

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES  
EN EL FRUTO DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).

DAIRO ANDRES PORTILLO ESTRADA  
JOSÉ LUIS VILLACRÉZ YÉPEZ

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

ANÁLISIS QUÍMICO DE LOS PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINA PRESENTES  
EN EL FRUTO DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).

DAIRO ANDRES PORTILLO ESTRADA  
JOSÉ LUIS VILLACRÉZ YÉPEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener al título de Químico.

Directores:  
NELSON H. HURTADO GUTIÉRREZ, Ph. D.  
SILVIA T. CRUZ SÁNCHEZ, 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 la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de sus autores”.

Art.1 del acuerdo No 324 de octubre 11 de 1966, emanado del honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Director

---

Director

---

Jurado

---

Jurado

San Juan de Pasto, noviembre de 2008

## DEDICATORIA

A mi familia y amigos.  
Dairo Portillo

## DEDICATORIA

A las personas que más amo en la vida, artífices de este éxito.

Mi madre María Yépez quien con su ejemplo hizo de mi una mejor persona, la inspiración para salir adelante, gracias al amor que día a día me demuestra pude culminar mi sueño.

Mi padre José Villacrés quien me dio el ser, me enseñó el valor de la responsabilidad y la constancia hoy su esfuerzo se ve retribuido.

Mi hermana Yohany por el amor que me brindan y por haberme mostrado la ternura de la vida.

Mi hermano Henry por el amor que me brindan y por haberme mostrado la ternura de la vida.

Y especialmente a mi hermano Euler Orlando por haber caminado junto a mí durante mi carrera, el apoyo, las palabras de aliento y su compañía. Parte de lo que soy ahora es obra suya.

A Dairo mi compañero y amigo por haberme brindado su amistad incondicional y su confianza.

José Luis Villacrez Yépez

## AGRADECIMIENTOS

A los directores de este trabajo de investigación: c. Ph. D. Nelson H. Hurtado Gutiérrez y Ph. D. Silvia T. Cruz Sánchez y a todos los integrantes del Grupo de Investigación de Productos con Importancia Biológica (GIPIB), por el apoyo brindado.

A la Vicerrectoría de Posgrados e Investigaciones, VIPRI, por la financiación de esta investigación.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por su valiosa colaboración.

Al Grupo de Investigación de Productos Naturales Marinos y Frutales de Colombia (GIPNMFC) de la Universidad Nacional sede Bogotá; especialmente a: Ph. D. Coralía Osorio y c. Ph. D. Juliana Barrios.

A los profesores del Departamento de Química por haber aportado en nuestra formación académica.

Y a nuestros familiares, amigos y compañeros.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.	29
1. OBJETIVOS.	30
1.1 OBJETIVO GENERAL.	30
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	30
2. MARCO REFERENCIAL.	31
2.1 ANTECEDENTES.	32
2.2 MARCO CONTEXTUAL.	32
2.3 MARCO TEÓRICO.	33
2.3.1 Pigmentos Naturales.	33
2.3.1.1 Flavonoides.	33
2.3.1.2 Otros tipos de pigmentos naturales.	41
2.3.2 Índices antociánicos.	41
2.3.2.1 Antocianos totales.	41
2.3.2.2 Color polimérico.	43
2.3.2.3 Fenoles totales.	44
2.3.2.4 Métodos para medir la actividad antioxidante.	44
2.3.3 Métodos de extracción, purificación y reconocimiento	47
2.3.3.1 Extracción de pigmentos por medio de marchas analíticas	47
2.3.3.2 Estabilidad de antocianinas.	49
2.3.3.3 Purificación y caracterización de antocianinas por CLAE.	53



2.3.3.4 Caracterización de los pigmentos tipo antocianina	55
2.3.4 Descripción de la planta del mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> H.B.K.)	59
3. METODOLOGÍA.	63
3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.	63
3.2 EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO.	63
3.2.1 Preparación de la muestra.	63
3.2.1.1 Determinación de la madurez.	63
3.2.2 Extracción de los pigmentos.	64
3.2.2.1 Extracción de pigmentos de la cáscara.	64
3.2.2.2 Extracción de pigmentos de la pulpa.	64
3.2.2.3 Concentración de los extractos.	65
3.3 PURIFICACIÓN DEL PIGMENTO.	65
3.3.1 Separación de compuestos lipofílicos.	65
3.3.1.1 Lavados con n-hexano.	66
3.3.2 Separación de compuestos medianamente polares.	66
3.3.3 Separación por cromatografía de columna (CC).	66
3.3.3.1 Separación de compuestos incoloros de baja polaridad.	66
3.3.3.2 Separación de pigmentos con diferente polaridad.	67
3.3.4 Análisis y purificación por cromatografía líquida de eficiencia (CLAE).	67
3.3.4.1 Análisis de antocianinas mayoritarias por CLAE tipo analítico.	67
3.3.4.2 Purificación de antocianinas por CLAE tipo preparativa.	68
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO.	70
3.4.1 Elucidación estructural	70

3.4.1.1 Determinación del perfil de absorbancia en el espectro UV-Vis.	70
3.4.1.2 Análisis por CLAE-EM de las antocianinas mayoritarias.	70
3.4.1.3 Determinación del espectro de RMN H <sup>1</sup> de la antocianina mayoritaria.	71
3.4.2 Semicuantificación de antocianinas monoméricas totales y antocianinas poliméricas totales.	71
3.4.2.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial.	71
3.4.2.2 Determinación de antocianinas poliméricas totales por el método de pH sustractivo.	72
3.4.3 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	72
3.4.4 Medición de la capacidad antioxidante.	72
3.4.4.1 Medición de la actividad antioxidante por el método de ABTS <sup>+</sup> .	72
3.4.4.2 Medición de la actividad antioxidante por el método de DPPH <sup>·</sup> .	73
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	76
4.1 CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL FRUTO DE MORTIÑO ( <i>Vaccinium floribundum</i> H.B.K.).	76
4.1.1 Determinación del grado de madurez del fruto.	76
4.1.2 Determinación de máximos de absorbancia de los extractos crudos de cáscara (CrC) y pulpa (CrP).	76
4.2 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS.	78
4.2.1 Semicuantificación de antocianinas monoméricas totales y antocianinas poliméricas totales.	79
4.2.1.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial.	79
4.2.1.2 Semicuantificación de antocianinas poliméricas totales por el método de pH sustractivo.	81

4.2.2 Cuantificación de fenoles totales (FT) (método de Folin-Ciocalteu).	83
4.2.3 Caracterización y purificación del pigmento por CLAE.	85
4.2.3.1 Análisis por CLAE tipo analítico del extracto XC.	85
4.2.3.2 Análisis por CLAE tipo analítico del extracto XP.	87
4.2.3.3 Análisis por CLAE tipo preparativo del extracto XC.	92
4.2.3.4 Espectros UV-Vis de las antocianinas aisladas.	93
4.2.4 Elucidación estructural.	95
4.2.4.1 Antocianina monomérica pura E.	95
4.2.4.2 Antocianina monomérica pura D.	96
4.2.4.3 Antocianina monomérica pura C.	99
4.2.4.4 Antocianina monomérica pura B.	100
4.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante.	105
4.2.5.1 Método de ABTS <sup>+</sup> .	105
4.2.5.2 Método de DPPH <sup>·</sup> .	109
4.2.6 Comparación de los análisis de antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.	117
5. CONCLUSIONES	119
6. RECOMENDACIONES	120
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Datos para la curva de calibración para el método de Folin-Ciocalteu.	126
Anexo B. Datos para la curva de calibración del método de ABTS <sup>+</sup> .	126
Anexo C. Datos para la curva de calibración del método de DPPH <sup>•</sup> .	127
Anexo D. Gráficas de EC <sub>50</sub> y T <sub>EC50</sub> de cada muestra tratada por el método de DPPH <sup>•</sup> .	127

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

	Pág.
Diagrama 1. Metodología para el análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de Mortiño.	74
Diagrama 2. Metodología para el análisis de los pigmentos presentes en la pulpa de Mortiño.	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.	33
Figura 2. Tipos de flavonoides.	34
Figura 3. Biosíntesis de algunos Flavonoides por la vía del malonil-CoA.	35
Figura 4. Estructura básica de las antocianidinas.	37
Figura 5. Estructura de monosacáridos.	38
Figura 6. Biosíntesis de derivados antociánicos.	39
Figura 7. Estructura de una antocianina.	41
Figura 8. Espectros UV-Vis de las antocianinas a dos valores de pH.	42
Figura 9. Formación de la antocianina incolora por la adición del bisulfito.	44
Figura 10. Estructura del ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))	45
Figura 11. Estructura del DPPH (2,2-difenil-1-picrilihirazina).	46
Figura 12. Estructura de la resina XAD-7.	48
Figura 13. Estructura de la resina Sephadex LH-20.	49
Figura 14. Formas de las antocianinas a diferente pH.	50
Figura 15. Posible mecanismo de reacción de una quelación de un metal por la cianidina en presencia de ácido ascórbico (AcA).	52
Figura 16. Complejo coordinado metal-antocianina formado por ácido ascórbico (AcA), cobre y cianidina.	52
Figura 17. Copigmentación de antocianinas.	53
Figura 18. Cromatograma de CLAE del jugo de arándano.	54
Figura 19. Cromatograma de CLAE de jugo de uva.	55
Figura 20. Espectro UV-Vis de la -3-glicosidación (no acilación: línea punteada) y -3,5-glicosidación (acilación: línea continua) de pigmentos tipo antocianina.	56
Figura 21. Espectro de masas de la cianidina-3-glucósido (A) y cianidina-3-rutinosido (B) obtenidos en separación por cromatografía líquida (CL).	57
Figura 22. Constantes de acoplamiento en una antocianina.	58
Figura 23. Mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> H.B.K.).	59
Figura 24. Mortiño ( <i>Vaccinium floribundum</i> H.B.K.) (ampliada).	59
Figura 25. Fruto de mortiño.	60
Figura 26. Fruto de Mortiño seleccionado para el análisis.	63
Figura 27. Extracción del pigmento en la cáscara de Mortiño.	64
Figura 28. Extracción del pigmento en la pulpa de Mortiño.	65
Figura 29. Equipo de Rota-evaporación.	65
Figura 30. Separación de compuestos incoloros de baja polaridad por CC con amberlita XAD-7.	66
Figura 31. Equipo de CLAE Merck equipado con DAD Hitachi L-4500 y una columna phenomenex Synergi MAX-RP80R (250 x 6.00 mm).	68

Figura 32. Espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 11.	70
Figura 33. Espectro UV-Vis del extracto CrC.	77
Figura 34. Espectro UV-Vis del extracto CrP.	77
Figura 35. Variación del color respecto al pH del extracto crudo del mortiño.	77
Figura 36. Residuos lipofílicos de los lavados de n-hexano para el extracto de la cascara (a) y de la pulpa (b).	78
Figura 37. Espectro en 3D de la primera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.	85
Figura 38. Espectro en 3D de la segunda fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.	86
Figura 39. Espectro en 3D de la tercera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.	86
Figura 40. Cromatograma en 3D de CLAE tipo analítico del extracto XC.	87
Figura 41. Cromatograma de CLAE tipo analítico del extracto XC.	87
Figura 42. Espectro en 3D de la primera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.	88
Figura 43. Espectro en 3D de la segunda fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.	88
Figura 44. Espectro en 3D de la tercera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.	89
Figura 45. Espectro en 3D de la cuarta fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.	89
Figura 46. Cromatograma en 3D de CLAE tipo analítico del extracto XP	90
Figura 47. Cromatograma de CLAE tipo analítico del extracto XP.	90
Figura 48. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica B del extracto XC (tr = 11.61).	91
Figura 49. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica B del extracto XP (tr = 11.68).	91
Figura 50. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica E del extracto XC (tr = 14.26).	92
Figura 51. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica E del extracto XP (tr = 14.25).	92
Figura 52. Cromatograma de CLAE tipo preparativo del extracto XC.	93
Figura 53. Espectro UV-Vis de la antocianina C purificado por CLAE-DAD.	94
Figura 54. Espectro UV-Vis de la antocianina D purificado por CLAE-DAD.	94
Figura 55. Espectro de CLAE tipo analítico de la cianidina-3-O-glucosa.	95
Figura 56. Espectro de Uv-Vis de la cianidina-3-O-glucosa.	95
Figura 57. Estructura de la cianidina-3-O-glucosa.	96
Figura 58. Espectro de UV-Vis de la pelargonidina.	96
Figura 59. Espectro de masa de la antocianina monomérica D.	97
Figura 60. Posibles fragmentaciones de la luteolinidina-5-O-ramnosa-O-glucosa-7-O-glucosa.	98
Figura 61. Espectro de masa de la antocianina monomérica C.	99
Figura 62. Posibles fragmentaciones de la cianidina-3-O-arabinosa-5-O-glucosa.	100

Figura 63. Espectro de masa de la antocianina monomérica B.	101
Figura 64. Posibles fragmentaciones de la cianidina-3-O-glucosa-O-ramnosa-5-O-glucosa.	102
Figura 65. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la antocianina B (campo bajo).	104
Figura 66. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la antocianina B (campo alto).	104
Figura 67. Figura 67. Estructura de la cianidina-3-O-hexosa-ramnosa-5-O-hexosa	105
Figura 68. Cambio de color del radical ABTS <sup>•</sup> por acción de un antioxidante	105
Figura 69. Cambio de color del radical DPPH <sup>•</sup> por acción de un antioxidante	109



## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica N° 1. Comparación de resultados de antocianinas monoméricas totales entre los extractos crudo y purificado por CC con amberlita XAD-7.	80
Gráfica N° 2. Comparación de la densidad de color, color antocianico y polimérico en los extractos CrC, CrP, XC y XP.	82
Gráfica N° 3. Comparación de los resultados de % de color polimérico entre extractos CrC, CrP, XC y XP.	82
Gráfica N° 4. Curva de calibración del ácido gálico.	83
Gráfica N° 5. Comparación de resultados de F.T. entre los extractos de crudo y purificado por CC con amberlita XAD-7.	84
Gráfica N° 6. Curva de calibración para el método de ABTS <sup>••</sup> .	106
Gráfica N° 7. Relación de % de inhibición.	107
Gráfica N° 8. Relación de TEAC de los diferentes extractos del mortiño.	108
Gráfica N° 9. Comparación de los resultados de TEAC entre extractos crudos de pulpa de frutos tropicales.	109
Gráfica N° 10. Curva de calibración del radical del método DPPH <sup>•</sup> .	110
Gráfica N° 11. Gráficas de los DPPH <sup>•</sup> remanentes versus el tiempo para cada muestra tratada.	
a) Gráfica del patrón de AcA.	110
b) Gráfica para el extracto CrP.	111
c) Gráfica para el extracto CrC.	111
d) Gráfica para el extracto XP.	111
e) Gráfica para el extracto XC.	112
f) Gráfica para la antocianina B.	112
g) Gráfica para la antocianina C.	112
h) Gráfica para la antocianina D.	113
Gráfica N° 12. Porcentaje de inhibición de las muestras en la mayor concentración de los extractos AcA, CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.	115
Gráfica N° 13. EC <sub>50</sub> para el AcA.	116
Gráfica N° 14. T <sub>EC50</sub> para el AcA.	116
Gráfica N° 15. Eficiencia de antioxidante (EA).	117

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1. Ejemplos de antocianidinas.	37
Tabla N° 2. Tipos de pigmentos naturales	41
Tabla N° 3. Propiedades físicas y químicas de la resina XAD-7.	48
Tabla N° 4. Gradiente para CLAE para la separación de antocianinas en una columna de sílica C <sub>18</sub> .	54
Tabla N° 5. Gradiente para CLAE para la separación de antocianinas en una columna de sílica C <sub>18</sub> .	55
Tabla N° 6. Señales características en el espectro de RMN <sup>1</sup> H de los flavonoides.	58
Tabla N° 7. Nombres científicos y comunes de las especies que reciben el nombre de mortiño.	61
Tabla N° 8. Análisis bromatológicos del fruto del Mortiño ( <i>Vaccinium meridionale</i> ).	62
Tabla N° 9. Gradiente de solventes para CLAE tipo analítico.	68
Tabla N° 10. Ensayo de solventes, cantidad de inyección y flujo para la CLAE tipo preparativo.	69
Tabla N° 11. Ensayo N° 1 para la determinación del gradiente adecuado de elución para la CLAE tipo preparativo.	69
Tabla N° 12. Ensayo N° 2 para la determinación del gradiente adecuado de elución para la CLAE tipo preparativo.	70
Tabla N° 13. Gradiente de solventes para CLAE-EM.	71
Tabla N° 14. Características iniciales del fruto de Mortiño ( <i>Vaccinium floribundum H.B.K.</i> ).	76
Tabla N° 15. Pesos y cantidades aproximadas obtenidas de los extractos de cáscara y pulpa después de cada proceso de purificación.	78
Tabla N° 16. Antocianinas monoméricas totales de los extractos CrC, CrP, XC y XP.	79
Tabla N° 17. Concentración de antocianinas monoméricas presentes en pulpa crudas de algunas frutas.	80
Tabla N° 18. Antocianinas poliméricas por el método de pH sustractivo para los extractos CrC, CrP, XC y XP.	81
Tabla N° 19. Fenoles totales de los extractos CrC, CrP, XC y XP.	83
Tabla N° 20. Concentración de FT presentes en pulpa cruda de algunas frutas.	84
Tabla N° 21. Cantidad de antocianinas puras.	93
Tabla N° 22. Absorbancias en la $\lambda_{\text{máx}}$ absorbancia y a 440 nm de las antocianinas puras.	94
Tabla N° 23. Datos obtenidos del espectro de RMN <sup>1</sup> H de la antocianina B.	103
Tabla N° 24. Resultados del método de ABTS <sup>•+</sup> de los extractos de AcA, CrC, CrP, XC y XP.	107

Tabla N° 25. Resultados del método de ABTS <sup>+</sup> para las antocianinas puras.	108
Tabla N° 26. Tiempo de estabilización de la reacción del antioxidante con el DPPH <sup>•</sup> .	114
Tabla N° 27. Parámetros calculados de las diferentes muestras para el método de DPPH <sup>•</sup> .	115
Tabla N° 28. Comparación de AT, FT y ABTS <sup>+</sup> , DPPH <sup>•</sup> de los extractos CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.	118

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%: Porcentaje  
% [DPPH]<sub>rem</sub>: Porcentaje de DPPH<sup>•</sup> remanente  
[M<sup>+</sup>]: Ion molecular  
±: Más o menos  
μL: microlitro  
μmol: micromol  
Å: Amstrong  
Abs: Absorbancia  
ABTS<sup>•+</sup>: Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico  
AcA: Ácido ascórbico  
AcOH: Ácido acético  
AT: Antocianinas totales monoméricas  
C<sub>18</sub>: Columna para cromatografía de fase reversa que contiene cadenas de hasta 18 carbonos  
CA: Capacidad antioxidante  
CC: Cromatografía de columna  
Cin: Cianidina  
CLAE: Cromatografía líquida de alta eficiencia  
CLAE-EM: Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas  
CrC: Extracto crudo de cascara  
CrP: Extracto crudo de pulpa  
CV: Coeficiente de variación  
DAD: Detector de arreglo de diodos  
DPPH: 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo  
DS: Desviación estándar  
EA: Eficiencia de antioxidante  
EC<sub>50</sub>: Concentración necesaria de antioxidante para reducir la concentración de un radical a la mitad  
FD: Factor de dilución  
FT: Fenoles totales  
g: gramos  
Gli: Glúcido  
Glu: Glucosa  
J: Constante de acoplamiento  
kg: kilogramo  
L: Litro  
LH-20: Sephadex L-20  
M: Molar  
m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar  
m/z: Relación masa-carga

MeOH: Metanol  
mg: miligramos  
min: Minuto  
mL: mililitro  
mM: milimolar (mmol/L)  
mmHg: milímetros de mercurio  
mol: Mol  
N: Normal  
nm: nanometros  
°C: Grados centígrados  
*p* -: Para  
Pg: Pelargonidina  
pH: Potencial de hidrogeno  
ppm: Partes por millón (mg/L)  
R: Sustituyente  
r.p.m.: Revoluciones por minuto  
R<sup>2</sup>: Coeficiente de correlación  
RMN: Resonancia magnética nuclear  
RMN <sup>1</sup>H: Resonancia magnética nuclear de protones  
TEAC: Actividad antioxidante equivalente al trolox  
T<sub>EC50</sub>: Tiempo que tarda el antioxidante en reducir la concentración de un radical a la mitad.  
TFA: Ácido trifuroacetico (trifuroacetic acid)  
T°: Temperatura  
tr: Tiempo de retención  
Trolox: Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico  
UV-Vis: Ultravioleta-visible  
XAD-7: Amberlita XAD-7  
XC: Extracto purificado por CC con amberlita XAD-7 de cascara  
XP: Extracto purificado por CC con amberlita XAD-7 de pulpa  
 $\alpha$ : Alfa  
 $\beta$ : Beta  
 $\delta$ : Desplazamiento en el espectro de RMN  
 $\Delta$ : Diferencia  
 $\epsilon$ : Coeficiente de extinción molar (absortividad molar)  
 $\lambda$ : Longitud de onda  
 $\pi$ : pi  
 $\bar{X}$ : Promedio

## RESUMEN

Los pigmentos tipo antocianina son los responsables de los colores rojo, azul y morado en frutas y flores. Este tipo de compuestos, además de ser potentes antioxidantes, tienen propiedades terapéuticas en el tratamiento de enfermedades circulatorias, son antiinflamatorios y antitumorales. Además, este tipo de pigmentos, ha llamado la atención de muchos investigadores ya que no son tóxicos ni mutagénicos, contrario a los pigmentos sintéticos que producen graves efectos a la salud.

En este trabajo se extrajeron, purificaron y caracterizaron los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.) por medio de técnicas como la cromatografía en columna (CC), ultra violeta - visible (UV-Vis), cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE-DAD), cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (CLAE-EM) y resonancia magnética nuclear (RMN). También se realizaron pruebas de actividad biológicas, por medio de los métodos de TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox) y DPPH' (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, expresada en Eficiencia antiradical (EA)); la cantidad de antocianinas monoméricas (expresadas como AT) y poliméricas por medio de los métodos de pH diferencial y pH sustractivo respectivamente, cuantificando además, los fenoles totales (FT) por el método de Folin-Ciocalteu. Las anteriores pruebas se realizaron a los extractos crudos (pulpa y cáscara), a sus fracciones aisladas por CC con amberlita XAD-7 y a las antocianinas purificadas por CLAE tipo preparativo, presentes en este fruto.

Por medio de métodos de UV-Vis, CLAE-EM y RMN se identificaron tentativamente las antocianinas: cianidina-3-O-glucosa (E), cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-arabinosa-n-O-glucosa (C) y luteolinidina-n-O-ramnosa-O-glucosa-n-O-glucosa (D).

Realizando una comparación de AT y FT del extracto crudo de pulpa del mortiño (CrP) con otras frutas analizadas bajo las mismas condiciones (KUSKOSKI, 2005), se encontró que este fruto está entre las que presentan un mayor valor de estos parámetros; además una buena capacidad antioxidante. De esta forma el fruto de Mortiño se perfila como una buena fuente de polifenoles, entre ellos las antocianinas, que pueden ser purificados para la obtención de patrones. De igual forma los extractos pueden ser una fuente de aditivos naturales para alimentos.

