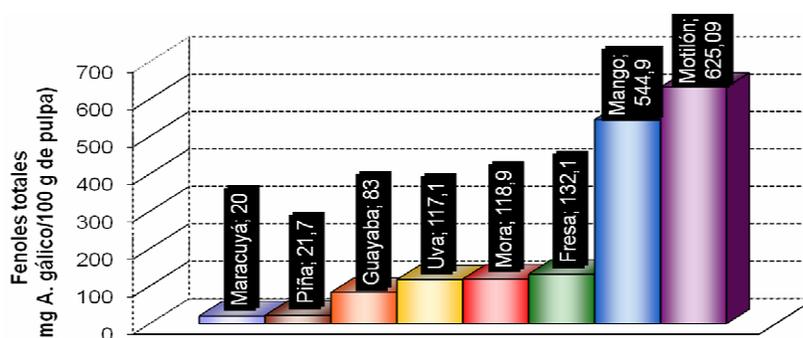
Tabla 17. Contenido de fenoles totales, antocianinas totales y capacidad antioxidante de varios frutos.

FRUTA	FT ^a (± DE ^b)	AT ^c (± DE)	TEAC ^d (± DE)
Maracuyá	20 (±2,6)	No detectado	2,7 (±0,1)
Piña	21,7 (±4,5)	No detectado	3,4 (±0,3)
Guayaba	83 (±1,3)	2,7 (±0,2)	8,2 (±0,4)
Uva	117,1 (±0,6)	30,9 (±0,1)	9,2 (±0,2)
Mora	118,9 (±2,1)	41,8 (±1,8)	7,1 (±0,2)
Fresa	132,1 (±3,8)	23,7 (±1,8)	12 (±0,3)
Mango	544,9 (±7,3)	No detectado	13,2 (±0,3)
Motilón	625,09 (± 4,9)	386,25 (±2,9)	39,314 (±0,3)

a: mg de ácido gálico /100 g de pulpa; b: mg de cianidina-3-glucósido / 100 g de pulpa; c: μ mol de trolox/g de pulpa; d: desviación estándar.

Al comparar contenido de fenoles totales presentes en la pulpa de Motilón y las pulpas de los frutos presentados en la tabla 17 (gráfico 14), se aprecia que el Motilón, tiene un contenido fenólico superior al de los demás frutos. Las pulpas más cercanas son el mango y la fresa, que difieren en 80,2 y 492,99 mg de ácido gálico / 100 gramos de pulpa respectivamente. Por lo tanto se puede afirmar que este fruto puede ser una gran alternativa para incluirlo en la dieta alimenticia, teniendo en cuenta los beneficios que muchos polifenoles traen a la salud humana.

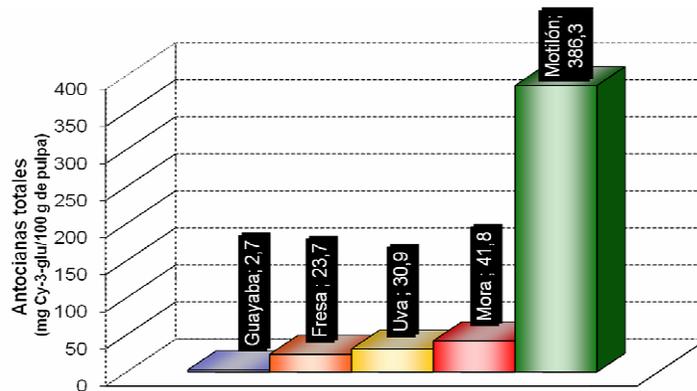
Gráfico 14. Fenoles totales presentes en la pulpa de varios frutos.



Comparando el contenido de antocianinas monoméricas totales (gráfico 15), se observa a las pulpas de mora y Motilón con la mayor cantidad de antocianinas monoméricas frente a los frutos citados. La mora tiene significativamente menor cantidad de antocianinas que el Motilón (aproximadamente el 90% diferencia) y cabe resaltar que la pulpa de mora, es en realidad el fruto entero sin las semillas, mientras que la pulpa de Motilón fue separada de la semilla y la cáscara (de color

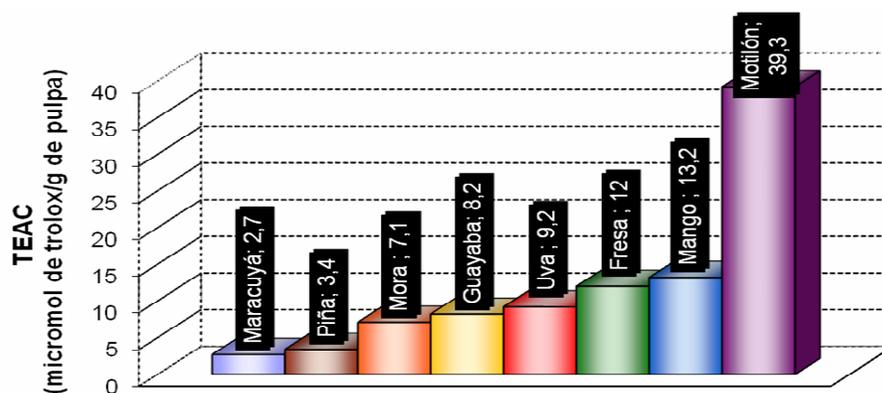
púrpura). Por lo tanto el aporte antociánico de la cáscara podría aumentar significativamente el contenido de estos metabolitos.

Gráfico 15. Comparación de los antocianos totales del Motilón con los de frutos conocidos.



Comparando la actividad antioxidante de la pulpa de Motilón (39,3 TEAC) con la de otras pulpas (gráfico 16), se aprecia que las pulpas de mango, fresa y uva (13,2; 12; 9,2 TEAC respectivamente) son la más cercanas al Motilón, que presenta un valor de TEAC mayor al de los demás frutos. Al observar el contenido de antocianos totales de todos los frutos y, al relacionarlos con los respectivos valores de TEAC, se observa que particularmente las antocianinas monoméricas de la pulpa de Motilón dulce, son las que tienen mayor aporte a la actividad antioxidante.

Gráfico 16. Comparación de la actividad antioxidante de varios frutos.



La comparación general de la pulpa de Motilón con otros frutos muestra la riqueza en polifenoles, de los cuales destacan las antocianinas. Estas aportan una buena cantidad de actividad antioxidante, lo cual muestra que como alimento, la pulpa de este fruto puede traer beneficios a la salud humana.