Los extractos purificados por CC con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP) presentan una mayor cantidad de AT, FT, TEAC y EA que sus homólogos sin procesar; esto se debe posiblemente al enriquecimiento en polifenoles de éstas fracciones. Se concluye que la CC usando resina XAD-7 fue eficiente. Por otra parte, comparando los extractos XC y XP, fue evidente que el extracto XC

presenta un mayor contenido de polifenoles (FT) que está reflejado en su mayor capacidad para capturar radicales libres (TEAC), sin embargo el extracto XP (con un menor contenido de FT) presentó una mayor EA lo que evidencia que el método DPPH<sup>\*</sup> caracteriza mejor estos extractos ya que tiene en cuenta el tiempo de reacción. (SANCHEZ, 1998)

La actividad antioxidante de las antocianinas puras (identificadas como nombres B, C y D) se midió mediante los mismos métodos. Entre estas antocianinas, quien presentó la mayor EA fue la antocianina B.

Palabras Claves: Mortiño, Antocianina, Pigmento, Antioxidante, CLAE.

## ABSTRACT

The anthocyanin pigments are responsible for the red, blue and purple colors in fruits and flowers. These types of compounds are potent antioxidant, and also have therapeutic properties in the treatment of circulatory illnesses, they are anti-inflammatory and they are anti-tumoral. Also, these types of pigments have gotten the attention of many investigators because they are not toxic neither mutagenic, contrary to the synthetic pigments that produce serious effects to health.

In this work we extracted, purified and characterized the anthocyanin pigments present in the fruit of mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.) by technicals as chromatography in column (CC), UV-Vis, high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-MS) and nuclear magnetic resonance (NMR). Also, we carried out biological activity tests, by methods like TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and DPPH<sup>•</sup> (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine, expressed in antiradical efficiency (AE)). The quantity of monomeric anthocyanins (expressed as total anthocyanin (TA)) and polymeric were determinate by methods of differential pH and subtractive pH respectively. The quantifying of total phenols (TP) was made by the Folin-Ciocalteu method. The previous tests were carried out to the raw extracts (pulp and shell), to the fractions isolated by CC with amberlite XAD-7 and to the anthocyanins purified by HPLC preparative, present in this fruit.

By methods of UV-Vis, HPLC-MS and NMR the anthocyanins: cyanidin-3-o-glucose (E), cyanidin-n-O-hexose-n-O-hexose-rhamnoside (B) cyanidin-n-O-pentose-n-O-hexose (C) y luteolinidin-n-O-methylpentose-O-hexose-n-O-hexose (D) were tentatively identified.

Carrying out a comparison of TA and TP of the raw extract of pulp of mortiño (CrP) with other fruits analyzed under the same conditions (KUSKOSKI, 2005), it was found that this fruit is among those that present a bigger value of these parameters. Furthermore, comparatively it possesses a bigger antioxidant capacity. This way the fruit of Mortiño is profiled like a good polyphenols source, among them the anthocyanins that can be purified to obtain patterns. Also the extracts can be a source of natural preservatives for foods.

The purified extracts by CC with amberlite XAD-7 of skin (XS) and pulp (XP) presents a bigger quantity of TA, TP, TEAC and AE than their homologous without processing; this is possibly because the enrichment in polyphenols of these fractions. We conclude that the CC with XAD-7 resin was efficient. On the other hand, comparing the extracts XS and XP, it was evident that the extract XS presents a bigger polyphenols content (TP), this is reflected in its biggest capacity to capture free radicals (TEAC), however the extract XP (with a smaller content of



TP) has a bigger AE, this evidences that the method DPPH<sup>•</sup> characterizes these extracts better, since this method measure the time of reaction. (SANCHEZ, 1998)

The antioxidant activity of the pure antocyanins (identified as B, C and D) it was measured by means of the same methods. Among these antocyanins the biggest AE presented it was the antocyanin B.

Key words: Mortiño, Antocyanin, Pigment, Antioxidant, HPLC.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más relevantes que hoy en día ocupa la atención de muchos investigadores es el estudio de colorantes de origen natural como aditivos para alimentos que puedan servir como alternativa al uso de colorantes sintéticos, esto debido al creciente control en cuanto a efectos secundarios de este tipo de colorantes y a las preferencias por parte de los consumidores. (EINBONDA, 2003) A su vez, se ha incrementado el interés en alimentos y extractos ricos en antocianinas por sus comprobados beneficios para la salud, ya que las antocianinas además de ser potentes antioxidantes (KUSKOSKI, 2004), no tóxicas y no mutagénicas, tienen propiedades terapéuticas en el tratamiento de enfermedades circulatorias, son antiinflamatorias, controlan la diabetes y son antitumorales (SCORDINO, 2004) (DEWICK, 2002) (LIANG, 2006). Estas propiedades hacen de las antocianinas presentes en frutas una interesante alternativa para su uso en lugar de los colorantes sintéticos.

El conocimiento químico de los pigmentos presentes en casi todas las frutas colombianas es aún desconocido, por lo tanto es de gran interés para el país dedicar esfuerzos de investigación al desarrollo de este campo, de modo que se pueda averiguar el verdadero potencial de ellas, no solo como alimento directo para los consumidores, sino también para saber si pueden servir como materia prima para la preparación de productos (aditivos naturales) con importante valor agregado.

Entre los frutos de nuestra región que se caracterizan por su alto contenido en pigmentos se encuentran el motilón y el mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.). Este último es un fruto silvestre en forma de baya de color rojo que se puede encontrar en las zonas alto-andinas nariñenses y se comercializa para su consumo directo, en forma de mermeladas o de jugos. Esta investigación tiene como objetivo principal realizar un estudio químico de los pigmentos mayoritarios tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño.

De este modo, se pondrán en consideración nuevos elementos científicos para ampliar el conocimiento existente en torno a las plantas tropicales como un paso preliminar en el proceso de apropiación de nuestros recursos naturales para un mejor aprovechamiento de los mismos.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio químico de los pigmentos mayoritarios tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.)

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer, aislar y purificar los pigmentos tipo antocianina mayoritarios presentes en el fruto del mortiño por medio de técnicas cromatográficas como cromatografía de columna (CC) y cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).
- Cuantificar los fenoles totales presente en el fruto del mortiño por el método de Folin-Ciocalteu.
- Evaluar a nivel *in vitro* la capacidad antioxidante de los pigmentos presentes en el fruto del mortiño mediante las técnicas ABTS y DPPH.
- Elucidar la estructura del pigmento tipo antocianina que se encuentra en mayor cantidad, por medio de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

## 2. MARCO REFERENCIAL.

### 2.1 ANTECEDENTES.

Hasta el momento se han descubierto más de 5000 flavonoides, la mayoría de los cuales parecen cumplir un papel muy importante en la alimentación humana, además de presentar propiedades medicinales muy interesantes. (MARTÍNEZ, 2002) Entre estas características están: propiedades antioxidantes, anticancerígenas, propiedades cardiotópicas, antitrombóticas, antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas y su ayuda en la disminución del colesterol, protección del hígado y del estómago. (DEWICK, 2002) (VIRGLI, 2001) Dentro de esta clase de compuestos se encuentran las antocianinas de las cuales se conocen aproximadamente 540. (WROLSTAD, 2005)

Las antocianinas, son los pigmentos más importantes de las frutas y las flores ya que atraen polinizadores para que dispersen su semilla y protegen las partes de la planta de la fotoinhibición y oxidación resultantes de la fotosíntesis. También contribuyen a las propiedades antioxidantes de ciertas frutas como uvas y arándanos agrios. Como pigmentos, son los responsables de los colores rojo, azul y púrpura en frutas. La antocianina más común y que presenta una buena actividad antioxidante es la cianidina-3-glucosa, la cual en su forma básica no presenta una azúcar como sustituyente (antocianidina o aglicona) y es llamada cianidina. (EINBONDA, 2003) Recientes hallazgos, indican la posibilidad que las antocianinas sean absorbidas como glucósidos, por lo que se tiene interés en los estudios de biodisponibilidad, incluyendo su absorción, destino metabólico y excreción. (GALVANO, 2004)

Recientemente, CHEN en el 2006 realizó estudios que revelaron que la cianidina-3-rutinosido y cianidina-3-glucosido extraídos del *Morus alba L.* ejercen una inhibición sobre el efecto de migración e invasión de células del carcinoma pulmonar humano en ausencia de citotóxicas, demostrando una capacidad anticancerígena y antiproliferativa las cuales pueden ser utilizadas potencialmente en terapias contra el cáncer. También observó una reducción del riesgo de contraer algunos tipos de cáncer hereditarios, por el consumo de una dieta rica en frutos que contengan gran cantidad de antocianinas.

KUSKOSKI, en el 2004 utilizó el radical ABTS<sup>•+</sup> para la determinación de la capacidad antioxidante de pigmentos antocianínicos. En su estudio de esta clase de pigmentos logró determinar que antocianinas puras como: delfinidina, cianidina, peonidina, pelargonidina y malvidina todas ellas glucosiladas en el C-3 del anillo C, con excepción de la delfinidina, presentan una buena actividad para la captura de radical. De estos antocianos ensayados, la delfinidina y cianidina 3-glucósido

presentaron una actividad antioxidante dos veces mayor que el Trolox, que fue el antioxidante sintético de referencia.

POMAR y NOVO en el 2005 desarrollaron métodos para distinguir especies entre cultivos de un mismo fruto entre uvas y fresas, identificando las antocianinas características de cada una y así crear una base de datos donde se pueden comparar otros cultivos. Los extractos de estas frutas fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), obteniendo como resultado la identificación total de diecinueve antocianinas en los cultivos de uvas y de veinticinco pigmentos de antocianinas en los cultivos de fresas; en los cuales la mayoría de ellos contenía pelargonidina (Pg) como aglicona y la glucosa y rutinosa como azúcares sustituyentes. También encontraron una variabilidad notable entre las concentraciones de antocianinas en las muestras de una misma variedad, debido al grado de madurez, factores climáticos y periodo de almacenamiento pos-cosecha.

Por los anteriores antecedentes y para la realización de esta investigación, se escogió el fruto del mortiño el cual presenta un llamativo color rojo. Este fruto es utilizado, en Colombia y Ecuador, para la fabricación de jugos, mermeladas, dulces, flanes, tortas, helados y vinos (ARJONA, 2001). En Europa y Estados Unidos se han realizado estudios de este fruto presentando propiedades vasoprotectoras y como defensa contra desórdenes oftalmológicos, por lo cual se comercializa el extracto con el nombre de Myrtocyan®. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>)

En Colombia, en el año 2006, JARAMILLO, elaboró estudios de viabilidad comercial y análisis bromatológicos y microbiológicos de pulpa de mora-mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.) en estas combinaciones: 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 respectivamente, con el fin de obtener una pulpa que cumpliera con los parámetros y requisitos exigidos por el Ministerio de Salud. La combinación con resultados favorables fue la de 80% mora - 20% mortiño, ya que porcentajes muy altos de mortiño para conseguir pulpa combinada (más del 30%) dan como resultado un producto de baja calidad (mal sabor, mal olor y aspecto desagradable). Dadas las características del producto evaluado (mora - mortiño) concluyeron que el método de pasteurización es el más adecuado para la conservación del producto.

## 2.2 MARCO CONTEXTUAL.

Según investigaciones realizadas por ARJONA en el 2001, el mortiño es una planta silvestre que se encuentra en los bosques alto-andinos, en altitudes entre los 2300 y 3500 m.s.n.m. y es frecuentemente encontrada también en asociaciones naturales con las coníferas sembradas en los programas de reforestación realizados en el país, en las zonas de alta montaña. Su distribución

geográfica abarca las zonas andinas de Suramérica, desde el norte de Ecuador hasta los límites de Colombia con Venezuela.

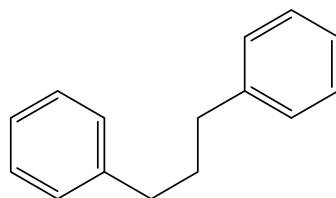
Por tradición oral se conoce que el mortiño se encuentra en la zona nariñense, en la mayoría de los municipios (Tambo, Ipiales, Túquerres, Guachucal, entre otros) y en los alrededores de San Juan de Pasto en los corregimientos de Buesaquillo, Laguna de la Cocha, La Laguna y en el corregimiento de Villa Moreno en el municipio de Buesaco, entre otros.

## 2.3 MARCO TEÓRICO.

### 2.3.1 Pigmentos Naturales.

2.3.1.1 Flavonoides. Se denominan como flavonoides a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos  $C_6C_3C_6$ ), como se indica en la figura 1 y se encuentran ampliamente distribuidas en los vegetales y que son biosintetizadas a partir del ácido shikímico y de la acetilcoenzima A vía malonilCoA. (KURT, 1997)

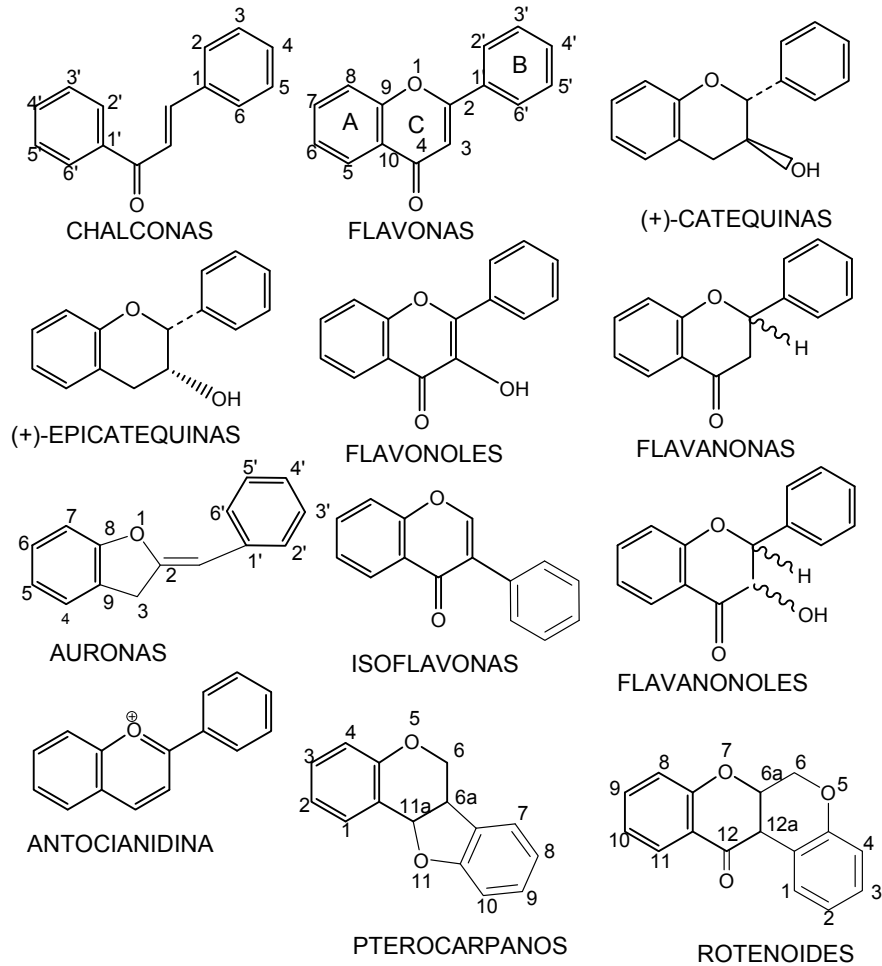
Figura 1. Estructura básica de los flavonoides.



Los flavonoides se clasifican de acuerdo con las variaciones estructurales que presenta la cadena central C3 (ver figura 2). La mayoría de agliconas y flavonoides poseen nombres triviales con la terminación INA u OL. Por ejemplo la acacetina es una flavona y corresponde a la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona; la quercetina es un flavonol y corresponde al 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol; la naringenina es una flavanona y corresponde a la 5,7,4'-trihidroxiflavanona.

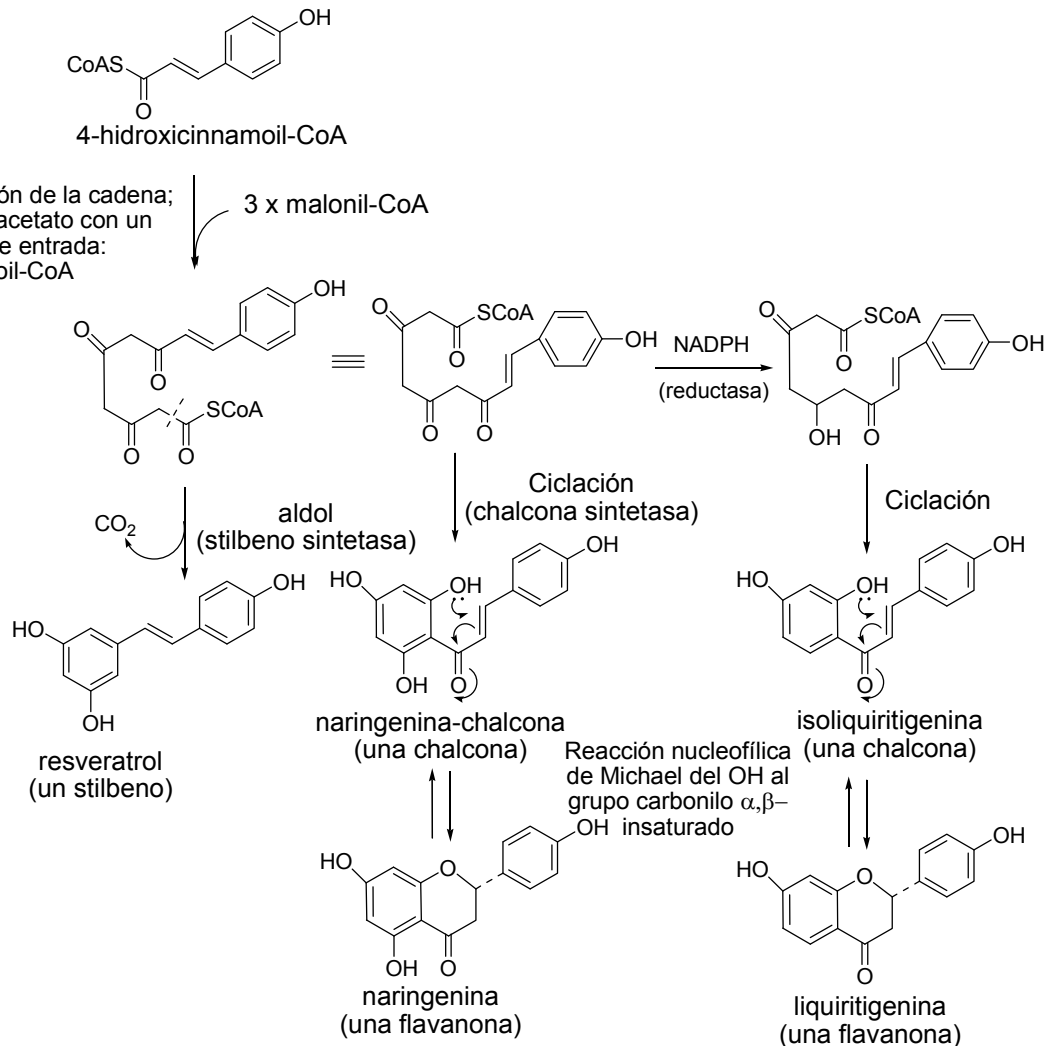
En el caso de los glicósidos flavonoides es muy común nombrarlos con relación al nombre trivial de la aglicona. Por ejemplo la apigenina corresponde a la 5,7,4'-trihidroxiflavona y la vitexina corresponde al 8-C-D-glucopiranosido de apigenina. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>)

Figura 2. Tipos de flavonoides.



Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto; de donde, el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B proviene de la ruta del ácido shikímico (ver figura 3). Un tricétido se cicla y se condensa con una molécula de ácido *p*-cumárico. La enolización del ciclo proveniente de la ruta de la malonilCoA da origen al anillo aromático A en las chalconas y flavanonas. (DEWICK, 2002).

Figura 3. Biosíntesis de algunos Flavonoides por la vía del malonil-CoA.



Las flavonas y chalconas son los precursores de las demás clases de flavonoides formados por un ataque nucleofílico tipo Michael del grupo fenólico al grupo α,β-insaturado del flavonoide.

Es importante resaltar que el proceso de biosíntesis se sustenta el hecho que en la mayoría de flavonoides, el anillo A es *meta*-oxigenado, como es característico de los anillos aromáticos originados por la vía de la malonilCoA; por otro lado, el anillo B proveniente de la ruta del ácido shikímico, generalmente es *orto*-oxigenado. (DEWICK, 2002)

a) Actividad biológica de los flavonoides. Las plantas tienen la habilidad de sintetizar una inmensa serie de compuestos que no participan en su metabolismo primario, los cuales son compuestos orgánicos tales como los fenoles,



terpenoides, flavonoides y alcaloides, considerados como metabolitos secundarios. Hasta la mitad del último siglo, estos compuestos fueron considerados como productos metabólicos inútiles. Sin embargo, FRAENKEL en 1959 propuso que los metabolitos secundarios, pueden cumplir funciones primarias formando una relación ecológica planta–animal y sobre todo, la capacidad defensiva de la planta contra organismos herbívoros. (MANETAS, 2006)

Los flavonoides se han aislado de muchos vegetales debido a que son productos naturales muy comunes. Su presencia en forma de extracto en una droga no necesariamente explica sus propiedades farmacológicas. Se les ha atribuido una cantidad de propiedades farmacológicas, incluyendo actividad inhibitoria de enzimas (hidrolasas, ciclooxigenasas, fosfatasa alcalina, cAMP fosfodiesterasas, ATP-etas, liasas, hidroxilasas, transferasas, oxidoreductasas y quinasas), antiinflamatorias, anticancerígenas, antibacteriales y antivirales. (DEWICK, 2002)

Existen algunas evidencias en el sentido de que los consumidores de vinos rojos y vinotinto presentan baja mortalidad por enfermedades coronarias y ello se debe a los compuestos fenólicos presentes, entre los cuales están los flavonoides como la catequina, epicatequina y quercetina. Las procianidinas presentes en las uvas tienen uso potencial en isquemias cardíacas. (BRIDLE, 1997)

También se ha publicado que flavonoides como la naringenina, eriodictiol y luteolina inhiben la agregación plaquetaria y presentan acción vasodilatadora y antiarrítmica; las chalconas tienen acción antimicótica y antibacteriana; la 3-ramnosilquercetina presenta actividad antidiarréica; las isoflavanquinonas tienen potente actividad antiinflamatoria y antialérgica; los flavonoles presentan actividad antiespasmolítica; las isoflavonas y flavanonas son antimicóticas; los isoflavanos son antimicrobianos y los flavanos tienen actividad leishmanicida. Las antocianinas por sus características se han utilizado como colorantes de alimentos. Además se ha reportado el uso potencial de ciertos flavonoides en cosméticos. (LIANG, 2006) (KUSKOSKI, 2005)

b) Flavonoides tipo antocianina. Las antocianinas son derivados de los flavonoides, provienen de las chalconas y generalmente se encuentran en forma de sal.

Con base en la figura 4, la tabla 1 muestra algunos ejemplos de flavonoides tipo antocianidinas.

Figura 4. Estructura básica de las antocianidinas.

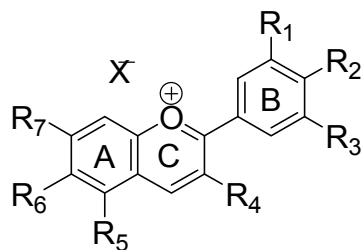
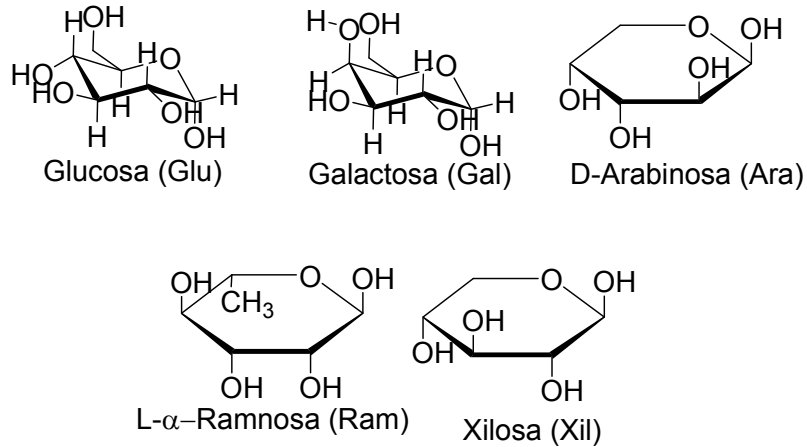


Tabla N° 1. Ejemplos de antocianidinas.