5. CONCLUSIONES

La pulpa del Motilón (*hyeronima macrocarpa*) tiene un color púrpura característico, producto de su composición rica en antocianinas de tipo monomérico y polimérico. Entre las antocianinas monoméricas se encuentran la delfinidina-3-cumaroil-hexosa, cianidina-3-hexosa-hexosa, petunidina-3-hexosa-hexosa y cianidina-3-hexosa-5-hexosa. Estas estructuras fueron propuestas gracias a los análisis por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, espectroscopia Uv-vis y espectrometría de masas. La pulpa del fruto también se compone de antocianinas derivadas de la peonidina, malvinidina, cianidina y petunidina, de las cuales no se adquirió información suficiente para sugerir una posible estructura glicosidada. Al contar con 5 de las 6 antocianinas derivadas de las principales agliconas (excepto la pelargonidina), se muestra la variedad de pigmentos que posee la pulpa de este fruto.

El método para obtener el extracto rico en polifenoles (MPX) (por medio de la resina XAD-7) y las fracciones ricas en antocianinas monoméricas (MPM) y poliméricas (MPP) (separadas por sephadex LH-20) demostró ser eficiente. Esto se confirmó al observar los incrementos de los compuestos fenólicos y antociánicos determinados por los métodos Folin Ciocalteau y pH diferencial respectivamente.

El método ABTS, permitió observar diferencias de actividad antioxidante en los extractos estudiados, siendo la fracción rica en polifenoles (MPX) la de mayor actividad antioxidante frente a la actividad del extracto crudo (MPC). Pero en términos de eficiencia anti-radical (método DPPH,) estos valores se encuentran más cercanos entre sí, lo cual muestra la necesidad del análisis con los dos métodos, para observar un comportamiento del antioxidante más cercano al de pruebas *in-vivo*.

Al comparar la pulpa del Motilón dulce con otras fuentes alimenticias reconocidas por su valor nutritivo, se demostró las cualidades que ésta presenta respecto al contenido fenólico, antociánico y actividad antioxidante. Los datos obtenidos bajo condiciones similares de análisis superan a los datos obtenidos en otras pulpas de frutos. Teniendo en cuenta la relación que existe entre el contenido de polifenoles con la capacidad para capturar radicales libres, la pulpa de Motilón es un alimento que puede contribuir a la salud humana.

6. RECOMENDACIONES

Para realizar la elucidación de las estructuras moleculares de las antocianinas sugeridas en esta investigación, es necesario separar mayor cantidad de compuestos puros, lo cual se puede lograr con técnicas como la cromatografía en contracorriente, para luego realizar estudios de resonancia magnética nuclear de protones, carbono 13 y experimentos bidimensionales. La información de estas técnicas, aclaran las dudas sobre los tipos de azúcar enlazados, y su configuración anomérica.

Los resultados de actividad antioxidante y eficiencia anti-radical sugieren que los extractos aislados del Motilón dulce, pueden jugar un papel importante en la reducción del daño oxidativo a nivel celular; sin embargo, no hay evidencia de que éstos polifenoles, ingeridos en la dieta, puedan afectar significativamente el estatus antioxidante del organismo, es necesario por lo tanto investigar en sistemas *in vivo* el efecto inhibitorio de estos extractos contra el daño oxidativo. Se debe destacar que el estudio de la actividad antioxidante de los extractos de polifenoles aislados del fruto de Motilón se realizó con soluciones alcohólicas, por lo tanto no es posible generalizar conclusiones en otro tipo de matrices solo con base en los ensayos realizados, se debe considerar que en modelos lipídicos los radicales reactivos pueden ser diferentes: peroxilo, alcoxilo, hidroxilo, etc. Además, la riqueza de polifenoles en la pulpa del Motilón, abren la posibilidad de estudiar compuestos fenólicos diferentes a las antocianinas, que puedan tener otro tipo de actividad biológica.

La fracción rica en antocianinas poliméricas (MPP), mostró un aporte significativo a la actividad antioxidante de la pulpa del Motilón. Por esta razón, es recomendable desarrollar estudios de elucidación estructural, estabilidad y profundizar los estudios de actividad antioxidante *in-vitro* e *in-vivo* de las antocianinas poliméricas de la pulpa de este fruto.

Teniendo en cuenta que la pulpa de este fruto puede ser un alimento nutritivo y su desaprovechamiento en la industria alimenticia, se recomienda estudios a nivel piloto de procesamiento alimenticio (mermeladas, vinos, nutraceuticos, colorantes etc.) de la pulpa del Motilón, cuyo aprovechamiento, llevaría a proponer el estudio de la cáscara (de color púrpura), desechada generalmente en procesos industriales, como una posible fuente de pigmentos tipo antocianina.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO C. Efecto de la temperatura y un copigmento en la estabilidad de la colorada en una bebida, tesis licenciatura en ingeniería de alimentos, departamento de ingeniería química y alimentos, universidad de las Américas puebla, México (2003).

ADAMS J. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of cyaniding in acidified aqueous solution at 100 °C, *journal of science food agriculture* 24, 747-750 (1973).

ANDERSEN O.; Markham K. Flavonoids chemistry, biochemistry and applications, crc press, Boca Raton, 471–553 (2006).

ANDERSEN O.; Francis G. Techniques of pigment identification. In: Plant Pigments and their Manipulation, Davies K. Ed., Blackwell Publishing: London, 293–341 (2004).

ARAVENA N.; Lagos G. Evaluación de un extracto obtenido a partir de la fracción no exportable de mora cultivada var. Black satin (rubus sp.) Para su posible utilización como colorante natural, Universidad del Bío-Bío Facultad De Ciencias de la Salud y Alimentos, Chile (2004).

BRAND-Willams W.; Cuvelier M.; Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie-Food Science And Technology* 28, 25-30 (1995).

BROENNUM-Hansen K.; Flink J.M. Anthocyanin colorants from elderberry (*sambucus nigra* l.), storage stability of the freeze dried product, *journal of food technology* 20, 725-733 (1985).

BROUILLARD R., Flavonoids and flower colour, in *the flavonoids: advances in research since 1980*, chapman & hall, London, 525–538 (1988).

BROUILLARD R.; Delaporte B. Chemistry of anthocyanins pigments, kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside, *journal american chemistry society* 99, 8461–8468 (1977).

BROUILLARD R., Chemical structure of anthocyanins in *anthocyanins as food colors*. pericles markakis , academic press inc., New York, 1-38 (1982).

CABRITA L., Analysis and stability of anthocyanins. [dissertation].university of bergen, department of chemistry, Noruega (1999).

CASTELLAR R.; Obón J.; Alacid M.; Fernandez J. Color Properties and stability of betacyanins from *opuntia* fruits, *journal of agricultural and food chemistry* 51(9), 2772-2776 (2003)

CHANDRA A.; Nair M.; Lezzoni A. Evaluation and characterization of the antocianin pigments in tart cherries (*prunus cerasus* L), *journal agriculture food chemistry* 40(6), 867-898 (1992).

DA COSTA C.; Horton D.; Margolis S. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography-mass espectrometry and capillary electrophoresis, *Journal of chromatography A* 881, 403-410 (2000).

DANGLES O. Anthocyanin complexation and color expression, *Analisis* 25, 50–52 (1997).

DANGLES O.; Elhabiri M.; Brouillard R. Kinetic And Thermodynamic investigation of the aluminium-anthocyanin complexation in aqueous solution, *journal chemistry society* 2, 2587–2596 (1994).

DAO L.; Takeoka G.; Edwards R.; Berrios J. Improved method for the stabilization of anthocyanidins, *Journal Agriculture Food Chemistry* 46, 3564-3569 (1998).

DARREN C.; Steward W.; Gescher A. Anthocyanins from fruits and vegetables – does bright colour signal cancer chemopreventive activity?, *European journal of cancer* 41, 1931-1940 (2005).

DELGADO V.; Jimenez A.; Paredes-Lopez. Natural pigments: carotenoids, antocyanins, betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical reviews in food science and nutrition* 40(3), 173-289 (2000).

DEWICK Paul M.; Medicinal natural products, cap 4: The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids, John Wiley & sons, second edition, 121-164 (2002).

DUTHIE G.; Gardner P.; Kyle J.; McPhail D. Antioxidant activity of antocyanins in vitro and in vivo. *rowett reseach institute Scotland*, United Kingdom, 90-102 (2004).

ESCRIBANO M., santos C.; Julian C.; Rivas G. Antocyanins in cereals, *Journal of chromatography A*. 1054, 129-141 (2004)

FORKMANN G.; Heller W.; Biosynthesis of flavonoids, *comprehensive natural products chemistry* 1, 713–748 (1999).

FOSSSEN T.; Rayyan S.; Andersen O. Dimeric anthocyanins from strawberry (*fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry* 65, 1421–1428 (2004).

FOSSSEN T.; Cabrita L.; Andersen O. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region, *food chemistry* 63, 435-440 (1998).

GARCÍA B., Absorción *in vivo* de oligómeros de epicatequina. Departament de bioquímica i biotecnologia, facultad de Química de Tarragona Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España (2005).

GIUSTI M., Wrolstad R., Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *current protocols in food analytical chemistry*, F1.2.1 – F1.2.13, (2001).

GOULD K. S., Lee, D. W., Anthocyanins in leaves. *advances in botanical research*, 37 callow, academic press, Amsterdam (2002).

HAGIWARAA A.; Miyashita, K.; Nakanishia, T.; Sanoa, M.; Tamanoa, S.; Kadotaa, T.; Kodac, T.; Nakamurac, M.; Imaidab, K.; Itod, N.; Shirai, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters* 171, 17-25 (2001).

HALLIWELL B., Gutteridge JMC., Free radical in biology and medicine. Oxford, Clarendon, p 142 (1989).

HARBORNE J.; Williams C. Anthocyanins and other flavonoids, *natural products, reports* 12, 639–657 (1995).

HARBORNE J. Plant polyphenols. XI. Structure of acylated anthocyanins, *Phytochemistry* 3, 151-160 (1964).

HARBORNE J.; Mabry T.; Mabry H. The flavonoids, editorial *Chapman and Hall*, Londres, 1204 p. (1975)

HARBORNE, J.; Williams C. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55 p 481–504 (2000).

HEIDARI R.; Khalafi J.; Dolatabadzadeh N. Anthocyanin Pigments of Siahe Sardasht Grapes, *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran* 15(2), 113-117 (2004).

HELLER R.; Peirson D. The other photosynthesis, *journal of chemical education*, , 233 p (1975).

Hernández A. Estabilización de antocianinas extraídas de rosas rojas por medio de la copigmentación para su uso como colorantes naturales en la industria alimenticia y farmacéutica. tesis licenciatura, quimicofarmacobiología, departamento de química y biología, Universidad de las Américas-Puebla. Mexico (2003).

HOPKINS W. Introduction to plant physiology. *Editorial John Wiley & Sons, Inc.* New York, USA (1995).

HRAZDINA G. Anthocyanins in *the flavonoids*, cap 3: *advances in research*, *chapman and hall*, London (1982).

HULME A. The biochemistry of fruits and their products, *academic press inn*, 346, 628, 712-715 (1971).

HYOUNG S.; Lee V. Chromatographic analysis of anthocyanins, *journal of chromatography* 624, 221-234 (1992).

IVERSEN C. Black currant nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content, *journal food science* 64, 37-41 (1999).

JACKMAN R.; Smith J. Athocyanins and betalains In Natural food colorants. Glasgow: *Blackie Academic and Professional*, 280- 296 (1996).

JACKMAN R.; Yada R; Tung M.; Speers R. Anthocyanins as food colorants - a review. *Journal Food Biochemistry* 11, 201-247 (1987).

JORDHEIM M. Isolation, identification and properties of Pyranoanthocyanins and anthocyanin Forms, dissertation for the degree of Philosophiae Doctor (PhD), department of chemistry, University of Bergen, Noruega 2007.

KAMEI, H.; Hashimoto, Y.; Koide, T.; Kojima, T.; Hasegawa, M. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biother Radiopharm*, 13(6), 447-452 (1998).

KINSELLA J.; Frankel E.; German B.; Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, *food technology* 47, 85-89 (1993).

KOIDE, T.; Hashimoto Y.; Kamei H.; Kojima T.; Hasegawa M.; Terabe K. Antitumor effect of anthocyanin fractions extracted from red soybeans and red beans in vitro and in vivo. *cancer biother radiopharm* 12(4), 277-280 (1997).

KONDO T., Yoshida K., Nakagawa A., Kawai T., Tamura H., Goto T., Structural basis of bluecolour development in flower petals from *commelina communis*, *nature* 358, 515–518 (1992).

KURT B.; Torssell G. Natural Product Chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach. apotekarsocieteten – swedish pharmaceutical society, Stockholm, Sweden 480 p (1997).