Sustituvente Antocianidina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Aurantidinina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Apigenidina	-H	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Cianidina	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delfinidina	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Luteolinidina	-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidina	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidina	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidina	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH <sub>3</sub>

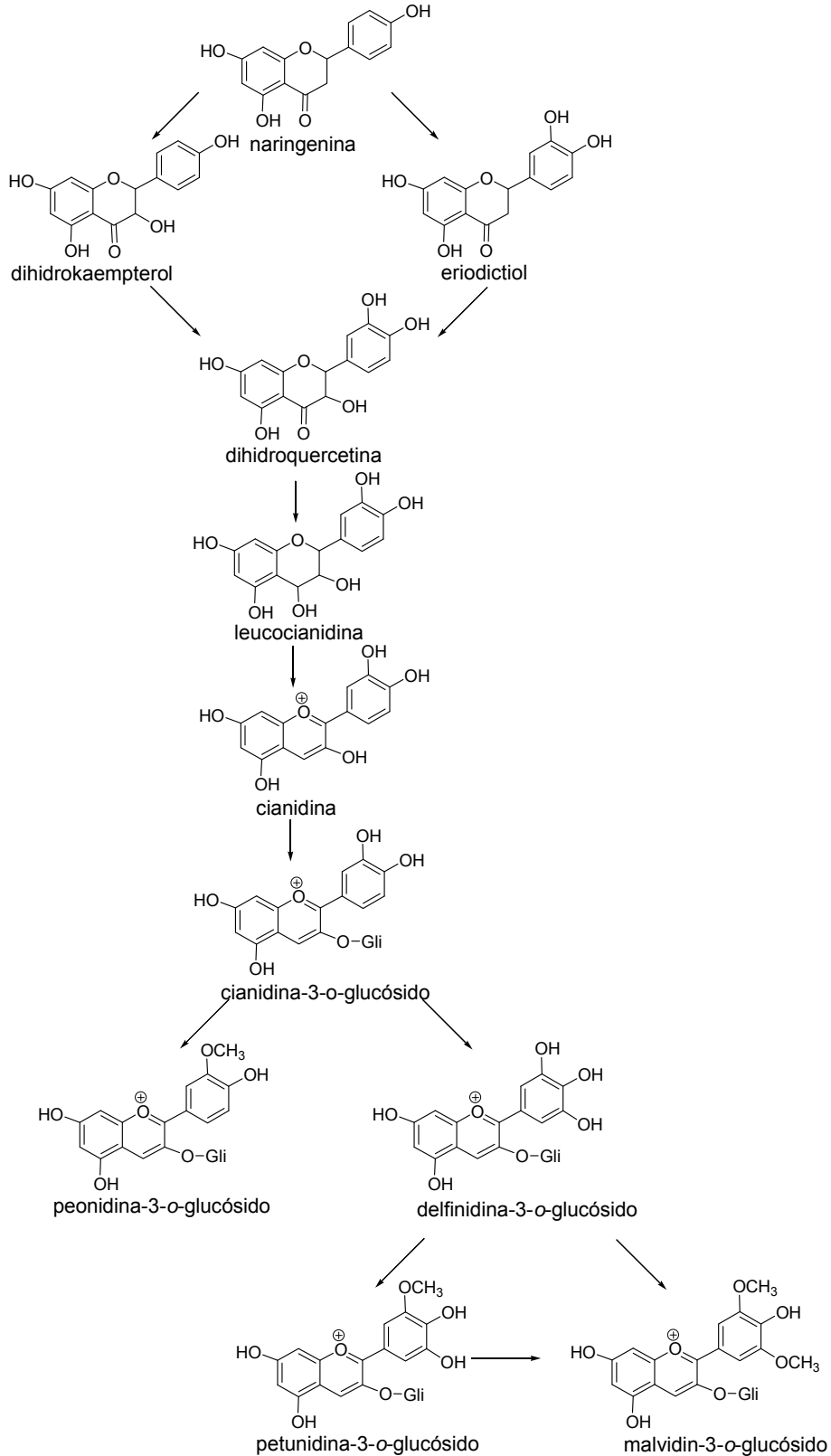
Las antocianidinas se pueden unir a un grupo de monosacáridos o glúcidos (Gli), entre los que se encuentran la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y xilosa (ver figura 5) (LUQUE, 1995). Cuando los Gli se unen a las agliconas, forman un glucósido llamado antocianina (KURT, 1997).

Figura 5. Estructura de monosacáridos.



En la figura 6, se observa la biosíntesis de las antocianinas y derivados, donde la flavanona sufre una doble hidroxilación en la posición 3 del anillo C y en la posición 3' del anillo B, la que puede suceder en diferente orden, produciendo la dihidroquercetina. Esta última presenta una reducción del grupo carbonilo formando la leucocianidina que a su vez es deshidratada y se forma una carga en el oxígeno del heterociclo por la antocianidinsintasa formando la cianidina que es una antocianidina, el cual es glicosidado por acción del flavoniodo-3-O-glicosiltransferasa para producir la antocianina llamada cianidina-3-O-glucosido. (REDDY, 1996)

Figura 6. Biosíntesis de derivados antociánicos.



➤ Función biológica de las antocianinas. Debido a que las antocianinas dan el color azul, rojo o púrpura a las plantas y a que son fácilmente degradados en el intestino, se utilizan principalmente como colorantes naturales, medicamentos y alimentos.

Estos compuestos tienen funciones importantes en las plantas, tales como: (REDDY, 1996)

- Atraen insectos para la polinización,
- Protegen a la planta de la luz ultravioleta (UV),
- Sirven como insecticidas y defensa contra agentes patógenos,
- Son una señal en el proceso de nodulación,
- Modulan la producción de hormonas,
- Ayudan a la regeneración de tejidos heridos y
- Proporcionan resistencia a una variedad de condiciones hostiles.

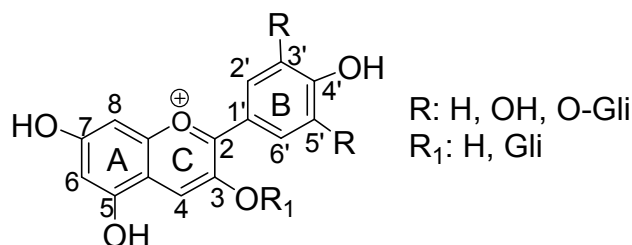
La función fundamental de las antocianinas en el cuerpo humano, es la protección de los capilares de la retina desempeñando un papel importante para la conservación de la visión. Además parecen tener propiedades antivirales, homeostáticas, por lo que pueden desempeñar un papel en el tratamiento de las infecciones y la detención del sangrado. Protegen el corazón de las enfermedades cardiovasculares y tienen, como los demás flavonoides, un poder antioxidante. (DEWICK, 2002)

➤ Actividad antioxidante. Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerosas y neurológicas. Poseen actividad anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica, esto se debe a que los polifenoles son efectivos donadores de hidrógenos, particularmente los flavonoides. Su potencial antioxidante depende 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- $\pi$ . (RAMIREZ, 2001)

Los antocianos, pigmentos flavonólicos, tienen una estructura química adecuada para actuar como antioxidantes, pueden donar hidrógenos, o 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, debido a sus estructuras resonantes. Los grupos hidroxilos libres en las posición 3 del anillo C y en la posición 5 del anillo A, son donadores de electrones (ver figura 7). La diversidad estructural contribuye favorablemente a la

existencia natural de unos 300 antocianos con diferentes sustituciones glucosídicas. (KUSKOSKI 2005) (KUSKOSKI 2004)

Figura 7. Estructura de una antocianina.



➤ Fuentes de antocianinas. Las antocianinas se encuentran comúnmente en la capas epidérmicas de un gran número de frutas como las uvas negras (*Vitis vinifera*, Ampelidaceae), la mora, la fresa, el repollo morado, el pericarpio del rábano rojo, el grosellero negro (*Ribes nigrum*, Saxifragaceae), las manzanas (*Malus pumila*), ciruelas (*Prunus domestica*) y peras (*Pyrus communis*). Si la epidermis de una fruta contiene cantidades significativas de antocianinas, la pulpa podría tener algunas pequeñas concentraciones del mismo compuesto. (CEDILLO, 2004)

Las bayas, en general, tienen una distribución más uniforme de antocianinas que las demás frutas; sin embargo en estas la concentración de antocianinas se incrementa rápidamente a medida que van madurando. (VAN BUREN, 1970).

2.3.1.2 Otros tipos de pigmentos naturales. Otro tipo de pigmentos naturales se muestran en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Tipos de pigmentos naturales

Pigmento	Color	Fuente
Clorofilas <sup>a</sup>	Verde	Plantas verdes
Carotenos <sup>b</sup>	Amarillo, anaranjado o rojo	Vegetales y animales
Betalainas <sup>c</sup>	Purpura y amarillo	Familias Centrospermae
Reacciones de mallard <sup>d</sup>	Melanoidinas coloreadas	Tipo de oscurecimiento no enzimático

<sup>a</sup> CURTIS, 1993, <sup>b</sup> SNODDERLY, 1995, <sup>c</sup> DELGADO, 2000, <sup>d</sup> BADUI, 1999.

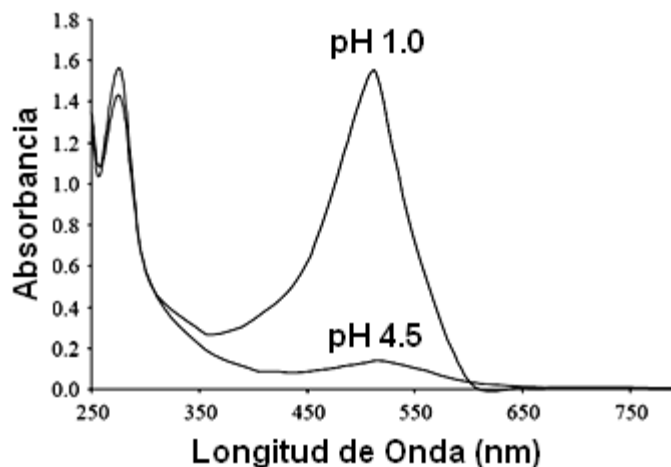
2.3.2 Índices antociánicos.

2.3.2.1 Antocianos totales. En el año 2005, KUSKOSKI publicó que el índice de antocianinas totales permite la estimación alternativa del contenido de antocianos totales. Se utilizan dos sistemas tampón: ácido clorhídrico/ cloruro de potasio de

pH 1,0 (0,025 M) y ácido acético/ acetato sódico de pH 4,5 (0,4 M). La antocianina experimenta una transformación reversible con los cambios de pH, manifestado un efecto hipocrómico en la absorbancia (ver figura 8). La forma oxonium predomina a pH 1 y el hemiacetal a pH 4,5.

El pH diferencial es un método basado en el efecto hipocromico causado por el cambio de pH y permite una rápida y exacta medida de las antocianinas totales, incluso en la presencia de pigmentos degradados, polimerizados y de otros compuestos interferentes. Este método fue utilizado primero por FULEKI y FRANCIS en 1968 para medir el contenido de antocianina en arándano. (GIUSTI, 2001)

Figura 8. Espectros UV-Vis de las antocianinas a dos valores de pH.



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

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

En donde  $A_{\lambda_{vis-max}}$  es la absorbancia en la longitud de onda máxima a pH 1 y pH 4,5, y  $A_{\lambda_{700}}$ , es la lectura a 700 nm, tanto para pH 1 como pH 4,5 Para calcular la concentración en la muestra original se sigue la siguiente fórmula:

$$\text{Antocianina monomérica} \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{(A \times Pm \times FD \times 1000)}{\epsilon \times 1}$$

Donde:

A = Es la absorbancia antes calculada

FD = Es el factor de dilución

$\epsilon$  = El coeficiente de extinción molar (absortividad molar)

Pm= Peso molecular

El Pm y la  $\epsilon$  usadas en la fórmula corresponde a la antocianina predominante en la muestra, si la muestra es desconocida, el contenido de pigmento se calcula como cianidina-3-glucosa, con un peso molecular de 449,2 g/mol y  $\epsilon = 26900 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ .

La concentración final de antocianos (mg/100 g) se calcula con base en el volumen de extracto y peso de muestra.

2.3.2.2 Color polimérico. SOMERS y EVANS en 1974 desarrollaron un método espectrofotométrico que permite determinar algunos índices o parámetros de color; tratando extractos acuosos de antocianinas con bisulfito de sodio (ver figura 9) y su posterior lectura en las longitudes de onda de 420 nm, 700 nm y a la  $\lambda$  de máxima absorbancia.

Estos parámetros incluyen:

Densidad de color. Expresa el color debido a antocianinas monoméricas o copolimerizadas presentes y las reacciones de oscurecimiento.

Color polimérico. Este parámetro expresa el color debido a antocianinas copolimerizadas y de reacción de oscurecimiento (color resistente a la decoloración por bisulfito de sodio).

Porcentaje de color polimérico. Se define como la relación del color polimérico entre la densidad de color y expresa el porcentaje de color debido al material copolimerizado.

Color por antocianinas. Expresa el color debido a antocianinas monoméricas que son rápidamente decoloradas por bisulfito de sodio.

Los cálculos para determinar los parámetros de color son:

Muestra sin tratar con bisulfito de sodio:

$$\text{Densidad de color (DC)} = [(A\lambda_{vis-m\acute{a}x} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-m\acute{a}x} - A\lambda_{700})] \times FD$$

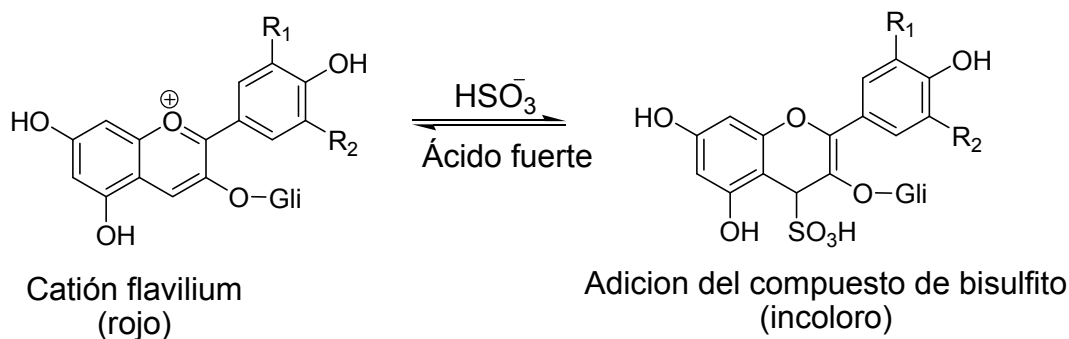
Muestra tratada con bisulfito de sodio:

$$\text{Color polimérico (CP)} = [(A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700}) + (A\lambda_{vis-max} - A\lambda_{700})] \times FD$$

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



Figura 9. Formación de la antocianina incolora por la adición del bisulfito.



2.3.2.3 Fenoles totales. El m3todo espectrofotom3trico de Folin- Ciocalteu para la determinaci3n de fenoles totales, se fundamenta en su car3cter oxidante y es el m3s empleado. Se utiliza como reactivo una mezcla de 3cidos fosfowolfr3mico y fosfomolibd3co en medio b3sico, que se oxidan para reducir los compuestos fen3licos, originando 3xidos azules de wolframio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) y molibdeno ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm. Los resultados se expresan en mg de 3cido g3lico por 100 g de pulpa de fruta (KUSKOSKI, 2005) (AGROINFO, disponible en [www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)).

2.3.2.4 M3todos para medir la actividad antioxidante. Existen diversos m3todos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias m3s aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias crom3genas de naturaleza radical; la p3rdida de color ocurre de forma proporcional con la concentraci3n. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan s3lo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. (KUSKOSKI, 2005)

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada s3lo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; tambi3n depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Las especies qu3micas interactúan entre si produciendo sinergias o inhibiciones que pueden alterar el resultado final. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estr3s oxidativo. (PRIOR, 1999)

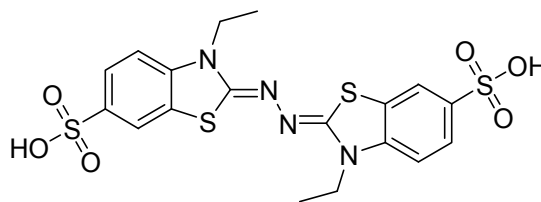
Diversos compuestos crom3genos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos fen3licos presentes en los frutos (KUSKOSKI, 2005); entre ellos, los m3s aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque tambi3n muestran diferencias. El DPPH es un radical libre

que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical  $ABTS^{+\cdot}$  tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (KUSKOSKI, 2004) (KUSKOSKI, 2005).

a) ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico). El radical se forma a partir de una reacción de oxidación en uno de los nitrógenos que tienen dobles enlaces, formando así el catión radical de color azul/verde.

El radical  $ABTS^{+\cdot}$  se obtiene tras la reacción del ABTS (ver figura 10) con persulfato potásico incubados a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ C$ ) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical  $ABTS^{+\cdot}$  se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ( $\pm 0,1$ ) a 734 nm (longitud de onda de máxima absorción). (KUSKOSKI, 2005) (KUSKOSKI, 2004)

Figura 10. Estructura del ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)).



Para determinar la capacidad antioxidante se utiliza generalmente Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico) con pureza del 97% como referencia, también puede ser utilizado el ácido ascórbico. Este procedimiento se basa en la determinación del porcentaje de inhibición de la absorbancia del catión radical, es decir que al tener una mezcla de catión radical:antioxidante (49:1), la absorbancia disminuye con el tiempo (de 1 a 7 min) y el porcentaje de inhibición se calcula con la siguiente ecuación: (KUSKOSKI, 2004) (RE, 1998)

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\Delta Abs}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100$$

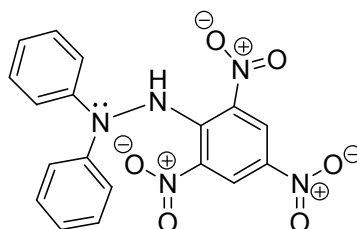
Donde:  $\Delta Abs$ : diferencia de absorbancia del catión radical con la absorbancia del catión radical con el antioxidante a 754nm;

$Abs_{m\acute{a}x}$ : absorbancia máxima del catión radical a 754 nm

Se realiza la curva de calibración de porcentaje (%) de inhibición contra concentración de patrón de referencia. Se realiza el mismo procedimiento con las muestras y por interpolación se podrá determinar el porcentaje de inhibición de la muestra en unidades de mM de Trolox por peso de la muestra en gramos.

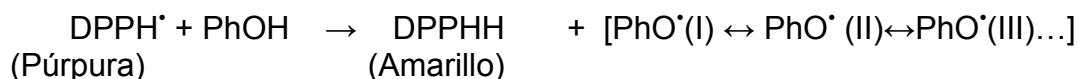
b) DPPH (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo). Este método, desarrollado en 1995 por Brand-Williams, se basa en la reducción de la absorbancia a 515 nm del radical DPPH<sup>•</sup> (ver figura 11), por reacción con antioxidantes. Esta reacción se completa al cabo de 30 a 60 minutos en la oscuridad, mostrando un máximo de inhibición del 80%. Para el análisis se emplea un antioxidante de referencia (ácido ascórbico). A diferencia del método ABTS, con este método se puede determinar si un antioxidante es eficaz o eficiente frente a la captura de un radical libre. (KUSKOSKI, 2005)

Figura 11. Estructura del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhirazina).



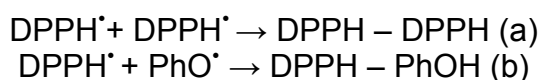
Los antioxidantes fenólicos (p. ej. PhOH) tienen la capacidad de capturar radicales libres. Esta actividad depende principalmente de los rasgos de las diferentes estructuras como la energía de disociación del enlace O-H. Produciéndose una deslocalización resonante del radical fenólico (PhO<sup>•</sup>) y el impedimento estérico derivado de los grupos voluminosos de los hidrógenos sustituidos en el anillo aromático. Las constantes de la reacción del antioxidante con el radical indican el orden de reactividad. (GÚLCINA, 2005)

La reacción puede ser:



Donde (I), (II), (III)... Son estructuras resonantes.

La concentración residual del radical depende exclusivamente de la concentración del compuesto fenólico, porque hay dos teorías de la reacción terminal:



Pero la ecuación (a) es impedida estéricamente (ver figura 11) y la ecuación (b) puede ocurrir en algunos casos, pero esto también puede ser impedido dependiendo del volumen de la molécula PhOH o del anillo aromático. (GÜLCINA, 2005)

Los resultados que se obtienen con los métodos ABTS y DPPH permiten realizar conclusiones similares. (KUSKOSKI, 2005)

Para determinar si un antioxidante es eficiente y/o eficaz se debe calcular el porcentaje de DPPH' remanente, con la siguiente ecuación:

$$\%[DPPH]_{rem} = \left( \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{t=0}} \right) \times 100$$

Donde  $[DPPH]_{t=0}$  es la concentración del DPPH' en tiempo cero y  $[DPPH]_t$  es la cantidad de DPPH' a tiempo t.

Con el  $\%[DPPH]_{rem}$  calculado para cada extracto, se observa el tiempo en el cual se estabiliza la reacción y con el  $EC_{50}$  se determina la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración del radical a la mitad y el tiempo necesario para lograr esto ( $T_{EC50}$ ). (ARUOMA, 2002)

Para calcular la eficiencia del antioxidante (EA), se utiliza la siguiente ecuación:

$$EA = \frac{1}{T_{EC50} \times EC_{50}}$$

Donde el valor de  $EC_{50}$  es inversamente proporcional al valor de la EA; ya que a menor  $EC_{50}$  mayor será la EA; es decir, la actividad para capturar radicales libres será mayor. (KALLITHRAKA, 2005).

### 2.3.3 Métodos de extracción, purificación y reconocimiento.

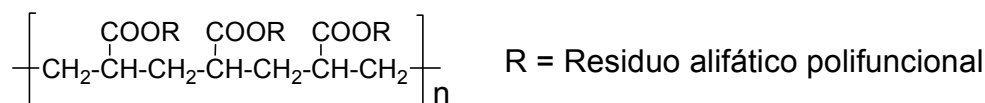
2.3.3.1 Extracción de pigmentos por medio de marchas analíticas. Debido a que las antocianinas tienen carácter polar, se emplean mezclas de solventes en medio ácido para aumentar la polaridad, tales como: ácido acético:metanol (1:19), metanol-ácido acético-agua (MAW) (11:1:5) ó la mezcla MFW, es decir metanol/ácido fórmico/agua en relación 10:1:9. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>). Después de la maceración, las muestras contienen compuestos lipofílicos que deben ser removidos con solventes no polares tales como n-hexano y acetato de etilo, para purificar los compuestos polifenólicos. (POMAR, 2005).

a) Características de la cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7. Para aislar las antocianinas de los flavonoides no coloreados y azúcares se utiliza una CC con una resina amberlita XAD-7 (SCORDINO, 2004) como fase estacionaria y mezclas de solventes polares como agua (para los compuestos - incoloros) y ácido acético-metanol (1:19) para los compuestos coloreados como fase móvil. La resina XAD-7 está formada por polímeros acrílicos (ver figura 12), obtenidos por la polimerización de los acrilatos (ésteres del ácido acrílico) (CH<sub>2</sub>=CHCOOH) u otros monómeros que contengan el grupo acrílico (CH<sub>2</sub>=CHCO-). Las propiedades físicas y químicas de la resina XAD-7 se encuentran en la tabla N° 2. (SCORDINO, 2004)

N° 3. Propiedades físicas y químicas de la resina XAD-7.