KUSKOSKI E.; Asuero A.; García M; Troncoso A. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciencia y tecnología alimentaria* 24(4), 691-693 (2004).

KUSKOSKI E.; Asuero A.; Troncoso A; Mancini J.; Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos *Ciencia y tecnología alimentaria* 25(4), 726-732 (2005).

KUSKOSKI E.; Vega J.; Rio J.; Fett R.; Troncoso, A.; Asuero A. Characterization of anthocyanins from the fruits of Baguacu (*Eugenia umbelliflora* Berg). *International Journal of Sociology of Agriculture and Food* 51(1), 5450-5454 (2003).

LEON A.; Robertson A.; Robinson R.; Seshadri T.R. Synthesis of anthocyanins, the four isomeric b-glucosides of pelargonidin chloride. *Journal chemistry society, abstracts* 2672-2701 (1931).

LONGO L.; Vasapollo G. Extraction and identification of anthocyanins from Smilax aspera L. berries. *Food chemistry* 94, 226–231 (2006).

MACCARONE E.; Maccarrone A.; Rapisarda P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. *Journal food science* 50, 901-904 (1985).

MACRAE R.; Robinson R. Encyclopaedia of food science food technology and nutrition 5. London, 3126-3131 (2000).

MABRY T.; Markham K.; Thomas M. The systematic identification of flavonoids. *springer-verlag*, New York, 1-354 (1970).

MARCANO D.; Hosegawa M.; Fitoquímica orgánica, Universidad Central de Venezuela, Caracas, *Journal of natural products* 66, 1298 - 1298 (1991).

MARKAKIS P. Antocyanins as foods colors. *Academic press*, USA (1982).

MARQUART L. Die Farben der Büthen, eine chemisch-physiologische abhandlung, Bonn, (1835).

MARTINEZ A. Flavonoides, facultad de quimica farmaceutica. *Universidad de Antioquia*, Medellín, 24-25 (2005).

MARTÍNEZ S.; González J.; Culebras J.; Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria* 17, 217-278 (2002).

MARTÍNEZ J.; Periago M.; Ros G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 50 (1), 5-18 (2000).

MOLYNEUX P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (dpph) for estimating antioxidant activity. *Journal of science and technology*, 211-219 (2004).

MORENO M.; Vilorio A.; Hidalgo D. Un nuevo método para el aislamiento de betalainas por HPLC. *Revista de la facultad de agronomía*, 155-160 (2004).

OKEZIE I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation research* 523(24), 280 (2002).

PATJANE A. Efecto de un copigmento en la estabilidad de antocianinas monoméricas de fresa por medio de una bebida carbonatada, tesis de licenciatura, departamento de ingeniería química, de alimentos y ambiental. Universidad de las Américas-Puebla, México, (2002).

PEREZ T. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes, *Revista cubana de investigaciones biomédicas* 22(1), 48-57 (2003).

POMAR F.; Novo M.; Masa A. Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Journal of chromatography*, Article 1094, 34-41 (2005).

PIEATTA G. Flavonoids as antioxidants. *Journal natural products* 63, 1035-1042 (2000).

RAMIREZ C.; Andersen O.; Gardner P.; Morrice P.; Wood S.; Duthie S.; Collins A.; Duthie G. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin e depleted rats. free radicals, *journal of biological medicine* 31(9), 1033-1037 (2000).

REIN M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins, University of Helsinki, department of applied chemistry and microbiology food chemistry division, Finlandia, (2005).

RE R.; Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine* 26, 1231-1237 (1998).

RODRÍGUEZ J.; Menéndez L.; Trujillo L. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo, *revista cubana de medicina militar*, 36-44 (2001).

SALDAÑA M., Efecto de la copigmentación sobre la expresión de color en sistemas modelo de ciruela (*Prunus domestica*), escuela de ciencias, Universidad Las Américas, Puebla, Mexico, (2004).

SANCHEZ C.; Larrauri J.; Saura C. A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols. *Journal of science of food and agriculture* 76 (2), 270-276 (1998).

SHAHIDI F.; Naczki M.; Food phenolics sources chemistry effects application. *Technomic publishing co*, 80-82 (1995).

SKOOG, West, Holler, Química analítica, editorial mc graw hill, México, Séptima edición, 577 (2003).

SMITH M.; Taneda S.; Richey P.; Miyata S.; Yan S.; Stern D.; Sayre L.; Monnier V. Advanced Maillard reaction end products are associated with alzheimer disease pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(12), 5710–5714 (1994).

SONDHEIMER E.; On the relation between spectral changes and pH of the anthocyanins pelargonidin 3-monoglucoside *Journal american chemistry society* 75, 1507–1508 (1953).

STARR M.; Francis F. Oxygen and ascorbic acid effect on the relative stability of four anthocyanin pigments in cranberry juice, *Food technology* 22, 1293-1295 (1968).

STRACK D.; Wray V. The anthocyanins in: *the flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman and hall, London, (1994).

TAKEOKA G., Dao L., Anthocyanins in: Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals, capitulo 2, *hurst, w. journal education*, Boca Raton, 219–241 (2002).

TOSHIDA M. Inaba Y.; Maekawa T.; Takeda Y.; Yamaguchi H.; Nakamoto K.; Kuninaga H.; Nishizato s.; Nonaka A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents, *journal of agricultural and food chemistry* 51(7), 1831-1838 (2003).

TREASE, Evans, Farmacognosia, editorial Interamericana-McGraw Hill, México, (1991).

VON Elbe J.; Schwartz S.; Colorants in food chemistry, 3rd ed., *fennema or (ed.)* New York, 651-723 (1996).

VISENTAINER J.; Vieira O.; Matsushita M.; De Souza N.; Physico - chemical characterization of acerola (*malpighia glabra* l.) produced in maringa, Parana State, Brazil. *Archivos latinoamericanos de nutricion* 47, 70-2 (1997).

WALFORD J.; Developments in food colors applied. *Science publishers*. London, 116-142 (1980).