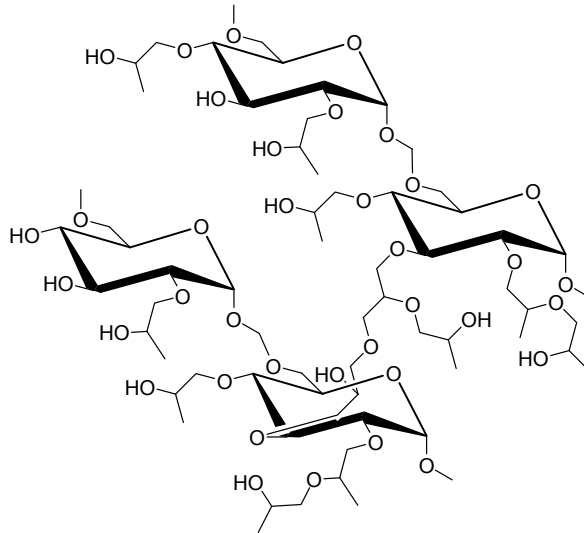
Estructura	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Radio del poro (Å)	Porosidad (mL/g)	Tamaño de partícula (mm)	Densidad (g/mL)
Acrílico	450	45	1,14	0,25-0,84	1,24

Figura 12. Estructura de la resina XAD-7.



b) Características de la CC con Sephadex LH-20. La resina Sephadex LH-20 (ver figura 13) es un medio para cromatografía líquida diseñada para productos naturales clasificados según su tamaño como esteroides, terpenoides, lípidos y péptidos de bajo peso molecular (por encima de 35 aminoácidos residuales) (AMERSHAM BIOSCENCES, en línea [www.skku-pharm.ac.kr](http://www.skku-pharm.ac.kr))

Figura 13. Estructura de la resina Sephadex LH-20.



Dependiendo de los solventes escogidos, este medio puede separar los componentes de la muestra por partición entre las fases estacionarias y móviles. La resina sephadex LH-20 es muy útil a escala analítica e industrial. Debido a su propiedad fisicoquímica única, este medio puede ser usado durante la parte inicial de la purificación de cromatografía de alta eficiencia de intercambio iónico o fase reversa, o también puede ser utilizada como evaluación en el punto final. Por ejemplo durante la preparación de diastereoisómeros. (AMERSHAM BIOSCENCES, en línea [www.skcupharm.ac.kr](http://www.skcupharm.ac.kr))

La sephadex LH-20 se caracteriza por: (AMERSHAM BIOSCENCES, en línea [www.skcupharm.ac.kr](http://www.skcupharm.ac.kr))

- Única selectividad cromatográfica debido a su matriz (dual) hidrofílica y lipofílica.
- Fácil predicción de elusión debido al comportamiento de la estructura química de la muestra.

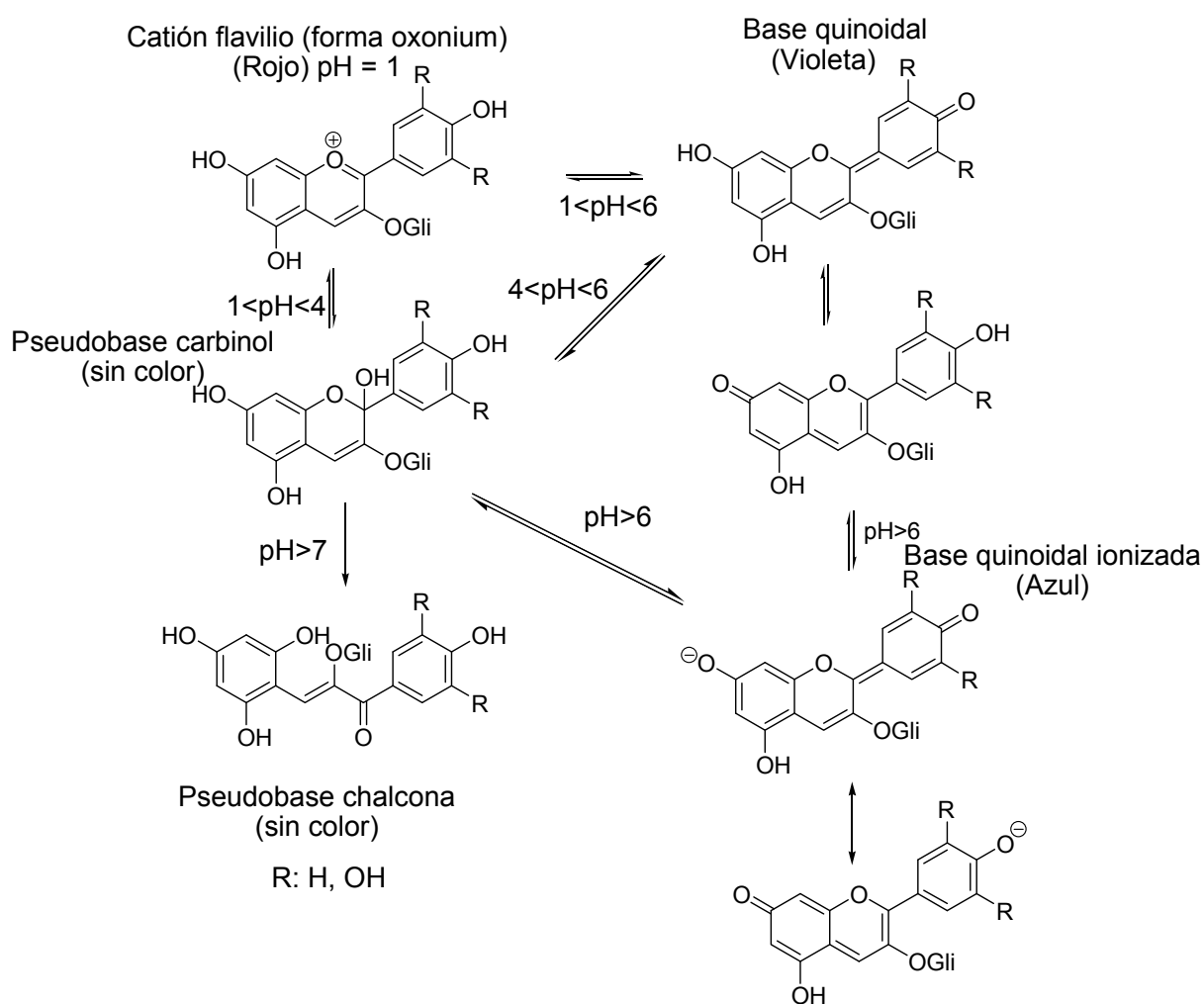
2.3.3.2 Estabilidad de antocianinas. La estabilidad de los pigmentos naturales depende de varios factores como los sustituyentes químicos que contengan, el pH, la temperatura, oxígeno, luz, iones metálicos, copigmentación, entre otros.

a) Efecto de pH. El pH tiene una marcada influencia en el color de las soluciones de antocianinas, se comportan como indicadores de pH debido a su naturaleza anfotérica. (JACKMAN, 1987) Las antocianinas a ciertos pH presentan diferente actividad debido a que esto repercute en su estabilidad molecular. Los espectros UV-Vis a diferentes pH también cambian y ayudan a determinar si una antocianina

está o no polimerizada ya que solo interesa la forma monomérica (ver apartado 2.3.2.1).

De acuerdo al valor del pH, se presenta una variación en el color que adquieren las antocianinas cuando están en solución. A pH ácido ( $\text{pH} < 1$ ) se observa un color rojo o anaranjado; un color azulado a pH entre 2 y 4 (predomina la base quinoidal); a un  $\text{pH} > 5$  la antocianina es incolora y presenta la pseudo base carbinol; a un  $\text{pH} > 6$  se tiene la pseudo base chalcona, que es también incolora; cuando el  $\text{pH} > 7$ , la antocianina se degrada de forma irreversible, como se muestra la figura 14 (SCORDINO, 2004).

Figura 14. Formas de las antocianinas a diferente pH.



La mayor estabilidad que muestran las antocianinas aciladas a cambios de pH y temperatura se debe a que los radicales acilo interactúan con los núcleos de flavilio y logran así dar mayor estabilidad a la copigmentación intramolecular,

además de prevenir la reacción de hidratación del C2 de la molécula. (DOUGALL, 1997)

Al variar el pH del extracto, se puede diferenciar las antocianinas de las betacianinas (pigmentos nitrogenados de colores rojos y violeta de plantas del orden *Centrosperma*, como p. ej. los pigmentos de la remolacha *Beta vulgaris*, *Fam. Chenopodiaceae* y también presentes en otras plantas como la *Phytolacca americana*, *Fam. Phytolaccaceae*, debido a que estas últimas no cambian de color como lo hacen las antocianinas. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>)

b) Efecto de oxígeno. El oxígeno es una de las causas importantes de la destrucción de los antocianos presentes en jugos, vinos tintos y por ende, en los concentrados de antocianos sólidos o líquidos. Por ello, es conveniente almacenarlos en atmósfera inerte (nitrógeno o anhídrido carbónico) y reducir a un mínimo el espacio de cabeza de los envases. (SARMA, 1999)

c) Efecto de la temperatura. El calor puede causar pérdidas del color durante el proceso a que se someten los alimentos y la cocción. Los ingredientes coloreados son adicionados a productos que son almacenados por largo tiempo y a las temperaturas mas bajas posibles durante el procesamiento de alimentos, siempre y cuando no se sometan a otro proceso de calentamiento. Para todos los tintes, el proceso a altas temperaturas causa una inevitable pérdida del color o cambios en matiz debido a la carbonización. (EDDY, 1951)

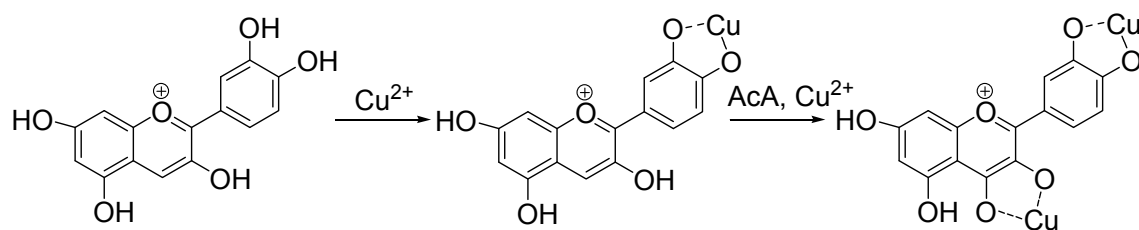
d) Efecto de la luz. La luz es capaz de inducir cambios fotoquímicos en todos los pigmentos; ocasionando, eventualmente la decoloración total. La resistencia a la degradación fotoquímica es denominada "light fastness".

El calor, varios agentes externos y los ingredientes de los alimentos son conocidos por acelerar la fotodegradación de los pigmentos, cuando otros proveen un efecto estabilizante. Los pigmentos pueden estar bajo tres reacciones fotoquímicas, denominadas *cis-trans* foto-isomerización, foto-reducción y foto-oxidación. (NAKAMURA, 1999)

e) Efecto de iones metálicos. La reacción del ácido ascórbico en presencia de oxígeno y un metal es conocida como hidroxilación de un anillo aromático en un medio no enzimático. Las antocianinas se encuentran en la forma de catión flavilio a un rango de pH bajo (2-4), siendo susceptibles a los ataques nucleofílicos en la posición 2 y 4, causando una hidroxilación en éstas posiciones. Para que la antocianina se proteja de este tipo de ataques se une a un ión metálico como lo muestra la figura 15. (SARMA, 1997)

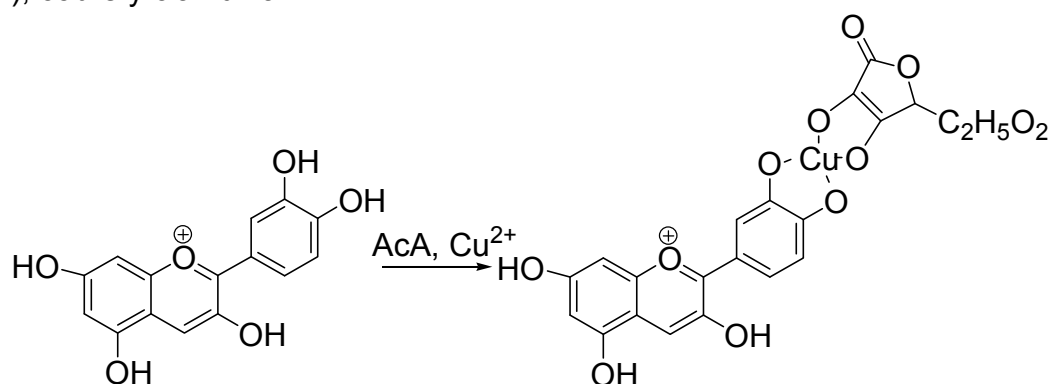


Figura 15. Posible mecanismo de reacción de una quelación de un metal por la cianidina en presencia de ácido ascórbico (AcA).



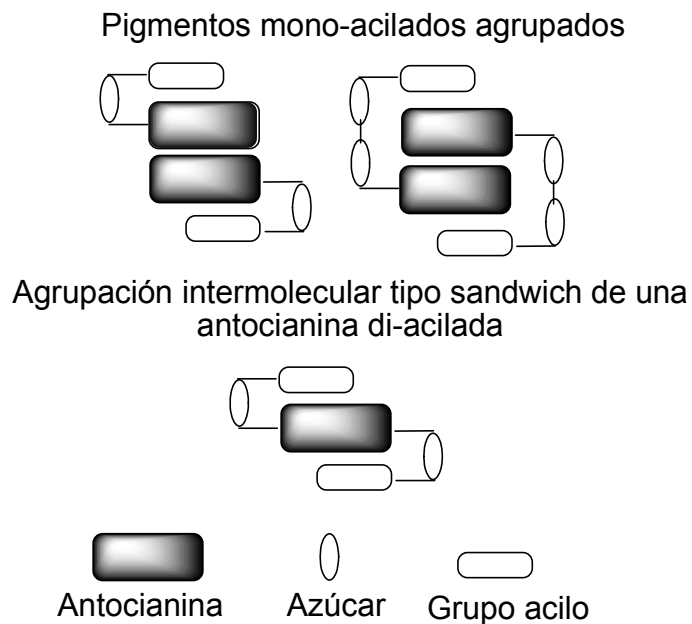
f) Efecto de copigmentación. Para la estabilidad de las antocianinas, el ácido ascórbico actúa como copigmento e interactúa directamente con el metal que la antocianina ha quelado, formando un complejo coordinado antocianina-metal-copigmento estable (ver figura 16). Por consiguiente es probable que tal copigmentación, pueda ser el mecanismo responsable para la protección de antioxidantes de la oxidación. (SARMA, 1997)

Figura 16. Complejo coordinado metal-antocianina formado por ácido ascórbico (AcA), cobre y cianidina.



Otro tipo de copigmentación es la de acilación. La presencia de este tipo de sustituyente puede estabilizar en gran medida a los pigmentos antocianicos. Hay una copigmentación con antocianinas di-aciladas produciendo una estructura tipo sándwich con interacciones hidrofílicas entre los grupos acilos del anillo aromático y la carga positiva del núcleo pirilio, disminuyendo la formación de pseudobases. En el caso de antocianinas mono-aciladas, solo el lado del anillo pirilio puede ser protegido contra ataques nucleofílicos del agua y así solo podría ocurrir un efecto intermolecular débil (ver figura 17). (GIUSTI, 2003)

Figura 17. Copigmentación de antocianinas.



### 2.3.3.3 Purificación y caracterización de antocianinas por CLAE.

a) Preparación de una muestra de antocianinas y su separación por CLAE con una columna de silica C<sub>18</sub>. Este método es usado para muestras de antocianinas de menor complejidad, éstas no deben contener acilaciones. El sistema de CLAE debe ser capaz de generar gradientes binarios de solvente, tener un detector de monitoreo a 520 nm y una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (Phenomenex Prodigy ODS-3 o Supelco LC-18). La muestra es filtrada en un cartucho de 0,45  $\mu$ m y disuelta en agua al 4 % en ácido fórmico. El flujo de corrida es 1 mL/min, las dimensiones de la columna Prodigy ODS-3 son 5  $\mu$ m x 250 mm x 4,6 mm (o equivalentes). La cantidad de muestra inyectada en el sistema de CLAE es de 50  $\mu$ L y se utiliza gradientes de elución similares al descrito en la tabla N° 4. Un ejemplo de un cromatograma con estas especificaciones se encuentra en la figura 18. (ROBERT, 2001)

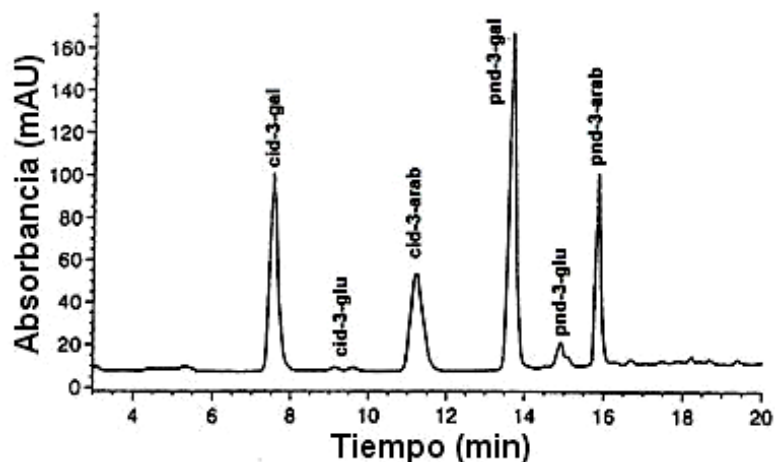
Tabla N° 4. Gradiente para CLAE para la separación de antocianinas en una columna de sílica C<sub>18</sub>.

Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	0	100
5	0	100
20	20	80
25	40	60
30	0	100

<sup>a</sup> Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN)

<sup>b</sup> Agua-ácido acético-acetonitrilo-ácido fosfórico (84:10:5:1)

Figura 18. Cromatograma de CLAE del jugo de arándano.



b) Preparación de una muestra de antocianinas aciladas y su separación por CLAE con una columna polimérica C<sub>18</sub>. Este método es usado para muestras complejas de antocianinas, las cuales son aciladas. Este puede ser utilizado hasta pigmentos nona-acilados, pero esto ocasiona una larga preparación de la muestra y un tiempo de corrida muy prolongado. El sistema de CLAE debe ser capaz de generar gradientes binarios de solvente, tener un detector de monitoreo a 520 nm y una columna de fase reversa C<sub>18</sub> soportada por polímeros (Polymer Labs PLRP-S). La muestra es filtrada en un cartucho de 0,45 µm y disuelta en agua al 4 % en ácido fórmico. El flujo de corrida es 1 mL/min, las dimensiones de la columna son 5 µm x 250 mm x 4,6 mm (o equivalentes). La cantidad de muestra inyectada en el sistema de CLAE es de 50 µL y se utiliza gradientes de elución similares al descrito en la tabla N° 5. Un ejemplo de un cromatograma con éstas especificaciones se encuentra en la figura 19. (ROBERT, 2001)

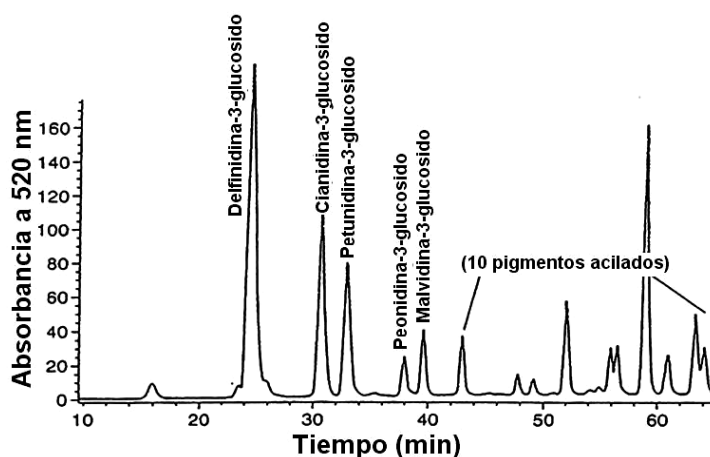
Tabla N° 5. Gradiente para CLAE para la separación de antocianinas en una columna de silica C<sub>18</sub>.

Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	6	94
55	25	75
65	25	75
70	6	94

<sup>a</sup> Acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN).

<sup>b</sup> % ácido fosfórico en agua.

Figura 19. Cromatograma de CLAE de jugo de uva.

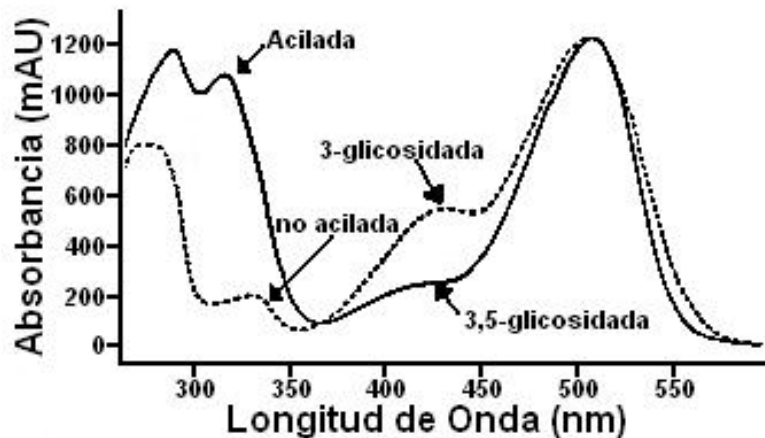


2.3.3.4 Caracterización de los pigmentos tipo antocianina. La caracterización de mezclas de antocianinas usualmente involucra separación y recolección de cada compuesto, seguido de un análisis de UV-Vis, RMN y espectrometría de masas. La falta de normas convenientes hace necesario un procedimiento extenso para la identificación de compuestos conocidos. La combinación de CLAE-EM permite la purificación e identificación de cada compuesto en una mezcla, debido a la gran selectividad y sensibilidad de este método. La aplicación de estas técnicas para análisis de alimentos han sido utilizadas recientemente, mostrando un buen desempeño para la identificación y purificación de antocianinas en diferentes extractos. (Da COSTA, 2000)

a) Caracterización por espectros UV-Vis. La figura 20 es un ejemplo de las posibles bandas que se presentan en los espectros de antocianinas, dependiendo del número de acilaciones y/o de la posición de la glicosidación. La acilación se puede determinar de la relación  $A_{\text{máx-acil}} / A_{\text{máx-vis}}$  (la  $A_{\text{máx-acil}}$  se encuentra entre los 310 y 320 nm). Si esta relación es menor a 0,4 no hay

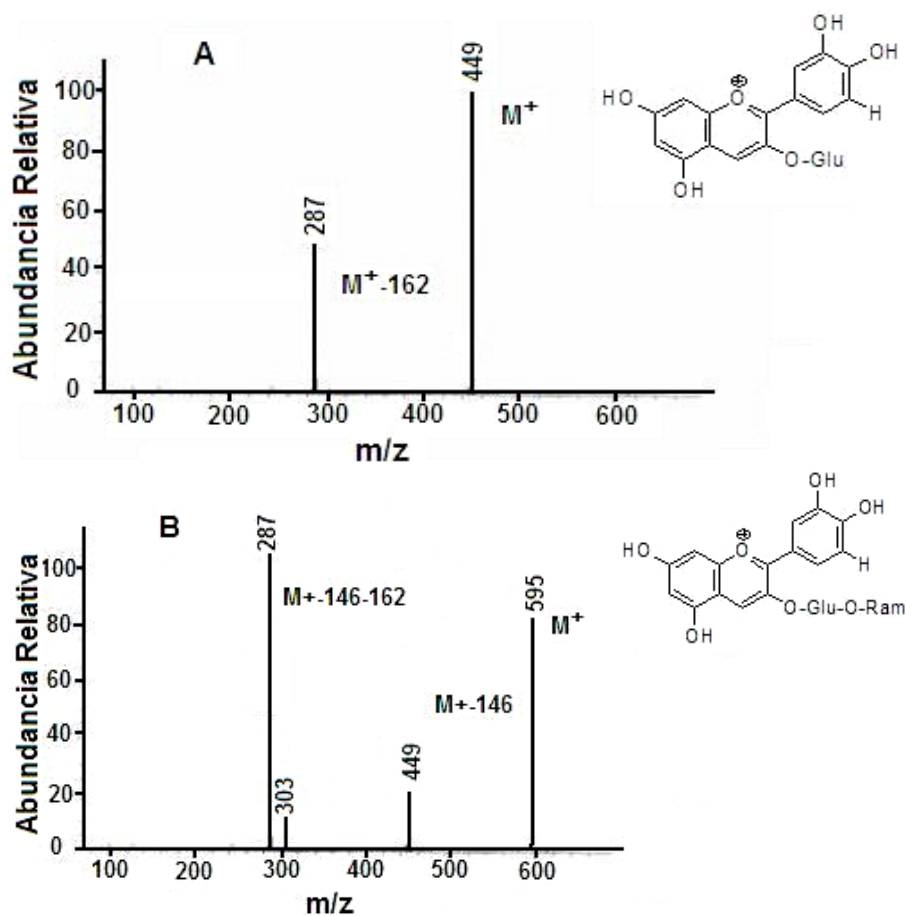
acilación, entre 0,5 y 0,7 hay una acilación simple y cuando la relación está entre 0,8 y 1,1, indica que hay dos acilaciones en el anillo aromático. La posición de la glicosidación se puede determinar por la relación  $A_{440}/A_{\text{máx-vis}}$ . Si esta relación es cercana o mayor a 0,3, la glicosidación está en la posición 3, pero si la relación es menor a 0,2, indica que la antocianina tiene dos glicosidaciones en las posiciones 3 y 5. Este tipo de relaciones también se pueden presentar en términos de porcentaje (%). (ROBERT, 2001)

Figura 20. Espectro UV-Vis de la -3-glicosidación (no acilación: línea punteada) y -3,5-glicosidación (acilación: línea continua) de pigmentos tipo antocianina.



b) Caracterización por espectrometría de masas (EM). Los extractos ricos en antocianinas generalmente son separados en un CLAE-MS, donde también se puede sacar el espectro UV-Vis de cada pigmento. Los espectros de masas son de gran ayuda para la identificación de antocianinas, debido a que estas muestran el  $m/z$  de la antocianina y el  $m/z$  de la aglicona cuando solo está sustituida por un glicósido. Cuando la antocianina tiene más de dos glicósidos en su esqueleto, muestra señales de la antocianina, la aglicona y la antocianina con sus diferentes sustituyentes glicosídicos (ver figura 21 (a y b)). (Da COSTA, 2000)

Figura 21. Espectro de masas de la cianidina-3-glucósido (A) y cianidina-3-rutinosido (B) obtenidos en separación por cromatografía líquida (CL).



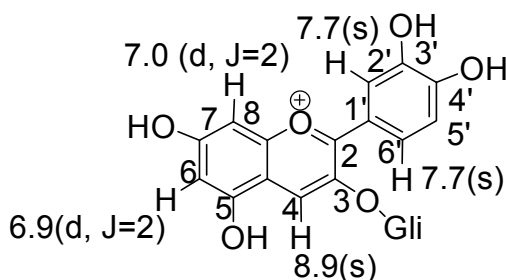
c) Caracterización por espectros de resonancia magnética nuclear protónico (RMN <sup>1</sup>H). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los flavonoides permite reconocer características estructurales importantes. Un resumen, para los tipos de protones más comúnmente hallados se presenta en la tabla N° 6 y las constantes de acoplamiento se presentan en la figura 22, donde R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son carbohidratos. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>)

Tabla N° 6. Señales características en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de los flavonoides.

(ppm)	Tipos de protones
0,0	Tetrametilsilano
0,0-0,5	Trimetilsililo
1,0-1,2	Metilo de la ramnosa (doblete ancho)
1,7	Metilos del grupo isopentenilo
1,9-2,0	Metilos de acetatos alifáticos (de azúcares)
2,2-2,4	Metilos de acetatos aromáticos
2,7-3,0	H-3 de flavanonas (multiplete)
3,0-4,8	Protones de azúcares
3,5	Metileno del grupo isopentenilo
3,7-4,1	Metoxilos aromáticos
4,2-6,0	Protón 1 de azúcares, protón 2 de flavanoles y flavanonas (doble doblete)
5,9-6,0	Metiléndioxi
6,0-6,8	Protones 3, 6 y 8 de flavonas
6,8-8,0	Protones aromáticos del anillo B
7,5-8,0	Protón 2 de isoflavonas
12,0-14,0	Protón del hidroxilo 5

Las antocianinas se pueden reconocer en sus espectros RMN <sup>1</sup>H por la señal en 8,9 (s, H-4) y las señales características de otros protones aromáticos como en los glicósidos de la delfinidina. (U. de ANTIOQUIA, disponible en <http://huitoto.udea.edu.co>)

Figura 22. Constantes de acoplamiento en una antocianina.



Con la técnica de RMN se han elucidado más de 620 antocianinas diferentes. Este método es muy valioso en la determinación de la naturaleza del azúcar, sitios acilados y sustituciones.

Cuando la antocianina esta pura, se sigue un protocolo que describe la secuencia de experimentos de RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , CAPT, DQF-COSY, TOCSY, HSQC, HMBC NOESY y ROESY) que normalmente son suficientes para asignar la resonancia de los hidrógenos y carbonos de una antocianina. Con esta secuencia también se determina las posiciones de uniones entre antocianinas que están en forma de bloque. (ØYVIND, 2001)

#### 2.3.4 Descripción de la planta del mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).

El mortiño es un arbusto de hojas simples, alternas, elípticas u ovales, coriáceas, de ápice agudo ligeramente apiculado, base cuneada, margen crenado, con dientes glandulares, envés liso, nervio primario hundido por el haz. Su corteza se desprende con facilidad, los tallos jóvenes son de color verdoso y de aspecto liso (ver figuras 23 y 24) (PÉREZ, 1990).

Figura 23. Mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).



Figura 24. Mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.) (ampliada).





El fruto es una baya esférica de más o menos 1 cm de diámetro, color verde en estado inmaduro y rojo-violáceo oscuro, casi negro, en su madurez (ver figura 25). Con dos épocas de fructificación al año, una entre abril y mayo llamada mitaca y la cosecha más abundante entre septiembre y diciembre. Las semillas tienen un contenido de humedad del 0,112% y un peso promedio de 0,435 g/1000 semillas, es decir que 1 kg contiene 2'298000 semillas (SALAZAR, 1997).

Figura 25. Fruto de mortiño.



En el año 2001, ARJONA realizó estudios de las especies de mortiño de los alrededores de Medellín (ver tabla 7), donde concluyó que las flores son tetrámeras (ocasionalmente pentámeras), cáliz con lóbulos apiculados, ciliados en el margen hacia el ápice, corola urceolada-cilíndrica, blanca o manchada de rosado o rojo, estigma truncado. La inflorescencia es en racimo, produciendo de 10 a 15 flores por racimo.

Tabla N° 7. Nombres científicos y comunes de las especies que reciben el nombre de mortiño.

Nombre científico	Familia	Nombres comunes
<i>Vaccinium meridionale</i>	<i>Ericacea</i>	Mortiño, agrás, uvito de monte, arándano azul.
<i>V. corymbodendron</i>	<i>Ericacea</i>	Mortiño, agrás
<i>V. floribundum</i>	<i>Ericacea</i>	Mortiño
<i>Pernettya prostrata</i>	<i>Ericacea</i>	Reventadera o mortiño venenoso
<i>Pellegrinia spp</i>	<i>Ericacea</i>	Reventadero o mortiño venenoso
<i>Gautheria anastomasans</i>	<i>Ericacea</i>	Maíz de Perro o Mortiño Borrachero
<i>Miconia aeruginosa</i>	<i>Melastomatácea</i>	Mortiño
<i>Miconia glandulosa</i>	<i>Melastomatácea</i>	Mortiño, azucarero, nigüito, tintillo, tuno, esmeraldo
<i>Miconia rubiginosa</i>	<i>Melastomatácea</i>	Mortiño
<i>Hesperomeles goudotiana</i>	<i>Rosacea</i>	Mortiño o noro
<i>Rapanea guianensis</i>	<i>Mirsinacea</i>	Mortiño o chagualito

En Antioquia, reconocen el mortiño como un alimento para la fauna silvestre, tales como tórtolas, miras, pavas, guacharacas y también de las ardillas, así como de palomas, carriquies, tucanes y otros constituyéndose en los mecanismos de dispersión de la especie, especialmente la mirla. Por el hecho de ser importante fuente de alimento para la fauna silvestre, es frecuente que en las zonas donde está presente el mortiño los cazadores localicen trampas para aves. (De la RUA, 2000)

El mortiño presenta la ventaja que se puede refrigerar sin alteración de sus características organolépticas y nutricionales, ni variaciones en peso o volumen, para la elaboración posterior de cualquiera de los productos con valor agregado mencionados en el apartado 3.1, lo cual facilita el mantenimiento de un mercado permanente, aún fuera de las épocas de cosecha. (ARJONA, 2001)

En el año 2000, VALLEJO realizó estudios bromatológicos al fruto del mortiño (*Vaccinium meridionale*), encontrando los siguientes resultados:

Tabla N° 8. Análisis bromatológicos del fruto del Mortiño (*Vaccinium meridionale*).

Parámetro	Datos obtenidos (% en base seca)
Humedad	84,20 – 85,60
Materia Seca	14,40-15,80
Cenizas	2,30 –2,40
Extracto etéreo	2,90-3,10
Proteína Bruta	4,90-5,40
Fibra Cruda	16,20-17,40

El fruto de Mortiño presenta tres principales estados de maduración; que por análisis sensorial se pueden describir de la siguiente forma:

- Inmaduro: fruto con estructura dura con cáscara color verde y pulpa verde tenue.
- Maduro: fruto con estructura semiblanda con cáscara color rojo-violáceo y pulpa verde.
- Sobremaduro: fruto con estructura semiblanda con cáscara color rojo-violáceo casi negro y pulpa rojiza.

Existen distintas medidas físicas y químicas para determinar la madurez de un fruto. Entre las medidas físicas están: el color de la cáscara y pulpa, color de la semilla, tamaño, peso y densidad; de éstas se debe tener en cuenta que la medida del tamaño del fruto no es de gran utilidad; ya que frutos grandes pueden estar inmaduros y frutos pequeños pueden estar maduros.

La medida química más común es la determinación del índice de madurez (IM) que se calcula a partir de la cantidad de azúcares sobre el % acidez. La cantidad de azúcares representan los sólidos totales presentes en el fruto en grados Brix (° Brix) y la acidez, indica el contenido en % de ácido ascórbico, ácido maléico o de otro ácido orgánico dependiendo de la característica del fruto, mediante una titulación ácido-base, con hidróxido de sodio. En muestras coloreadas, se titula la solución hasta que llega a un pH de 8,2, pH en el cual la fenolftaleína vira de color y en estos casos no se puede usar, por lo cual el cambio de pH se determina con un potenciómetro.

VALLEJO en el año 2000, también encontró que los frutos del mortiño tienen contenidos importantes de azúcares, antioxidantes, vitaminas del complejo B, C y minerales como potasio, calcio y fósforo, pero no realizó un estudio de los pigmentos presentes en estas bayas.

### 3. METODOLOGÍA.

#### 3.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.

El material vegetal se adquirió en el mercado local de Villa Moreno; éste es un corregimiento del municipio de Buesaco de clima frío seco, que está ubicado entre los 2300 y 2500 m.s.n.m., tiene una temperatura entre 12 y 15 °C y tiene una precipitación promedio de 800 mm. La cabecera municipal se encuentra a 1° 23' de latitud Norte y 77° 8' de longitud Oeste o del meridiano de Greenwich a 38 km de Pasto. (PLAN DE DESARROLLO, 2004)

El fruto fue almacenado en un congelador y el arbusto se secó para su clasificación en el herbario de la Universidad de Nariño.

#### 3.2 EXTRACCIÓN DEL PIGMENTO.

##### 3.2.1 Preparación de la muestra.

De la cantidad inicial obtenida (6,5 kg) se seleccionó, por análisis de los parámetros del fruto sobremaduro, tal como: color, aroma, sabor, forma, tamaño, consistencia y contextura; hasta completar 1,00 kg de fruto fresco (ver figura 26). Se separó manualmente la cáscara y la pulpa del fruto seleccionado.

Figura 26. Fruto de Mortiño seleccionado para el análisis.



##### 3.2.1.1 Determinación de la madurez.

a) Determinación de pH del fruto. Se maceraron 26 g del fruto en un mortero y se hizo la medición con un pH-metro.

b) Determinación de grados Brix ( $^{\circ}$  Brix). De los 26 g de fruto macerados, se agregaron unas gotas en el prisma del refractómetro y se tomó la lectura en  $^{\circ}$  Brix.

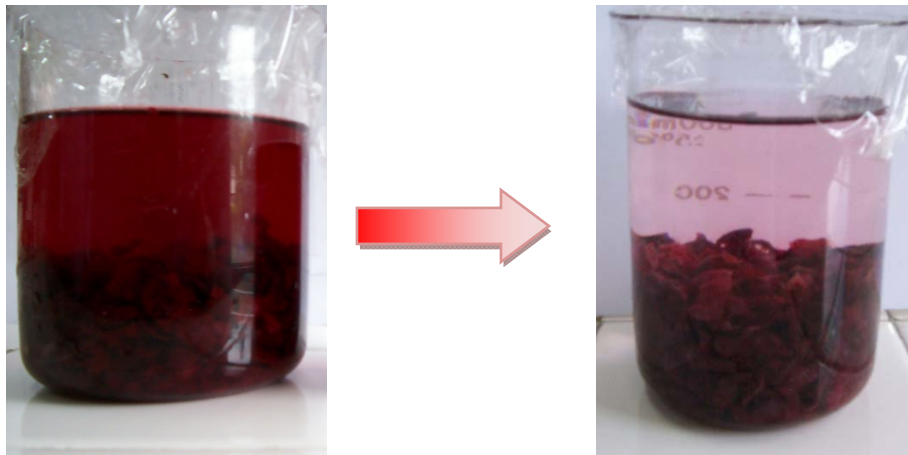
c) Determinación de acidez. A los 26 g de fruto macerados se adicionó 25 mL de agua destilada y se tituló potenciométricamente con hidróxido de sodio al 0,1 N hasta que el pH de la solución llegó a 8,2.

### 3.2.2 Extracción de los pigmentos.

La extracción de los pigmentos de la cáscara y pulpa del mortiño se realizó de forma separada.

3.2.2.1 Extracción de pigmentos de la cáscara. Se sometieron 487,5 g de cáscara a maceración química con metanol-ácido acético (19:1) por 24 h. El extracto se filtró al vacío, se concentró el filtrado a sequedad (ver apartado 3.2.2.3) y se maceró nuevamente el residuo por 24 horas. Se repitió este proceso hasta que el solvente de la maceración química presentó una coloración rojiza tenue (ver figura 27). (POMAR, 2005)

Figura 27. Extracción del pigmento en la cáscara de Mortiño.



3.2.2.2 Extracción de pigmentos de la pulpa. Se sometieron 512,5 g de pulpa a centrifugación a 7000 rpm por 5 min. El decantado se sometió a maceración química con metanol-ácido acético (19:1) por 24 h. El extracto se filtró al vacío, se concentró el filtrado a sequedad (ver apartado 3.2.2.3) y se mezcló con el sobrenadante de la centrifugación. Se maceró nuevamente el residuo por 24 horas. Se repitió este proceso hasta que el solvente de la maceración química presentó una coloración rojiza tenue (ver figura 28).

Figura 28. Extracción del pigmento en la pulpa de Mortiño.



3.2.2.3 Concentración de los extractos. Los extractos se concentraron con un rota-evaporador (ver figura 29) Laborata 4000-eddicient Nets, line 100/115 v 50/60 Hz acoplado a una bomba de vacío GE motors & industrial systems MOD 5KH36KNA510X r.p.m. 1725/1425 HP ¼; a una temperatura menor de 50° C y a una presión de 500 mm Hg.

Figura 29. Equipo de Rota-evaporación.



### 3.3 PURIFICACIÓN DEL PIGMENTO.

#### 3.3.1 Separación de compuestos lipofílicos.

Los extractos secos de cáscara y pulpa se sometieron a base acuosa para la separación de compuestos lipofílicos.

3.3.1.1 Lavados con n-hexano. Se realizaron lavados con 10 mL de n-hexano a los extractos crudos de cáscara y pulpa por separado, formándose dos fases, las cuales se separaron con un embudo de separación, recolectando la fase acuosa. Se repitieron estos lavados hasta que no se observó la formación de dos fases.

3.3.2 Separación de compuestos medianamente polares.

Después de los lavados con n-hexano se adicionó acetato de etilo al extracto acuoso de cáscara y pulpa con el fin de eliminar los compuestos medianamente polares; sin embargo no se observó la formación de dos fases, por lo que se suspendieron los lavados con este solvente.

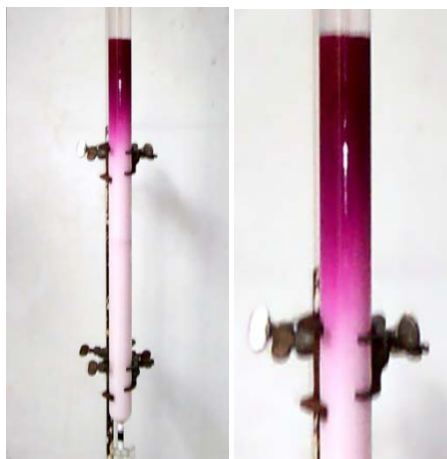
3.3.3 Separación por cromatografía de columna (CC).

Los extractos de cáscara y pulpa fueron sometidos a la misma separación por CC.

3.3.3.1 Separación de compuestos incoloros de baja polaridad. Se utilizó una columna de 73,50 cm de largo y 3,00 cm de diámetro interno usando amberlita XAD-7 (resina polar, no iónica) como fase estacionaria y como fases móviles agua destilada (solvente A) para eluir compuestos incoloros y metanol-ácido acético (19:1) (solvente B) para eluir la fase coloreada.

La resina fue empacada y activada en la columna con el solvente A. Se vertieron 50 mL de extracto acuoso a la columna (ver figura 30) y se hizo eluir aproximadamente 5 L del solvente A, de esta forma se aseguró haber eluído completamente los compuestos incoloros de baja polaridad. La fase coloreada se eluyó de la columna con el solvente B. Se repitió esta CC hasta procesar todo el extracto de cáscara y pulpa.

Figura 30. Separación de compuestos incoloros de baja polaridad por CC con amberlita XAD-7.



Procesado los extracto de pulpa y cáscara, se homogenizaron por separado y se rota-evaporaron a sequedad (ver apartado 3.2.2.3) para ser liofilizados.

3.3.3.2 Separación de pigmentos con diferente polaridad. Se utilizó una columna de 47,00 cm de largo y 3,00 cm de diámetro interno, usando como fase estacionaria Sefhadex LH-20 (25-100  $\mu\text{m}$ ) y como fases móviles agua-metanol (1:1 al 0,1% de ácido fórmico) (solvente A) para eluir antocianinas monoméricas y proantocianidinas y acetona-agua (2:1 al 0,1% de ácido fórmico) (solvente B) para eluir las antocianinas poliméricas.

La resina fue empacada y activada en la columna con el solvente A. Se cargó 0,2 g del extracto liofilizado disuelto en la menor cantidad del solvente A. Se eluyó el solvente A hasta que se observó una completa separación entre compuestos coloreados de diferente peso molecular. Los compuestos coloreados retenidos en la columna se eluyeron con el solvente B. Se repitió esta CC hasta procesar todo el liofilizado de cáscara y pulpa.

Procesados los liofilizados de pulpa y cáscara, se homogenizaron por separado y se rota-evaporaron a sequedad (ver apartado 3.2.2.3) para ser liofilizados nuevamente.

3.3.4 Análisis y purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

3.3.4.1 Análisis de antocianinas mayoritarias por CLAE tipo analítico. Estos análisis se desarrollaron en un equipo Merck equipado con un detector de arreglo de diodos DAD Hitachi L-4500 a través de una columna phenomenex Synergi MAX-RP80R (250 x 6,00 mm) la cual es una columna de fase reversa  $C_{12}$  (ver figura 31). Se utilizó como solvente A: agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3) y como solvente B: agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10), los cuales fueron desgasificados por ultrasonido. Para el acondicionamiento del sistema se dejó correr un flujo de 0,4 mL/min durante diez minutos al 100% de cada solvente.

La corrida cromatografica se realizó de modo gradiente como lo muestra la tabla N° 9, con un flujo de análisis de 0,8 mL/min y un volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$  de una solución 0,1 mg/mL de cada muestra en el solvente A, filtrada con un cartucho de 0,45  $\mu\text{m}$  acoplada a la jeringa.



Tabla N° 9. Gradiente de solventes para CLAE tipo analítico.

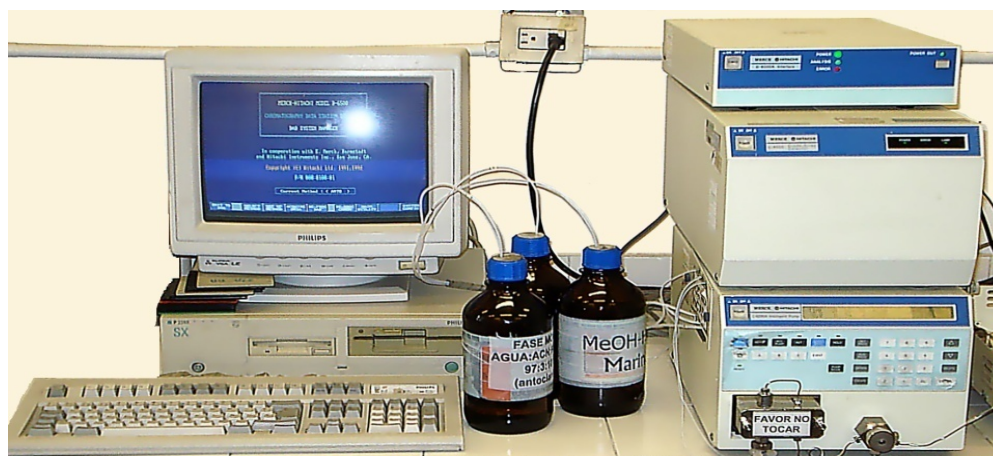
Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	94	6
10	80	20
20	60	40
25	50	50
30	94	6

<sup>a</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3)

<sup>b</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10)

Se realizó el análisis de CLAE tipo analítico a las muestras purificadas por CC por amberlita XAD-7 y a las fracciones aisladas por CC por sephadex LH-20.

Figura 31. Equipo de CLAE Merck equipado con DAD Hitachi L-4500 y una columna phenomenex Synergi MAX-RP80R (250 x 6,00 mm).



3.3.4.2 Purificación de antocianinas por CLAE tipo preparativa. Al equipo de CLAE (ver apartado 3.3.4.1) se le acopló una columna cromatográfica de Phenomenex Gemini G-4435-NO (250 x 10,00mm) la cual es una columna de fase reversa C<sub>18</sub>. Antes de procesar cada muestra del fruto se purgó la columna con acetonitrilo al 100 % y después con una mezcla de los solventes A y B (ver apartado 3.3.4.1) en una proporción de 80:20, con un flujo de 2 mL/min por quince minutos. Las muestras fueron disueltas en el solvente A y se filtraron con un cartucho de 0,45 µm acoplada a la jeringa antes de la inyección.