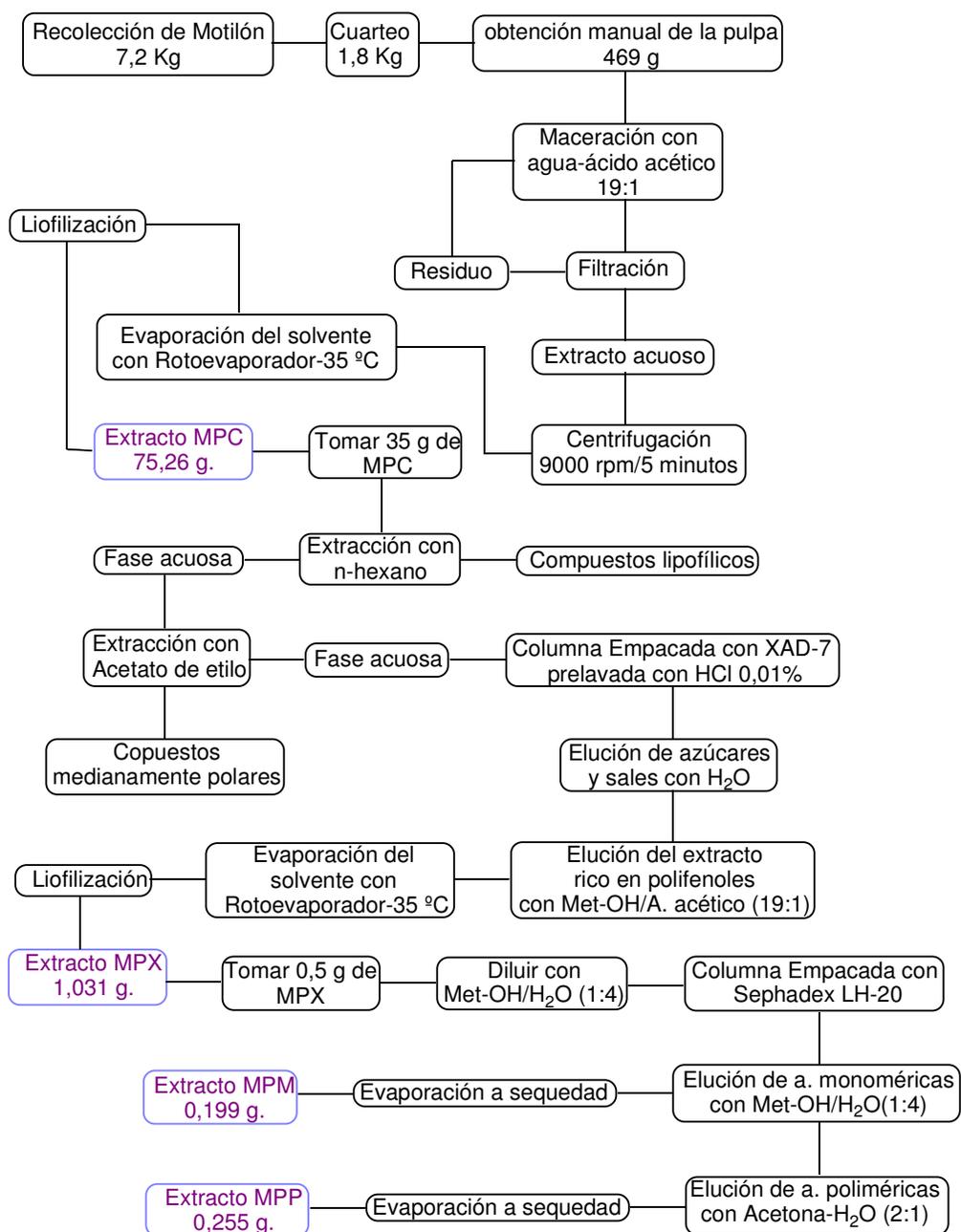
WANG H.; Race J.; Shrikhande J. Characterization of anthocyanins in grape juices by iron trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry* 51, 1839-1844 (2003)

WESCHE P.; Argais A.; Hernandez G.; Lopez A.; Preservation factors and processing effects on anthocyanin pigments in plums. *Food chemistry* 57(3), 399-403 (1996).

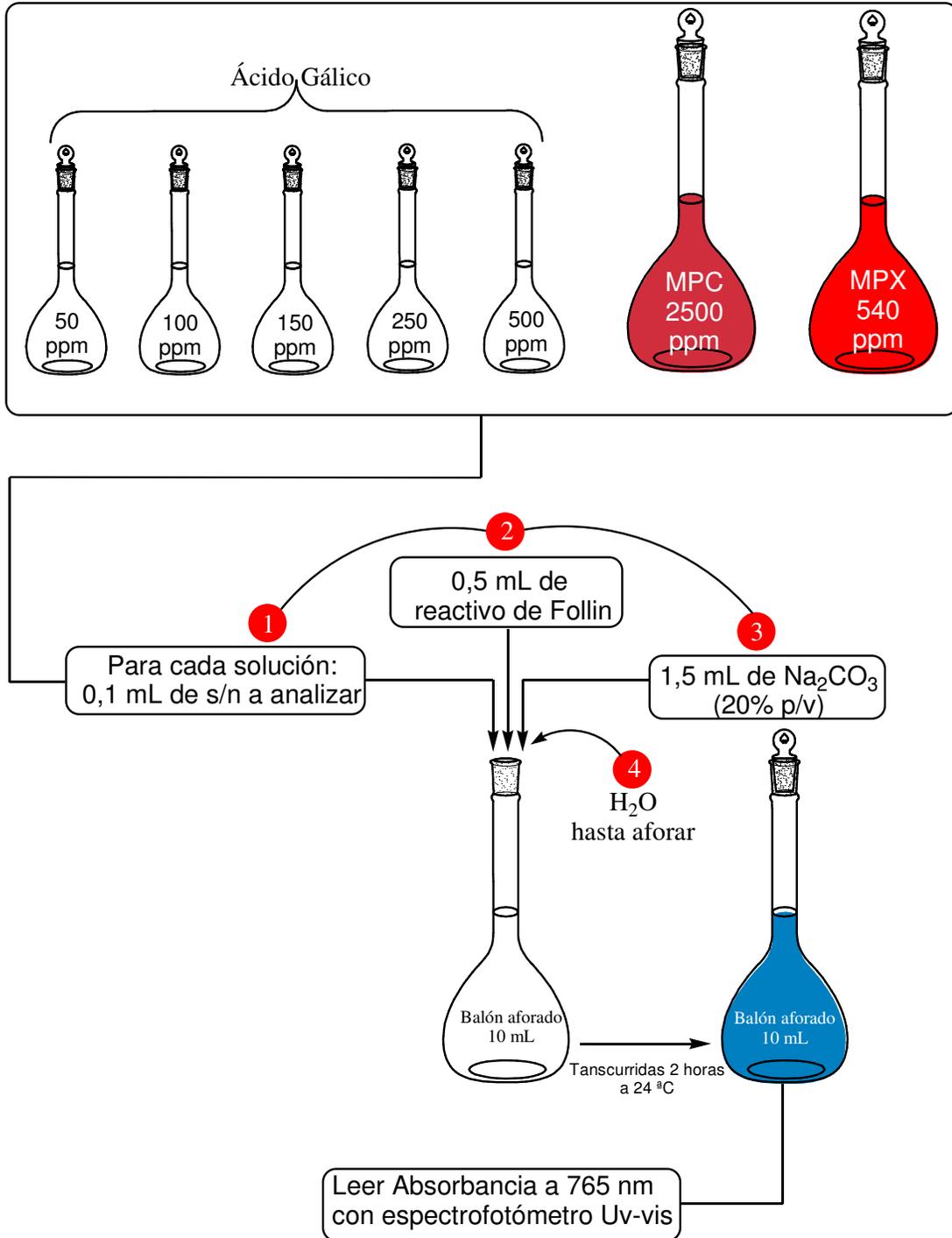
WROLSTAD R.; Robert W.; Lee J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Food science and technology* 16, 423-428 (2005).

ANEXOS

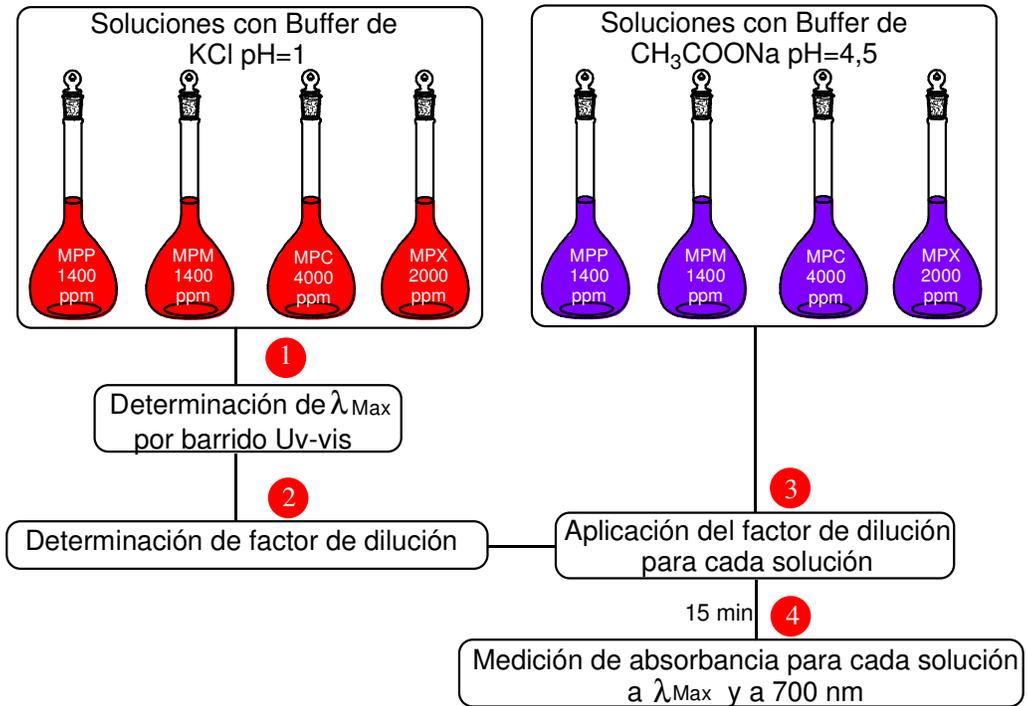
Anexo A. Diagrama de flujo para la obtención de los 4 extractos estudiados a partir del fruto de Motilón (*Hyeronima macrocarpa*)



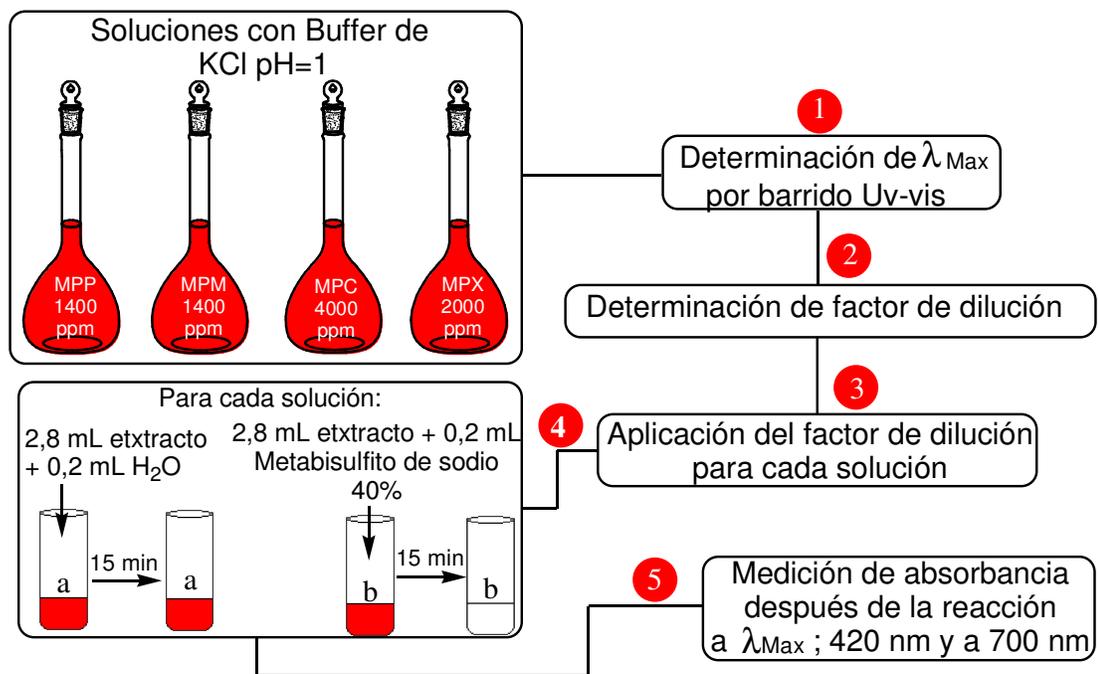
Anexo B. Procedimiento para la determinación de fenoles totales