➤ Adecuación de la CLAE. Para determinar la cantidad de inyección, de flujo y la relación de solventes, adecuados, se realizaron 7 ensayos como se describen en la tabla N° 10.

Tabla N° 10. Ensayo de solventes, cantidad de inyección y flujo para la CLAE tipo preparativo.

Ensayo	Solvente (%)		Cantidad inyectada (µL)	Flujo (mL/min)
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>		
1	80	20	5	4
2	80	20	15	4
3	80	20	30	4
4	80	20	20	3,5
5	80	20	25	3,5
6	70	30	5	3,5
7	70	30	20	3,5

<sup>a</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3)

<sup>b</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10)

Debido a que utilizando los solventes en modo isocrático no se pudo reducir la cantidad de tiempo de corrida y la cantidad de solventes a utilizar, se realizaron dos ensayos utilizando los solventes A y B de modo gradiente como lo muestran las tablas N° 11 y 12.

Tabla N° 11. Ensayo N° 1 para la determinación del gradiente adecuado de elución para la CLAE tipo preparativo.

Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0-10	80	20
10-20	60	40
20-30	50	50
30-35	80	20

<sup>a</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3)

<sup>b</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10)

Tabla N° 12. Ensayo N° 2 para la determinación del gradiente adecuado de elución para la CLAE tipo preparativo.

Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	65	35
7	60	40
10	50	50
13	50	50
18	65	35

<sup>a</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3)

<sup>b</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10)

### 3.4 CARACTERIZACIÓN DEL PIGMENTO.

#### 3.4.1 Elucidación estructural.

3.4.1.1 Determinación del perfil de absorbancia en el espectro UV-Vis. Para la lectura de la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 11 (ver figura 32) y se realizó el barrido UV-Vis desde 280-720 nm para los extractos de cáscara y pulpa crudos y purificados por CC con XAD-7 y antocianinas purificadas por CLAE. Los extractos se disolvieron en HCl 0,1 % solución metanólica.

Figura 32. Espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda 11.



3.4.1.2 Análisis por CLAE-EM de las antocianinas mayoritarias. Estos análisis se desarrollaron en un equipo de CLAE-EM Shimadzu QP5000α con una columna Luna 5 μ C<sub>18</sub>, 100 Å phenomenex, con un voltaje de detección de 1,5 kV, un rango

de masa de 100-800, un voltaje de CDL de 150 V, una temperatura de CDL y block de 300 °C y un flujo de gas nebulizador de 0,5 L/min.

La corrida cromatografica se realizó de modo gradiente como lo muestra la tabla N° 13, un volumen de inyección de 1 µL de cada muestra y un tiempo total de corrida de 35 minutos.

Tabla N° 13. Gradiente de solventes para CLAE-EM.

Tiempo (min)	Solvente (%)	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
0	94	6
10	80	20
20	60	40
30	50	50
35	94	6

<sup>a</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (87:10:3)

<sup>b</sup> Agua, acetonitrilo y ácido fórmico (50:40:10)

3.4.1.3 Determinación del espectro de RMN H<sup>1</sup> de la antocianina mayoritaria. Se determinó el espectro de RMN H<sup>1</sup> a la antocianina mayoritaria purificada por CLAE en la Universidad Nacional sede Bogotá en un equipo un Bruker Avance 400. La muestra fue disuelta en metanol: ácido trifluoroacético (19:1) deuterado.

3.4.2 Semicuantificación de antocianinas monoméricas totales y antocianinas poliméricas totales.

3.4.2.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial.

a) Preparación de reactivos.

➤ Buffer de cloruro de potasio 0,025 M a pH 1. Se disolvió 1,86 g de cloruro de potasio en 980 mL de agua destilada, se ajustó a pH 1 con HCl concentrado y se llevó a 1 L.

➤ Buffer de acetato de sodio 0,4 M a pH 4,5. Se disolvió 54,43 g de CH<sub>3</sub>COONa•3H<sub>2</sub>O en 960 mL de agua destilada, se ajustó a pH 4,5 con HCl concentrado y se llevó a 1 L.

b) Determinación del factor de dilución. Para las muestras disueltas en buffer pH 1 de cloruro de potasio, se determinó el factor de dilución (FD) a la  $\lambda_{\text{máx-vis}}$  para que esté dentro del rango lineal del espectrofotómetro (0,000-1,000). Calculado el FD, se aplicó para las muestras disueltas con el buffer de acetato de sodio pH 4,5. Se utilizó agua destilada como blanco.

c) Preparación y medición de la absorbancia. Se prepararon dos disoluciones de la muestra a evaluar; la primera con buffer cloruro de potasio pH 1 y la segunda con acetato de sodio pH 4,5. Cada una se diluyó con el factor de dilución anteriormente calculado y se dejó en reposo por 15 min. Se midió la absorbancia de cada dilución en la  $\lambda_{\text{máx-vis}}$  y a 700 nm.

La determinación antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial se utilizó como prueba de control para los extractos: crudos y purificados por CC con XAD-7.

3.4.2.2 Determinación de antocianinas poliméricas totales por el método de pH sustractivo.

a) Preparación de la solución de bisulfito. Se disolvieron 2 g de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$  en 5 mL de agua destilada.

b) Preparación de las muestras. Las soluciones se prepararon en agua destilada teniendo en cuenta el factor de dilución determinado en el apartado 3.4.2.1, de esta solución se midió dos alícuotas de 2,8 mL, a una se adicionó 0,2 mL de agua destilada y a la otra 0,2 mL de una solución de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$  y se dejó en reposo por 15 min. Se midió la absorbancia de cada dilución en la  $\lambda_{\text{máx-vis}}$ , a 420 y 700 nm. Se utilizó agua destilada como blanco.

3.4.3 Determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Se adicionó en el siguiente orden 0,1 mL de agua destilada como blanco y 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu; después de 30 s y antes de 8 min se adicionó 1,5 mL de una solución de carbonato de sodio al 20%, se llevó a 10 mL y se dejó en reposo durante 2 horas en baño maría a 24° C. La lectura se realizó a la  $\lambda$  de 765 nm. Se procedió de la misma forma para los patrones de ácido gálico de 0, 50, 100, 150, 250 y 500 ppm y para las muestras a evaluar.

La determinación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, se realizaron a los extractos de cáscara y pulpa: crudos y purificados por CC con XAD-7 y a antocianinas purificadas por CLAE preparativa.

3.4.4 Medición de la capacidad antioxidante.

3.4.4.1 Medición de la actividad antioxidante por el método de ABTS<sup>•+</sup>.

a) Preparación de la solución stock del catión radical ABTS. Se disolvieron 0,099 g de ABTS y 0,039 g de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$  en 50 mL de agua des-ionizada y se dejó en reposo por 24 horas a oscuridad. De la solución anterior se preparó una solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup> en metanol HPLC (solución W) (cada vez que se realizaron ensayos) con una absorbancia entre 0,950 y 1,000 a la  $\lambda$  de 734 nm.

b) Preparación de la curva de calibración con Trolox. Se preparó una solución 10 mM de Trolox, disolviendo 25 mg de Trolox en 10 mL en metanol HPLC; a partir de esta solución se prepararon soluciones diluidas de 0,5, 1,0, 1,5 y 2,0 mM.

Se adicionó 30  $\mu$ L de metanol (HPLC) como blanco a 3 mL de solución W. Esta solución se homogenizó con un agitador Fisher Scientific, fixed speed mini vortex durante 1 min, dejándola en reposo por 6 min. Al cabo de este tiempo se midió la absorbancia a la  $\lambda$  de 734 nm. Se repitió el procedimiento para los patrones de Trolox y para las muestras evaluadas.

c) Preparación de las disoluciones de los compuestos o fracciones a evaluar. Las muestras evaluadas se prepararon a una concentración entre 0,1 y 0,25 % en metanol HPLC.

La determinación de la actividad antioxidante por el método de ABTS<sup>+</sup> se realizó a: los extractos de cáscara y pulpa: crudos y purificados por CC con XAD-7 y a antocianinas purificadas por CLAE preparativa.

3.4.4.2 Medición de la actividad antioxidante por el método de DPPH<sup>•</sup>. Se disolvieron 11 mg del radical DPPH<sup>•</sup> en 100 mL de metanol y se dejó reposar por 2 h a oscuridad. De la solución madre del radical, se realizaron soluciones a  $2,5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $7,5 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $2,5 \times 10^{-2}$  mM para realizar la curva de calibración a una  $\lambda$  de 515 nm. Se realizaron soluciones de ácido ascórbico a 50, 100 y 150 ppm como referencia y se mezcló 0,075 mL del patrón con 2,925 mL de una solución de DPPH<sup>•</sup>. A esta reacción se le midió la absorbancia a 515 nm cada 5 s hasta los 5 min, cada 10 s hasta los 15 min, cada min hasta los 30 min y cada 15 min hasta que la absorbancia fue estable.

La determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH<sup>•</sup> se realizó a: los extractos de cáscara y pulpa: crudos y purificados por CC con XAD-7 y a antocianinas purificadas por CLAE preparativa.

Diagrama 1. Metodología para el análisis de los pigmentos presentes en la cáscara de Mortiño.

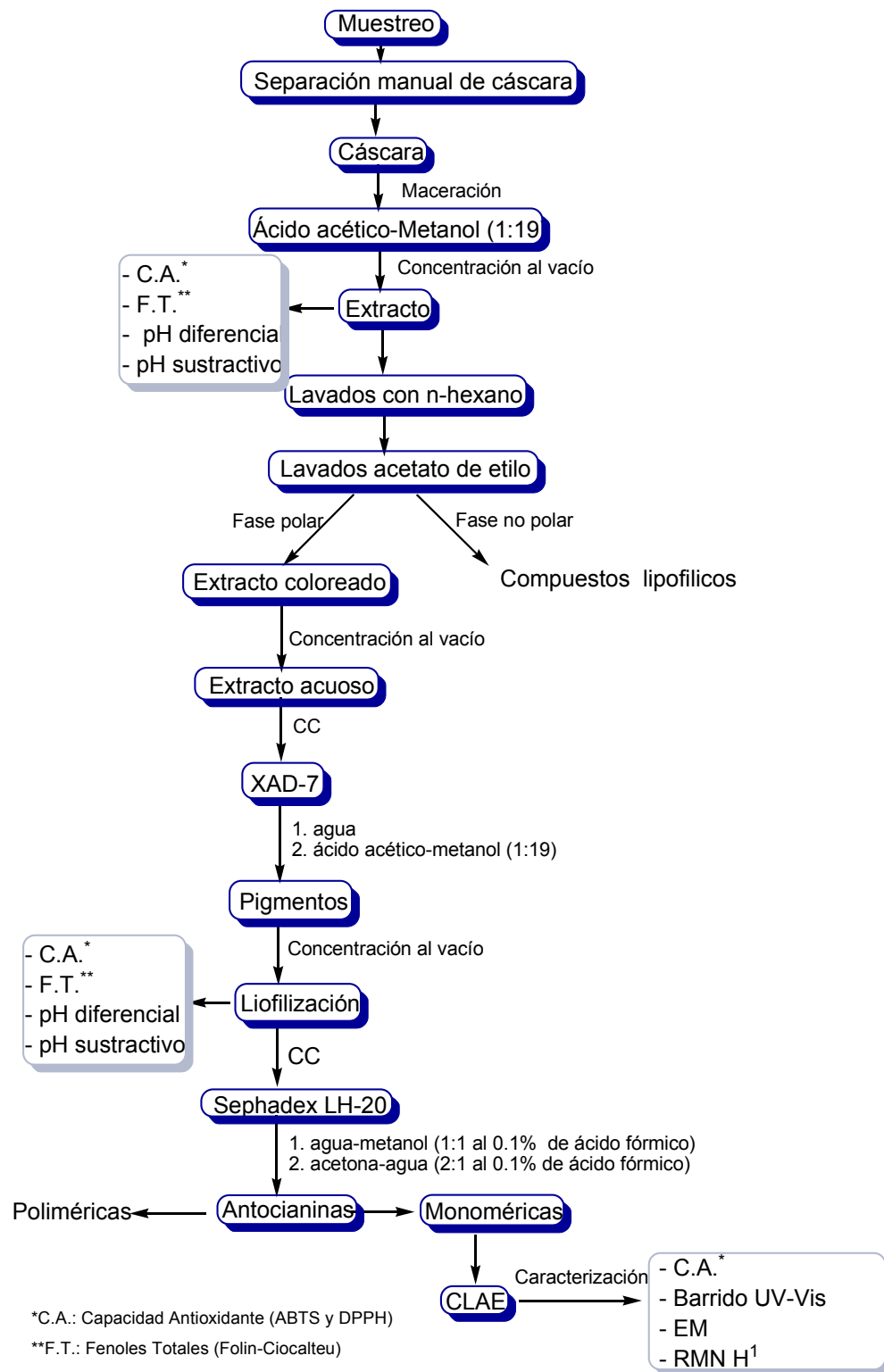
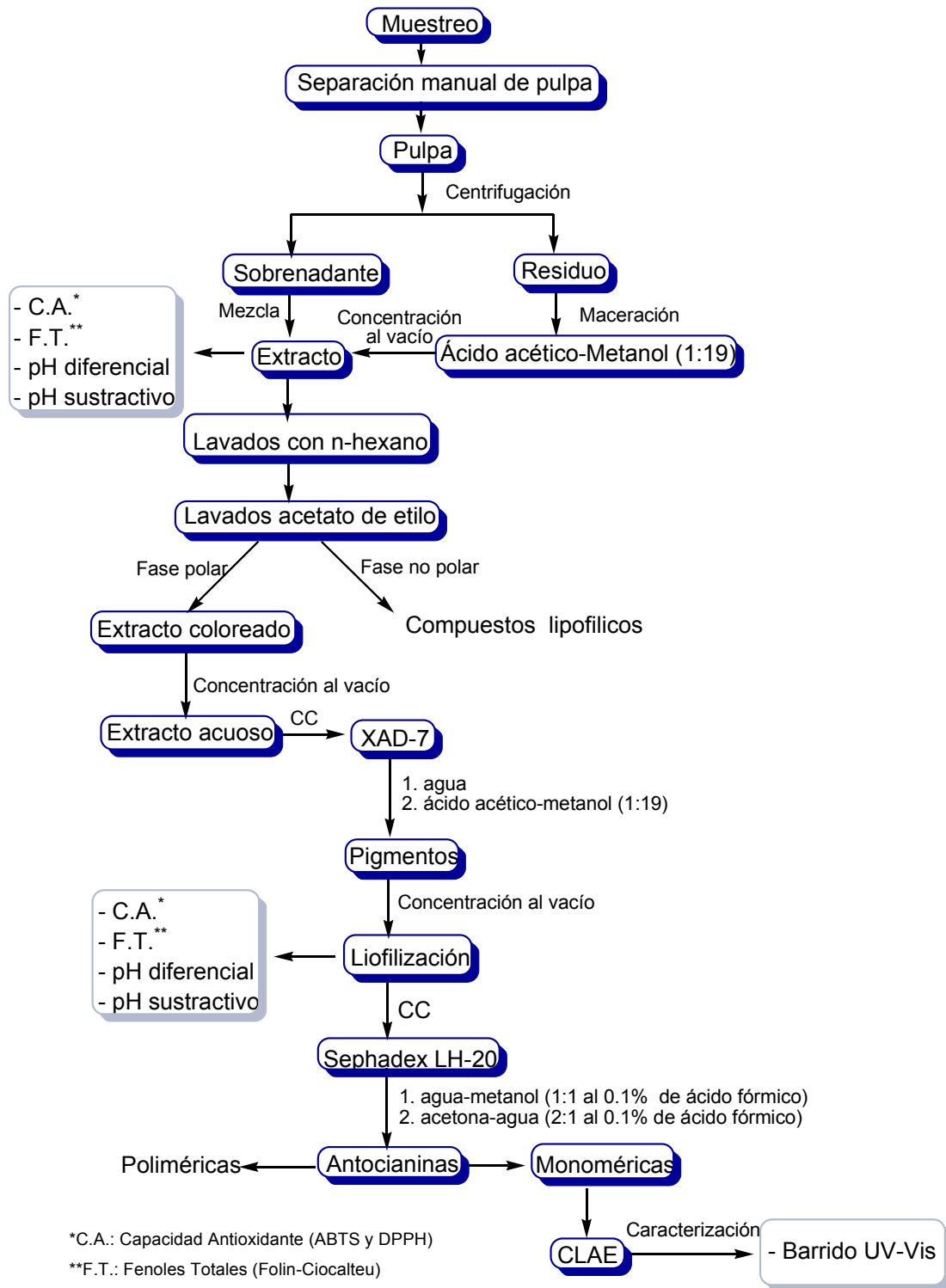


Diagrama 2. Metodología para el análisis de los pigmentos presentes en la pulpa de Mortiño.





#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

##### 4.1 CARACTERÍSTICAS INICIALES DEL FRUTO DE MORTIÑO (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).

De acuerdo a la clasificación realizada por el herbario de la Universidad de Nariño, la familia al cual pertenece el arbusto del mortiño recolectado en el corregimiento de Villamoreno, es *ericaceae* y el nombre científico es *Vaccinium floribundum* H.B.K. (código 8852 del herbario Universidad de Nariño).

###### 4.1.1 Determinación del grado de madurez del fruto.

Las características iniciales del fruto se resumen en la siguiente tabla:

Tabla N° 14. Características iniciales del fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.).

Características	Descripción
Color	Fruto sobremaduro; la cáscara presentaba una coloración violeta y la pulpa una rojiza.
Textura	corteza firme, con pulpa semiblanda y fresca
Forma	Baya redonda y no achatada
Tamaño	1,10-1,20 cm de diámetro <sup>a</sup>
pH	2,44
Sólidos totales presentes en el fruto (azúcares)	12 ° Brix
Acidez <sup>b</sup>	7,24 %
Índice de madurez (IM) <sup>c</sup>	1,66

<sup>a</sup> Intervalo obtenido a partir de 100 datos, <sup>b</sup> % ácido ascórbico y <sup>c</sup> ° Brix/acidez

###### 4.1.2 Determinación de máximos de absorbancia de los extractos crudos de cáscara (CrC) y pulpa (CrP).

Con los espectros Uv-Vis de los extractos CrC y CrP se confirmó la presencia de pigmentos tipo antocianina, por presentar un máximo de absorbancia en la longitud de onda 534,8 nm y una banda en el intervalo de 280 a 320 nm (ver figura 33 y 34). Este resultado se corroboró con el cambio de coloración en pH's de 1, 7 y 12 de un extracto crudo de mortiño (ver figura 35).

Figura 33. Espectro UV-Vis del extracto CrC.

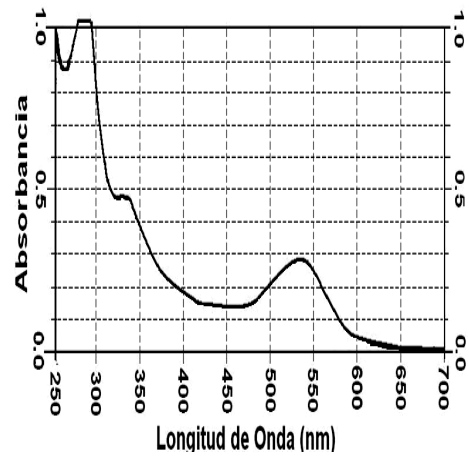


Figura 34. Espectro UV-Vis del extracto CrP.

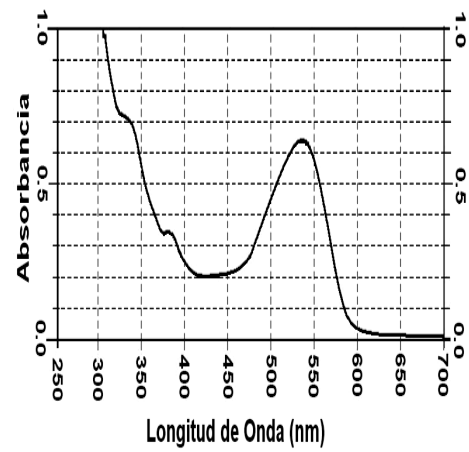


Figura 35. Variación del color respecto al pH del extracto crudo del mortiño.



#### 4.2 CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS EN LA PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS.

Las cantidades y pesos que se obtuvieron después de cada etapa de refinación de los extractos de cáscara y pulpa se describen en la tabla N° 15.

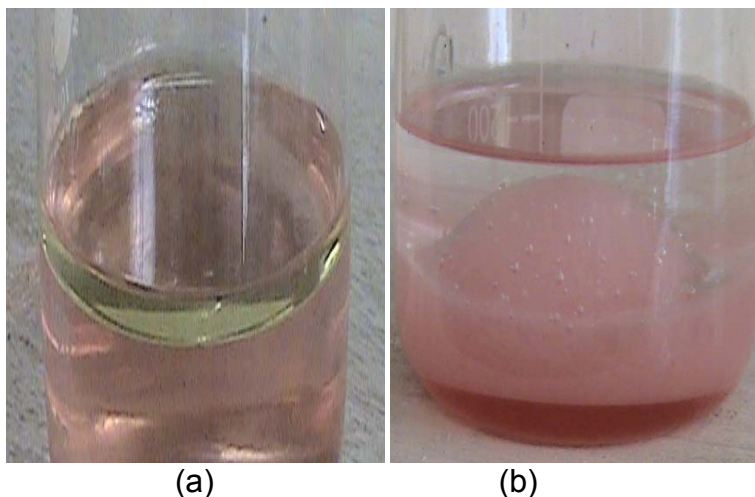
Tabla N° 15. Pesos y cantidades aproximadas obtenidas de los extractos de cáscara y pulpa después de cada proceso de purificación.

Extracto	Peso Inicial (g)	Después de los lavados con n-hexano (mL)	Extracto Acuoso (mL) <sup>a</sup>	Extracto Liofilizados (g) <sup>a</sup>
Cáscara	487,5	825	900	65,
Pulpa	512,5	750	600	43,68

<sup>a</sup> purificados por CC con amberlita XAD-7

Se realizaron 5 lavados con n-hexano para la cáscara y 22 lavados para la pulpa; debido a que en este ultimo extracto se evidencio la formación de una mayor cantidad de espuma, posiblemente por la presencia de una mayor concentración de compuestos lipofílicos (saponinas y otros compuestos espumantes) (ver figura 36).

Figura 36. Residuos lipofílicos de los lavados de n-hexano para el extracto de la cascara (a) y de la pulpa (b).



#### 4.2.1 Semicuantificación de antocianinas monoméricas totales y antocianinas poliméricas totales.

4.2.1.1 Determinación de antocianinas monoméricas totales por el método del pH diferencial. En la tabla N° 16 se muestran los datos de la absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción a pH 1,0 y 4,5 de los extractos crudos de cáscara (CrC), de pulpa (CrP), XC y XP (los extractos XC y XP corresponden a los extractos purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara y pulpa respectivamente); utilizados para calcular la concentración de antocianinas monoméricas en cada uno de estos extractos (ver sección 3.3.2.1). La concentración de antocianos totales se expresa en mg de cianidina-3-glucósido por litro (mg Cy-3-Glu/ L) y gramos de fruta (mg Cy-3-Glu/ g); además, para comparar con reportes bibliográficos, en los cuales utilizan de igual manera el Pm (449,2 g/mol) y la  $\epsilon$  (26,900 L/mol\*cm) de la cianidina-3-glucósido.

Tabla N° 16. Antocianinas monoméricas totales de los extractos CrC, CrP, XC y XP.