Anexo C. Procedimiento para la determinación Antocianinas monoméricas totales

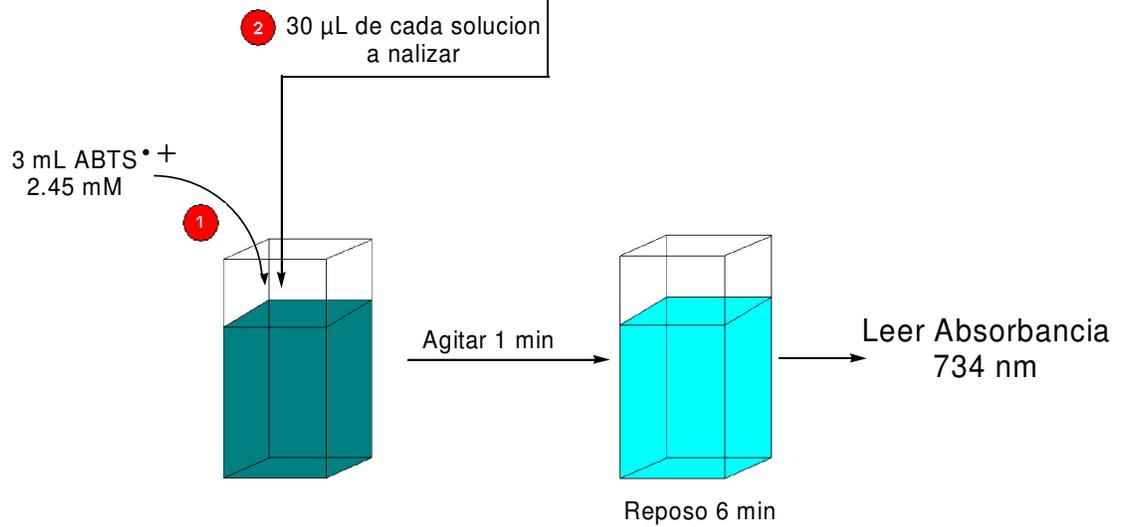
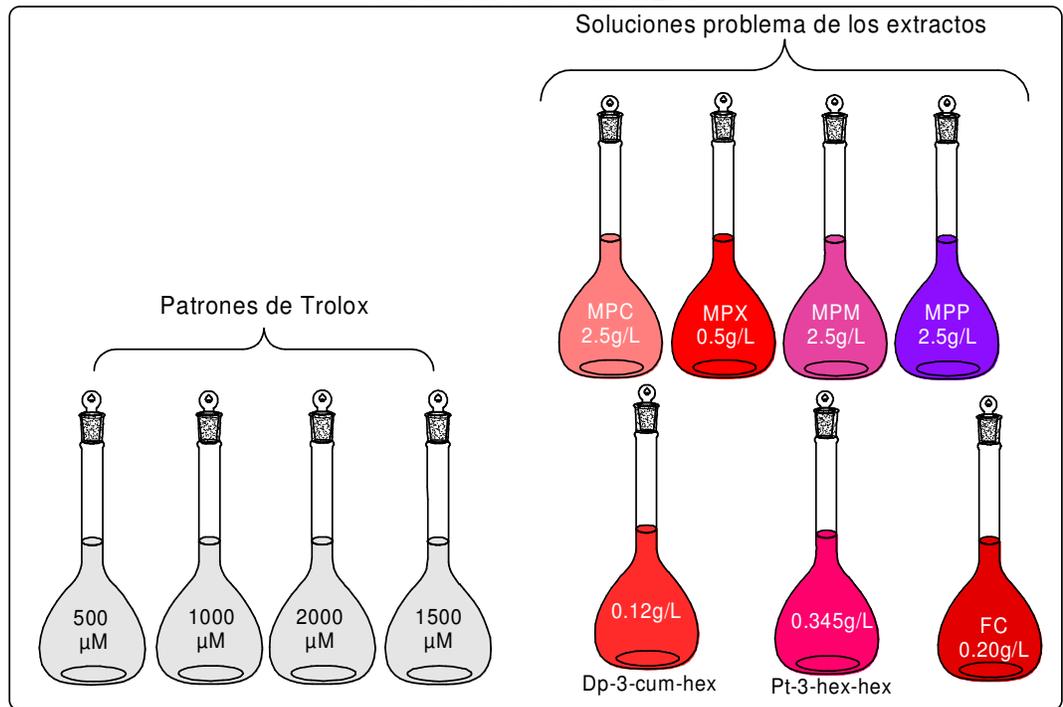