Muestra <sup>a</sup>	pH 1,0	pH 4,5	Antocianos totales (mg/L)	Antocianos totales (mg /100g fruta)
	$\lambda_{\text{vis-máx}}$ <sup>b</sup>	$\lambda_{\text{vis-máx}}$ <sup>b</sup>		
CrC	518,0	530,0	65,07 ±0,99	232,14 ±3,55
CrP	516,0	520,0	36,12 ±0,61	142,05 ±2,39
XC	518,8	528,0	637,06 ±7,97	1464,57 ±18,31
XP	518,8	517,6	172,56 ±0,44	376,93 ±0,95

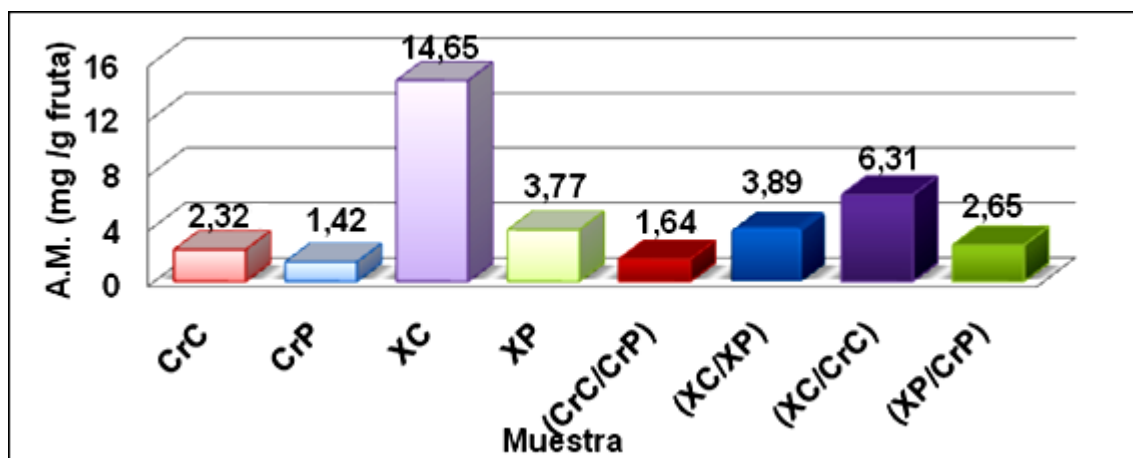
<sup>a</sup> Datos con ± DS de tres replicas, <sup>b</sup> nm.

Se emplea la diferencia de las absorbancias a la  $\lambda_{\text{vis-máx}}$  a pH 1,0 y a pH 4,5 debido a que las antocianinas monoméricas sufren una transformación reversible a pH 1,0 formando el catión flavilio (forma oxonium) de color naranja a morado y a pH 4,5 forman una pseudobase (forma hemiacetal) o chalcona incolora (ver figura 8) y los polimerizados no muestran cambios reversibles con el pH; por lo tanto la diferencia de absorbancias entre estos dos pH's se genera únicamente por las antocianinas monoméricas presentes en el extracto. La absorbancia a 700 nm se utiliza para eliminar el error producido por la turbidez (GIUSTI, 2001).

Comparando la concentración de antocianos totales monoméricas (AT) en los extractos CrC, CrP, XC y XP (ver tabla N° 16), se puede observar que el extracto XC tiene 6 veces más AT que el extracto CrC y el extracto XP tiene 2 veces más AT que el extracto CrP; debido a que al purificar el extracto por CC con amberlita XAD-7 se remueven compuestos no aromáticos, ácidos aromáticos, azúcares y compuestos de baja polaridad. La cantidad de AT en el extracto CrC es 1,6 veces mayor que en el extracto de CrP (ver gráfica N° 1); sin embargo este resultado esta condicionado al estado de maduración del fruto; en el cual la concentración

de antocianos totales en la pulpa se incrementa a mayor estado de madures del fruto (VAN BUREN, 1970).

Gráfica N° 1. Comparación de resultados de antocianinas monoméricas totales entre los extractos crudo y purificado por CC con amberlita XAD-7.



La concentración de antocianinas monoméricas presentes en la pulpa de Mortiño se expresa en mg de cianidina-3-glucósido por 100 g de fruta para realizar comparación con otros frutos (ver tabla N° 17). El fruto de Mortiño (*Vaccinium floribundum* H.B.K.) en comparación con otras frutas tropicales tiene una mayor concentración de antocianinas monoméricas. De esta forma el fruto de Mortiño se perfila como una buena fuente de antocianinas monoméricas que pueden ser purificadas para la obtención de patrones o con el complemento de una investigación de estabilidad, pueden ser utilizadas como aditivo natural en la industria alimenticia. (KUSKOSKI, 2005)

Tabla N° 17. Concentración de antocianinas monoméricas presentes en pulpa crudas de algunas frutas.

Fruta	mg Cy-3-Glu /100 g de fruto
Mora	41,8 ±1,8
Uva	30,9 ±0,1
Acai	22,8 ±0,8
Guayaba	2,7 ±0,2
Fresa	23,7 ±2,3
Acerola	16,0 ±0,5
Mortiño	142,0 ±2,4

4.2.1.2 Semicuantificación de antocianinas poliméricas totales por el método de pH sustractivo. El método de pH sustractivo se basa en la resistencia que presentan los pigmentos antociánicos poliméricos a la decoloración por el uso de agentes blanqueadores como el bisulfito de sodio, que decolora completamente las antocianinas monoméricas; de esta forma el valor de la absorbancia a  $\lambda_{\text{vis-máx}}$  y a 420 nm de las muestras tratadas con metabisulfito de sodio dependerá solamente de los pigmentos antociánicos poliméricos. Las antocianinas monoméricas al reaccionar con agentes blanqueadores como el bisulfito de sodio forman un derivado de ácido sulfónico; el cual, no presenta coloración por la pérdida de su conjugación en el anillo C (ver figura 9).

En la tabla N° 18 se muestran los datos de las absorbancia a la  $\lambda_{\text{vis-máx}}$ , 420 nm y a 700 nm de los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), tratados con metabisulfito de sodio y H<sub>2</sub>O; usados para calcular el color polimérico, la densidad de color y el porcentaje de color polimérico en cada uno de estos extractos, según la relaciones descritas en sección 3.3.2.2.

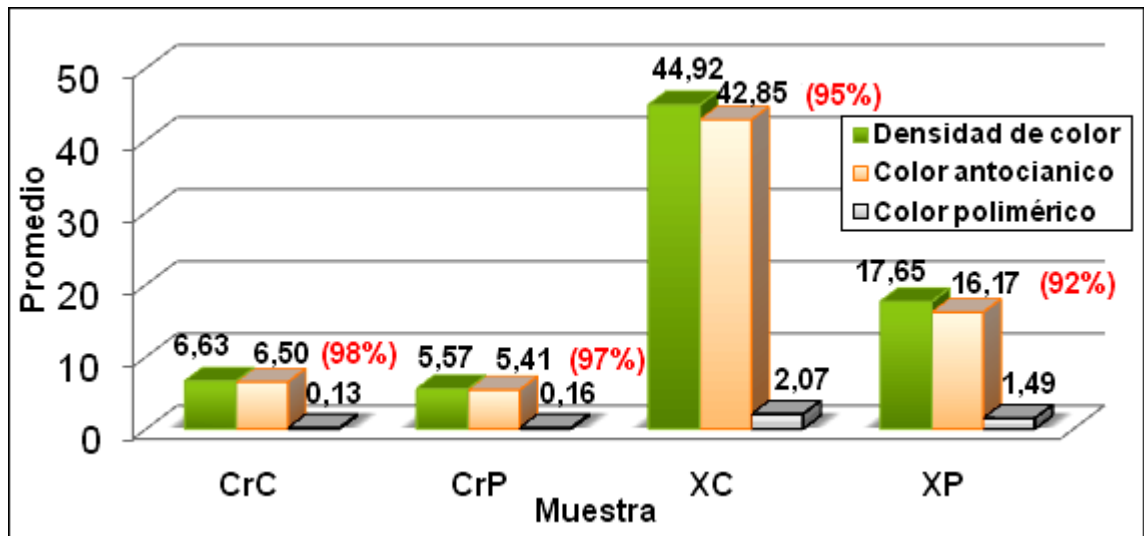
Tabla N° 18. Antocianinas poliméricas por el método de pH sustractivo para los extractos CrC, CrP, XC y XP.

Muestra <sup>a</sup>	$\lambda_{\text{vis-max}}^b$	Densidad de color	Color polimérico	% color Polimérico
CrC	518,0	6,63 ±0,02	0,13 ±0,01	1,99 ±0,16
CrP	516,0	5,57 ±0,04	0,16 ±0,03	2,86 ±0,49
XC	518,8	44,92 ±0,40	2,07 ±0,13	4,60 ±0,26
XP	518,8	17,65 ±0,12	1,49 ±0,05	8,42 ±0,33

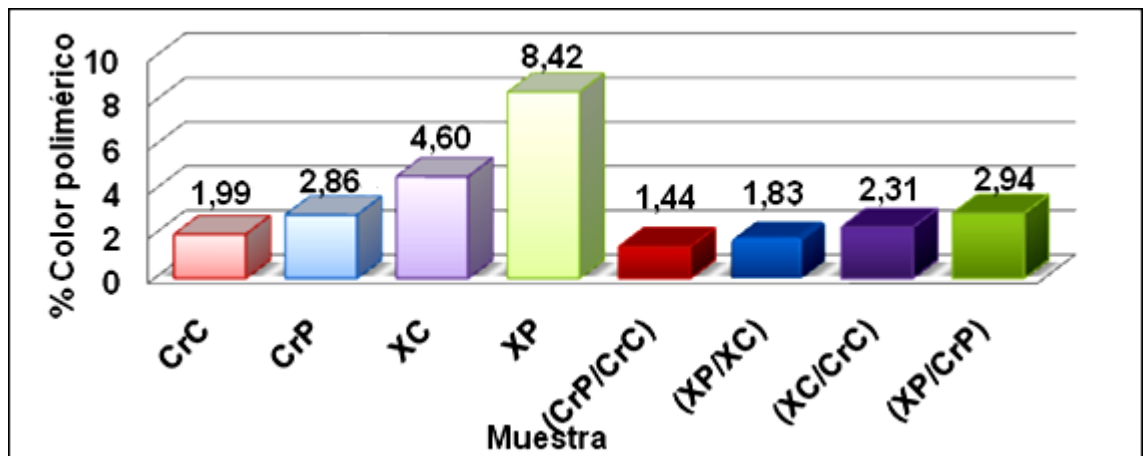
<sup>a</sup> Datos con ± DS de tres replicas, <sup>b</sup> nm.

El color producido por las antocianinas monoméricas de los diferentes extractos constituyen más del 91 % de la densidad de color, que refleja el poco aporte al color de las antocianinas poliméricas (ver gráfica N° 2).

Gráfica N° 2. Comparación de la densidad de color, color antocianico y polimérico en los extractos CrC, CrP, XC y XP.



Gráfica N° 3. Comparación de los resultados de % de color polimérico entre extractos CrC, CrP, XC y XP.

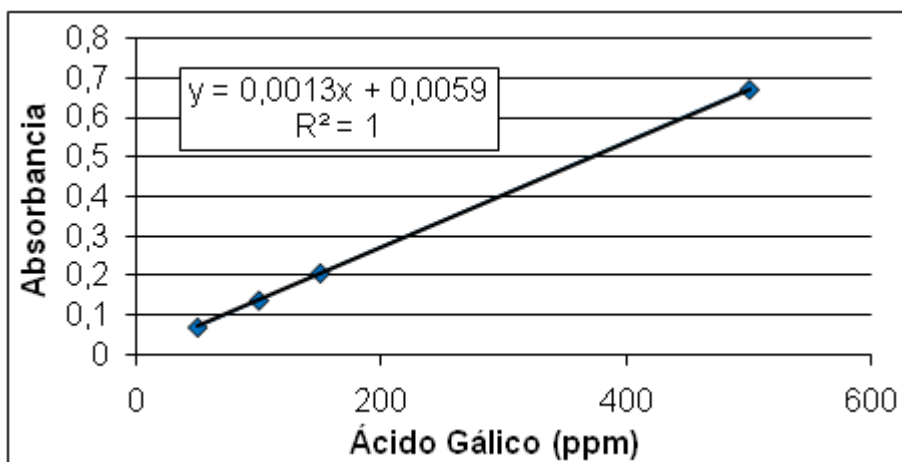


El porcentaje de color polimérico de los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), permite apreciar el enriquecimiento en antocianinas poliméricas en los extractos XC y XP, de forma que el extracto XC es más de 2 veces que el extracto CrC y el extracto XP es aproximadamente 3 veces mayor que el extracto CrP. Sin embargo, el porcentaje de color polimérico no es representativo en la densidad de color.

#### 4.2.2 Cuantificación de fenoles totales (FT) (método de Folin-Ciocalteu).

La cuantificación de FT en los extractos CrC, CrP, XC y XP, se hizo utilizando una curva patrón de ácido gálico (compuesto polifenólico) (ver datos en anexo A) con un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) igual a 1, garantizando la linealidad del método (ver gráfica N° 4). La medida de las absorbancias de los extractos se realizó cumpliendo la Ley de Beer y los datos finales se expresaron en mg ácido gálico por 100 g de fruta.

Gráfica N° 4. Curva de calibración del ácido gálico.



En la gráfica N° 5 y tabla N° 19, se muestra la cantidad de fenoles totales de los extractos; en donde, es evidente el enriquecimiento de compuestos del tipo flavonoide y compuestos fenólicos no flavonoides en los extractos XC y XP, ocasionado por la refinación con CC utilizando amberlita XAD-7. El extracto XC tiene aproximadamente 10 veces más contenido de polifenoles que el extracto CrC y el extracto XP tiene más de 7 veces el contenido de polifenoles que el extracto CrP.

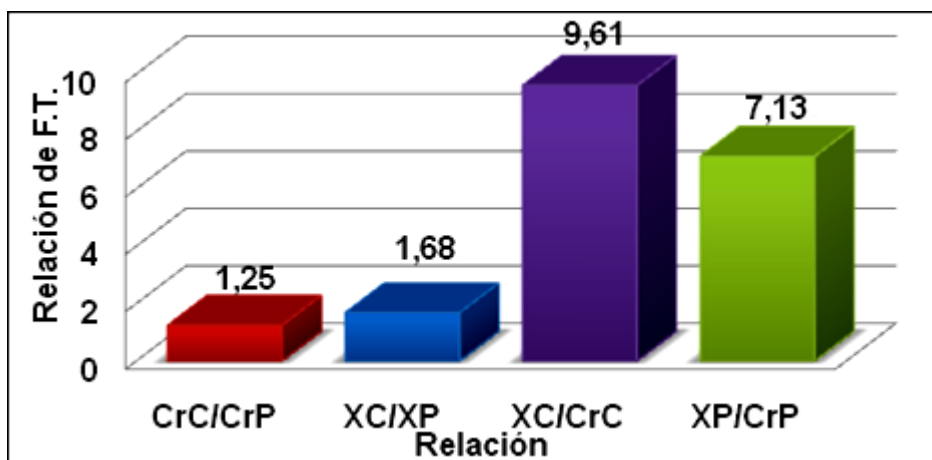
Tabla N° 19. Fenoles totales de los extractos CrC, CrP, XC y XP.

Muestra <sup>a</sup>	F.T. <sup>b</sup>
CrC	352,16 ±15,42
CrP	281,64 ±14,77
XC	3384,49±15,42
XP	2009,30 ±50,73

<sup>a</sup> Datos con ± DS de tres replicas, <sup>b</sup> datos expresados en mg ácido gálico/100g fruta.



Gráfica N° 5. Comparación de resultados de F.T. entre los extractos de crudo y purificado por CC con amberlita XAD-7.



Comparando el fruto del mortiño con otras frutas tropicales (ver tabla N° 20); éste muestra un elevado contenido de polifenoles totales y es superado por la acerola y el mango. De esta forma el fruto de Mortiño es una buena fuente alimenticia de compuestos polifenolicos, que son efectivos donadores de hidrógenos. (KUSKOSKI, 2005)

Tabla N° 20. Concentración de FT presentes en pulpa cruda de algunas frutas.

Muestras	FT (mg/100 g de pulpa) <sup>a</sup>
Mora	118,9 (±2,1)
Uva	117,1 (±0,6)
Açai	136,8 (±0,4)
Guayaba	83,0 (±1,3)
Fresa	132,1 (±3,8)
Acerola	580,1 (±4,6)
Piña	21,7 (±4,5)
Mango	544,9 (±7,3)
Graviola	84,3 (±5,8)
Cupuaçu	20,5 (±3,0)
Maracuyá	20,0 (±2,6)
Mortiño	281,6 (±14,8)

<sup>a</sup> Datos espectrofotométricos.

#### 4.2.3 Caracterización y purificación del pigmento por CLAE.

4.2.3.1 Análisis por CLAE tipo analítico del extracto XC. Se realizó el análisis por CLAE tipo analítico a las fracciones obtenidas de la purificación por cromatografía de columna (CC) con sephadex LH-20 del extracto XC; esperando que éstas se hayan enriquecido en compuestos tipo flavonoide. En esta purificación se obtuvieron cuatro fracciones, de las cuales, se suponía que en la cuarta (numeración según el orden de elución) se encontrarían las antocianinas poliméricas; sin embargo, en el espectro de la segunda fracción se evidencia claramente la presencia de antocianinas poliméricas (ver figura 38). Esto posiblemente se debió a que la mezcla de solventes utilizada en la CC con sephadex LH-20 no fue la ideal (ver apartado 3.3.3.2).

En los espectros de las tres primeras fracciones se observan en total 5 antocianinas monoméricas diferentes (ver figuras 37, 38 y 39).

Figura 37. Cromatograma en 3D de la primera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.

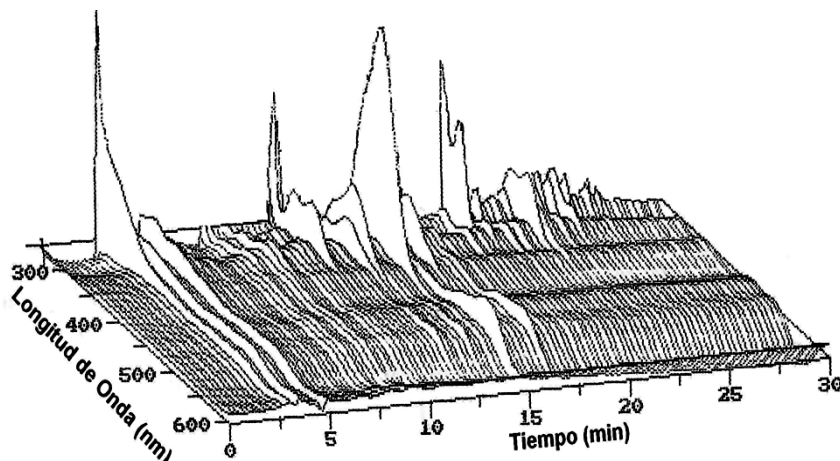


Figura 38. Cromatograma en 3D de la segunda fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.

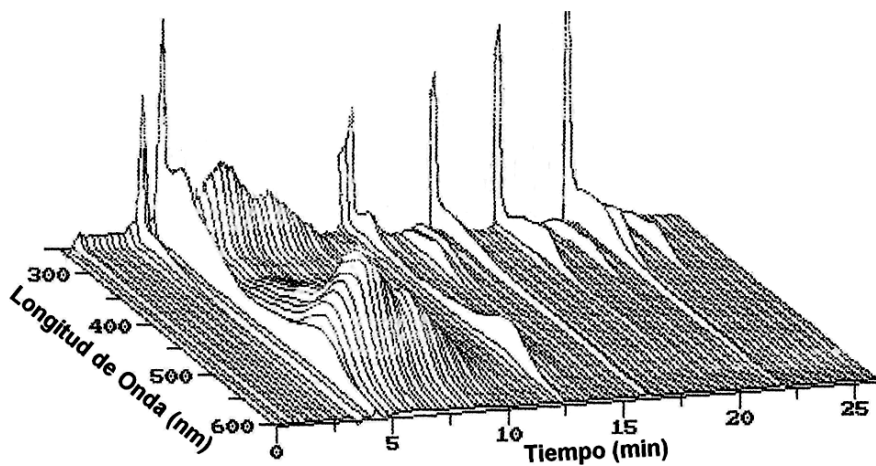
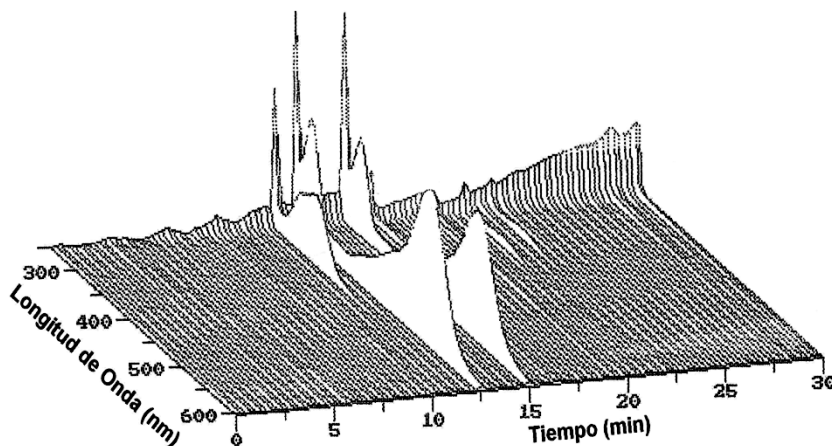


Figura 39. Cromatograma en 3D de la tercera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XC.



En la primera y segunda fracción no es fácil realizar una purificación de antocianinas, debido a la presencia de otros compuestos con tiempo de retención (tr) muy cercanos al de las antocianinas monoméricas. Para la purificación de antocianinas monoméricas por CLAE tipo preparativo, la fracción más apropiada es la tercera; en donde, sí se encontró un enriquecimiento de este tipo de compuestos (ver figura 39); sin embargo, al realizar una corrida cromatografía por CLAE tipo analítico del extracto XC, se evidenció la probabilidad de realizar la purificación de las antocianinas monoméricas a partir de este extracto, utilizando un gradiente adecuado de solventes (ver figuras 40 y 41).

En el espectro de la figura 38 se observa la presencia de antocianinas poliméricas, debido a que, al realizar la purificación por cromatografía de columna (CC) con sephadex LH-20 del extracto XC, este es sometido a un tratamiento adicional, que

consta de disolver el extracto, realizar la cromatografía y la posterior liofilización de las fracciones; esto conlleva a que posiblemente las antocianinas se polimericen formando una estructura más estable. En el espectro de la figura 40 en total se observan 5 antocianinas monoméricas diferentes (A, B, C, D, y E) y un flavonol (F).

Figura 40. Cromatograma en 3D de CLAE tipo analítico del extracto XC.