Anexo D. Procedimiento para la determinación de color polimérico



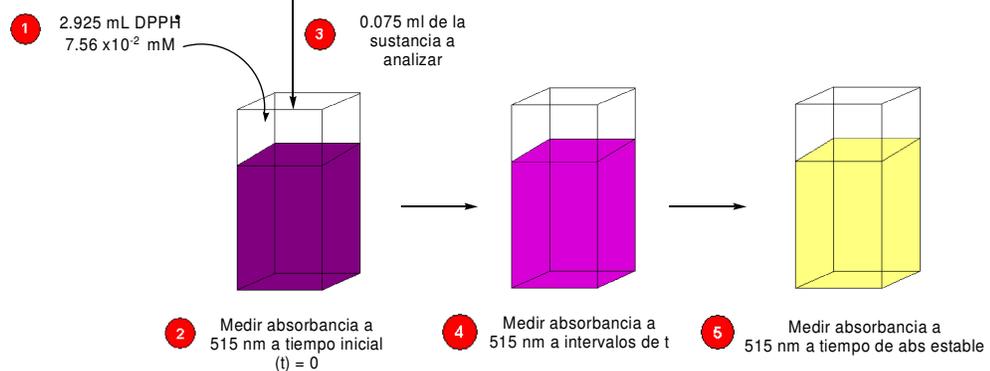
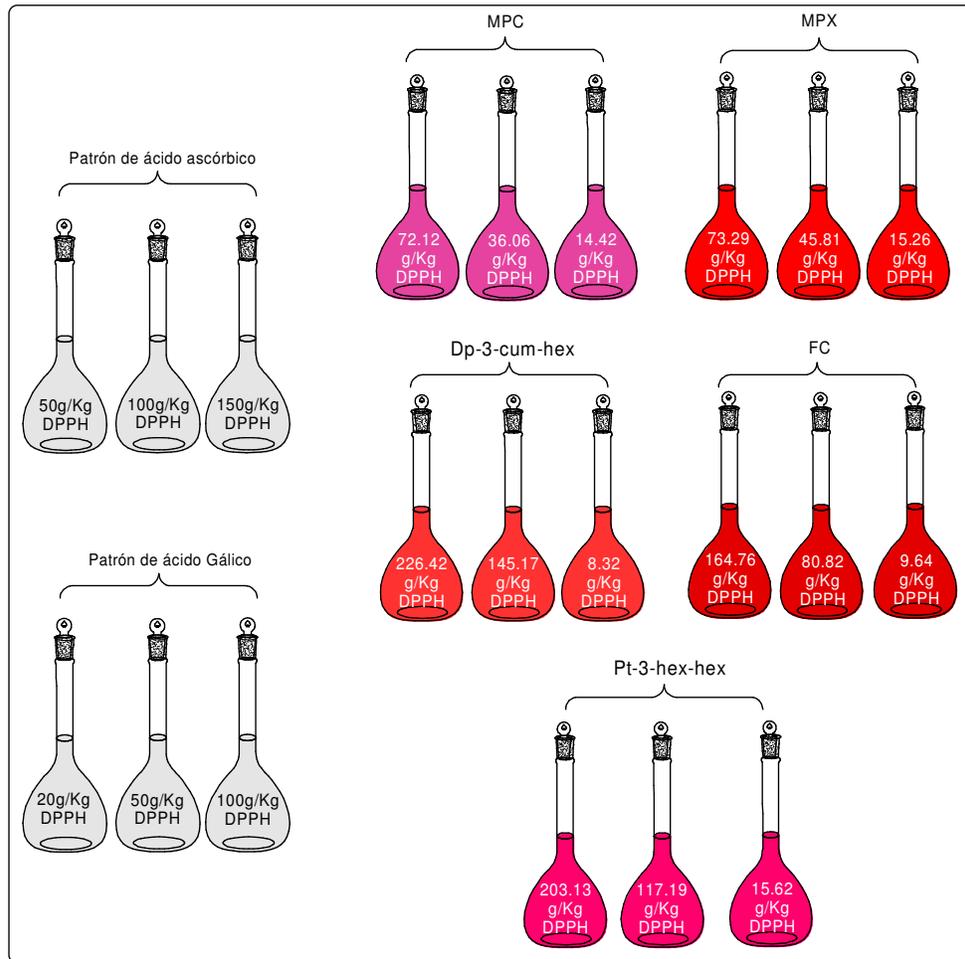
Anexo E. Procedimiento para el método ABTS

Soluciones a analizar

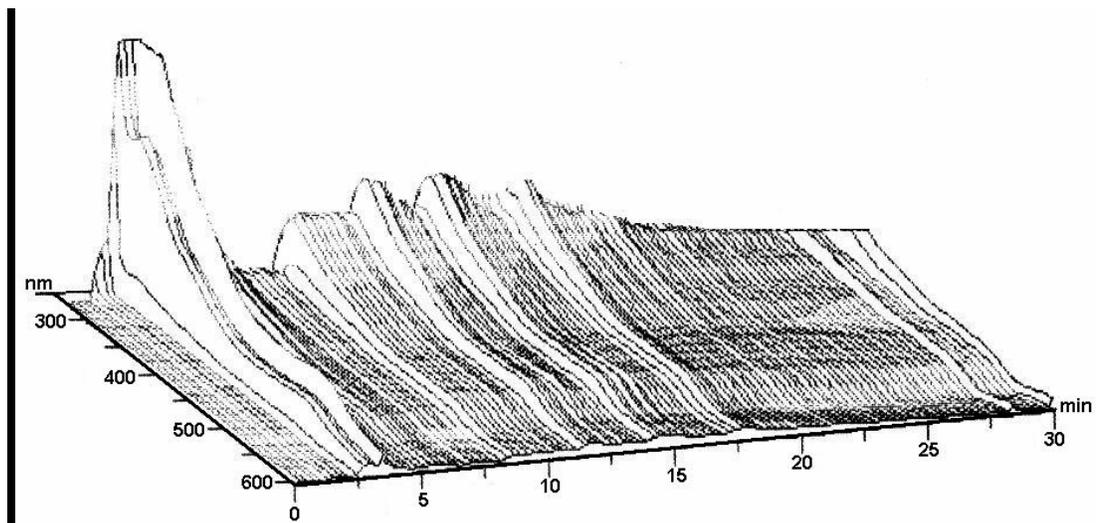
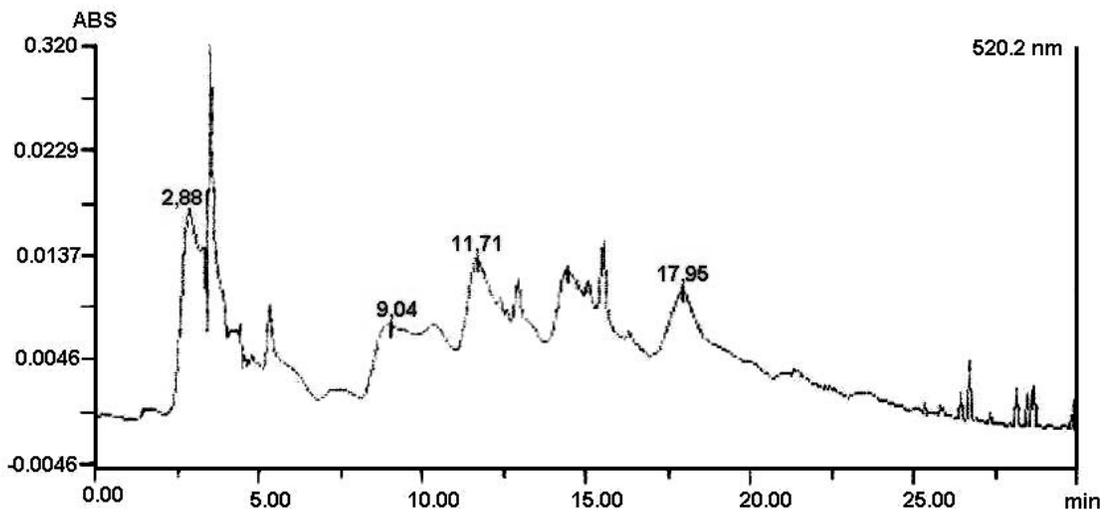


Anexo F. Procedimiento para el método DPPH \cdot

Soluciones a analizar



Anexo G. Cromatogramas del extracto rico en antocianinas poliméricas MPP



La cantidad y complejidad de señales corresponden a antocianinas poliméricas, que se caracterizan por tener picos con poca definición y baja intensidad.