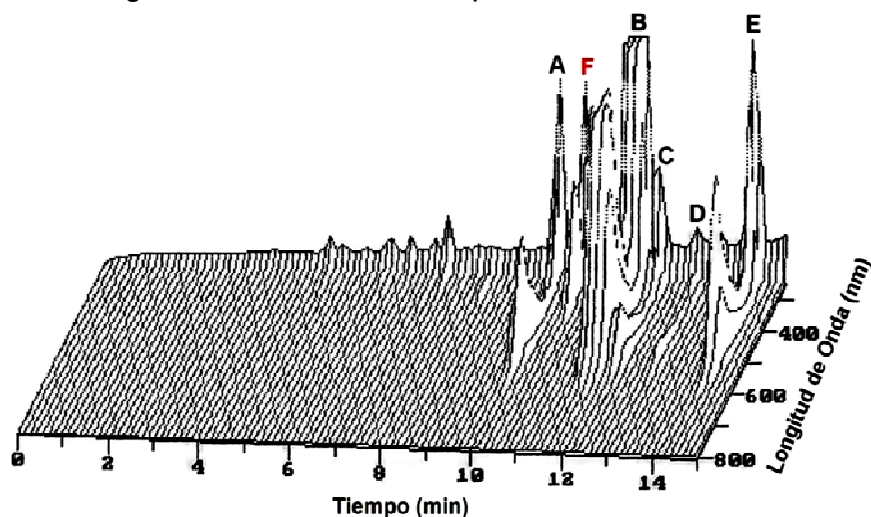
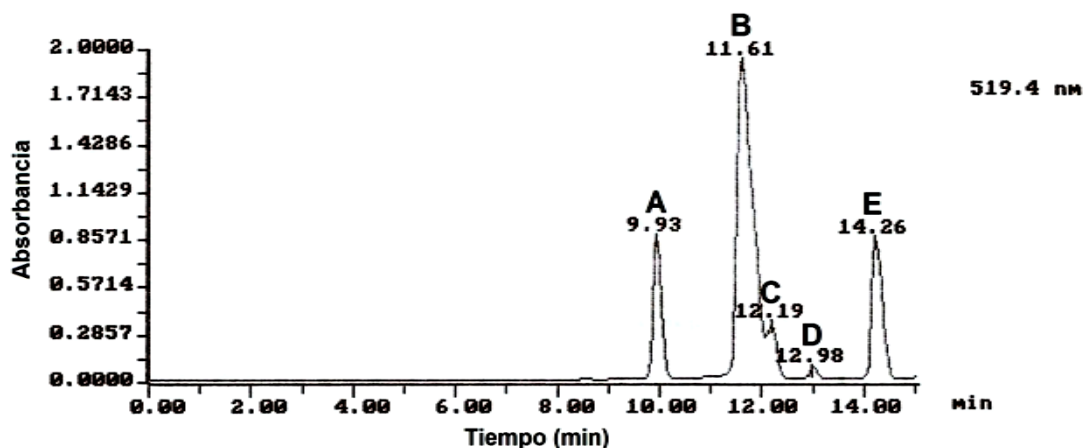


Figura 41. Cromatograma de CLAE tipo analítico del extracto XC.



4.2.3.2 Análisis por CLAE tipo analítico del extracto XP. Se realizó el análisis por CLAE tipo analítico a las fracciones obtenidas de la purificación por cromatografía de columna (CC) con sephadex LH-20 del extracto XP. En esta purificación se obtuvieron cinco fracciones, de las cuales, se esperaba que en la quinta (numeración según el orden de elución) se encontrarían las antocianinas poliméricas; sin embargo, en el espectro de la tercera fracción se evidencia la presencia de antocianinas poliméricas (ver figura 44).

En total en los espectros de las cuatro primeras fracciones se observan 2 antocianinas monoméricas diferentes.

Figura 42. Cromatograma en 3D de la primera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.

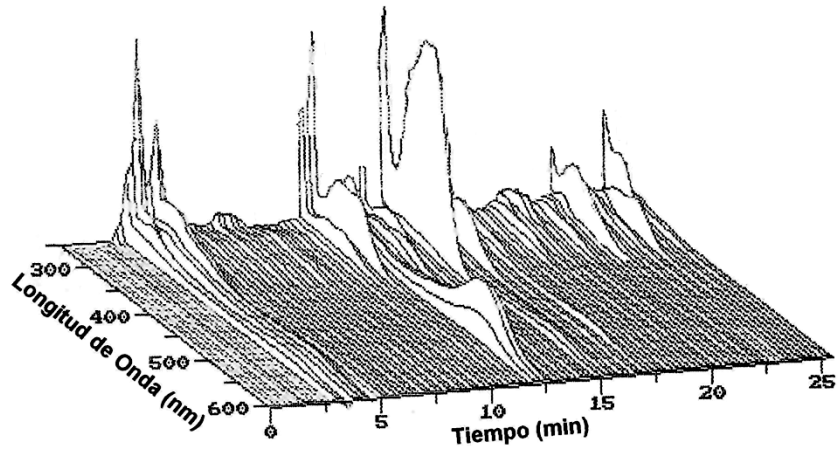


Figura 43. Cromatograma en 3D de la segunda fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.

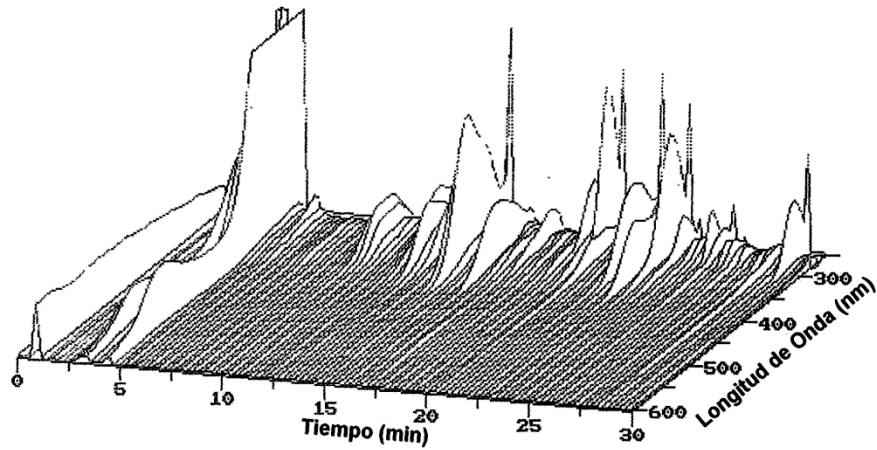


Figura 44. Cromatograma en 3D de la tercera fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.

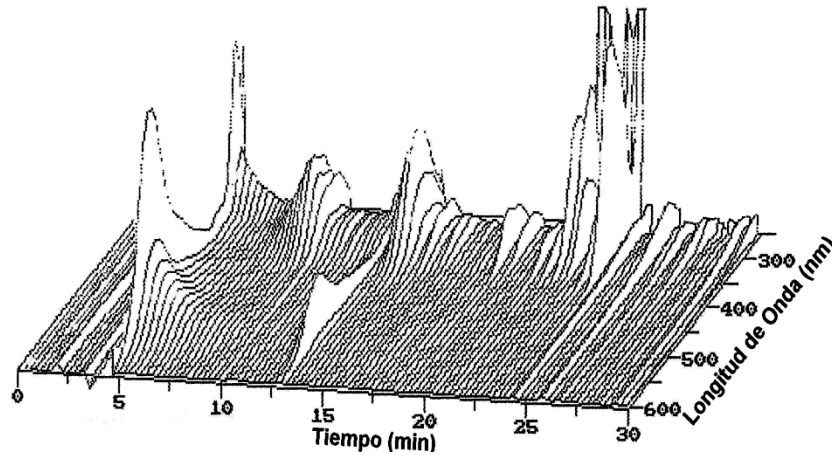
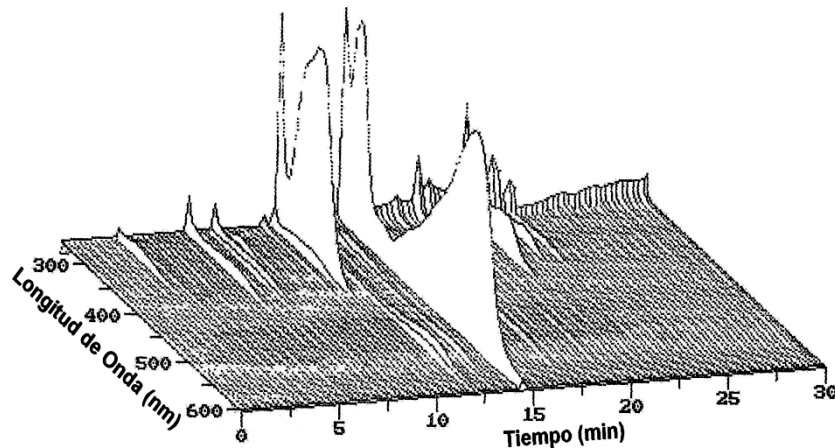


Figura 45. Cromatograma en 3D de la cuarta fracción de la purificación por CC con sephadex LH-20 del extracto XP.



En la primera, segunda y tercera fracción (ver figuras 42, 43 y 44) no es fácil realizar una purificación de antocianinas, debido a la presencia de otros compuestos con tiempo de retención (tr) muy cercanos al de las antocianinas monoméricas. Para la purificación de antocianinas monoméricas por CLAE tipo preparativo, la fracción más apropiada es la cuarta (ver figura 45); sin embargo, el espectro de CLAE tipo analítico del purificado por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de pulpa (XP); muestra que una purificación en este es más conveniente; ya que, no hay presencia de antocianinas poliméricas y los compuestos que interfieren son menores (ver figura 46 y 47). Este resultado es coherente con el obtenido en el espectro de CLAE del extracto XC de la cáscara (ver figuras 40 y 41), confirmando que la presencia de antocianinas poliméricas es

provocada por el tratamiento adicional que son sometidos los extractos XC y XP en la purificación por CC con sephadex LH-20.

En el espectro de la figura 46 y 47 del extracto XP se observa dos antocianinas monoméricas; las cuales tienen un tr igual al de las antocianinas encontrados en el extracto XC (la similitud es superior al 99 %) (ver figuras 40 y 41).

Figura 46. Cromatograma en 3D de CLAE tipo analítico del extracto XP.

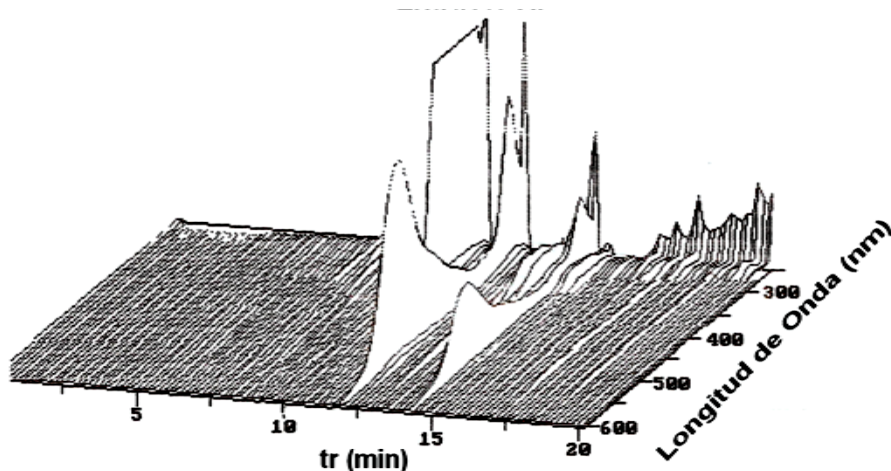
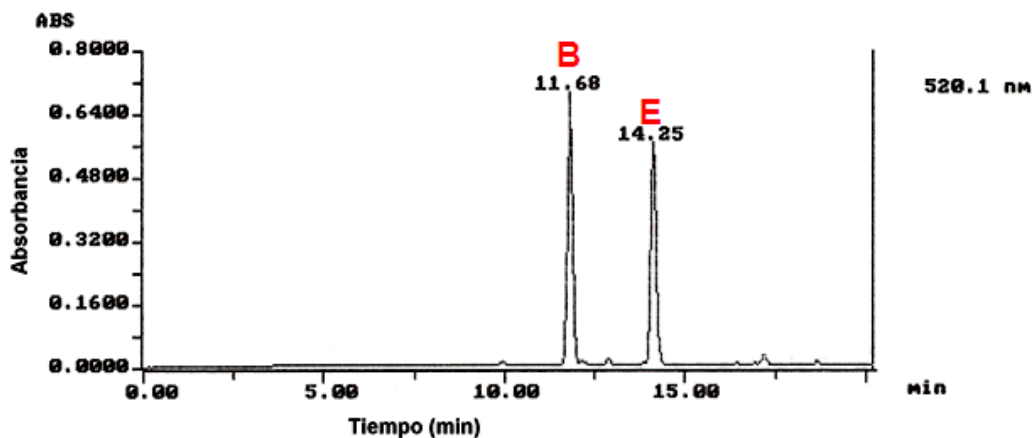


Figura 47. Cromatograma de CLAE tipo analítico del extracto XP.



Al encontrar en los extractos purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), antocianinas monoméricas con tr iguales, se realizó la CLAE tipo analítico para estos extractos por triplicado. Como análisis complementario se determinó el espectro de Uv-Vis para cada antocianina; concluyendo, que la antocianina monomérica referenciada como B (tr = 11,61) en el espectro de la figura 41 del extracto XC, es la misma antocianina

referenciada como B (tr = 11,68) en el espectro de la figura 47 del extracto XP (ver figura 48 y 49) y que la antocianina monomérica referenciada como E (tr = 14,26) en el espectro de la figura 41 del extracto XC, es la misma antocianina referenciada como E (tr = 14,25) en el espectro de la figura 47 del extracto XP (ver figura 50 y 51).

Figura 48. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica B del extracto XC (tr = 11,61).

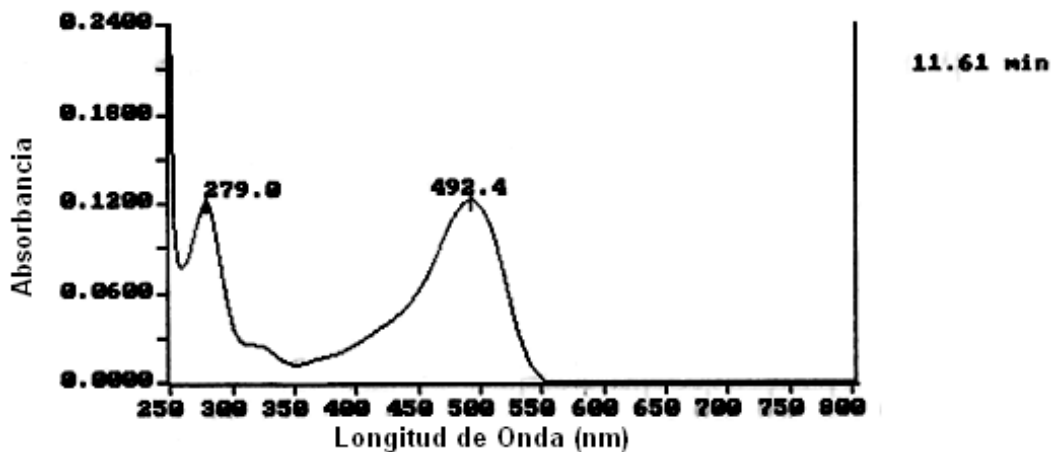


Figura 49. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica B del extracto XP (tr = 11,68).

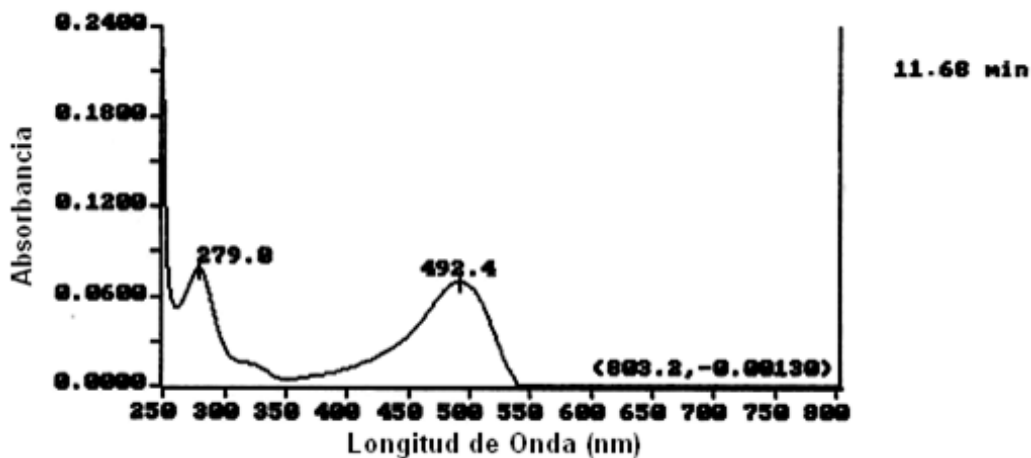




Figura 50. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica E del extracto XC (tr = 14,26).

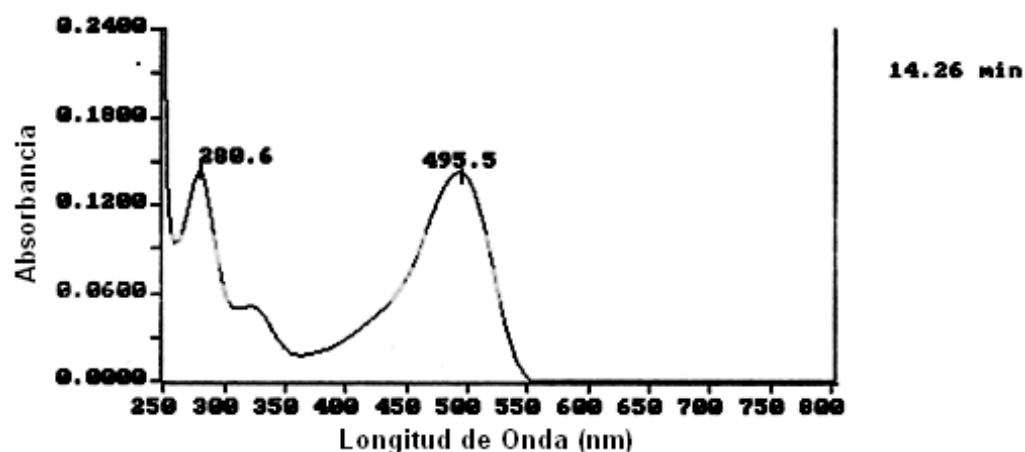
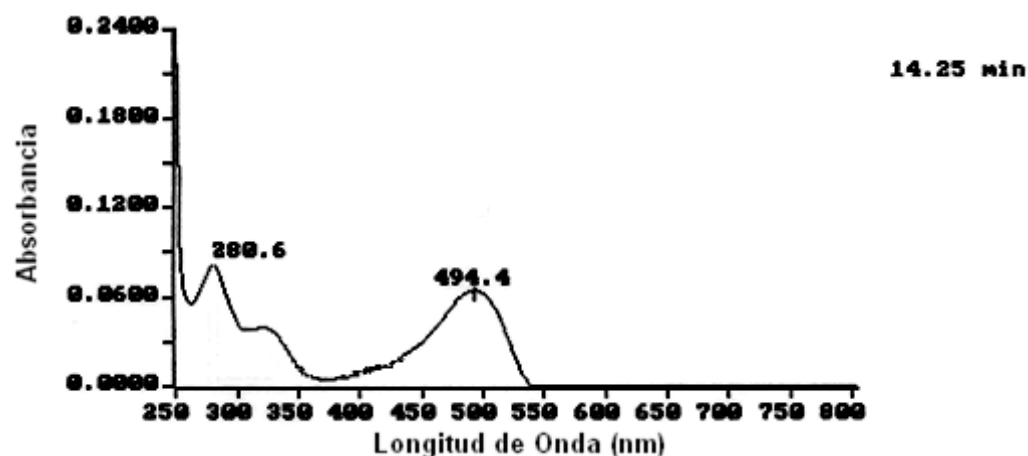


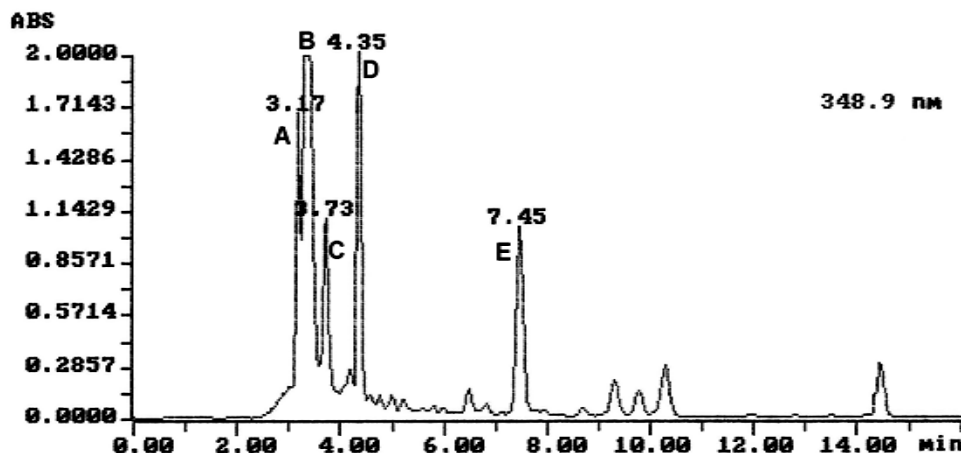
Figura 51. Espectros de máxima absorbancia de la antocianina monomérica E del extracto XP (tr = 14,25).



Al encontrar las dos antocianinas monoméricas del extracto XP en el extracto XC de la cáscara, reduce la purificación por CLAE tipo preparativo en este último.

4.2.3.3 Análisis por CLAE tipo preparativo del extracto XC. El gradiente final utilizado para la CLAE se describe en la tabla N° 12; con el cual, se logró reducir el tiempo de corrida a 17 min, la cantidad de inyección máxima de 25  $\mu$ L y una concentración de 408,75 mg/mL; ya que a una mayor cantidad no era posible separar las antocianinas A y B, por tener estas un tiempo de retención cercano (ver figura 52).

Figura 52. Cromatograma de CLAE tipo preparativo del extracto XC.



Las cantidades obtenidas de 20 inyecciones en el sistema CLAE tipo preparativo, de cada una de las antocianinas puras se muestra en la siguiente tabla.

Tabla N° 21. Cantidad de antocianinas puras.

Antocianina monomérica	Cantidad (mg) <sup>a</sup>
A	0,0 <sup>b</sup>
B	22,4
C	3,3
D	4,1
E	1,2

<sup>a</sup> peso liofilizado, <sup>b</sup> no se logro aislar

4.2.3.4 Espectros UV-Vis de las antocianinas aisladas. Con los espectros de UV-Vis de las figuras 48, 50, 53 y 54 se confirma la ausencia de acilaciones en las antocianinas presentes en el extracto purificado por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) (ver figura N° 20 y apartado a) de la sección 2.3.3.4.).

Figura 53. Espectro UV-Vis de la antocianina C purificado por CLAE-DAD.

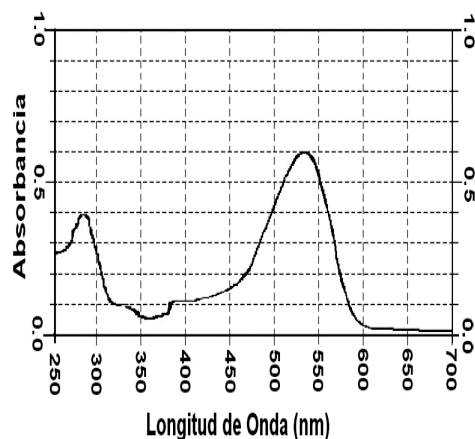
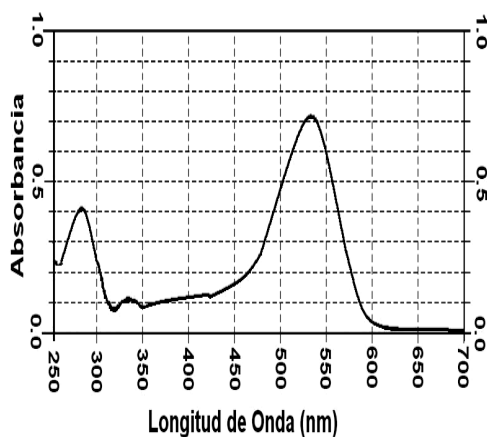


Figura 54. Espectro UV-Vis de la antocianina D purificado por CLAE-DAD.



Los valores cercanos a 0,2 de las antocianinas puras B, C, y D de la relación  $A_{440}/A_{m\acute{a}x}$  indican que la glicosidación en las posiciones 3 y 5 y el valor de 0,28 de la antocianina E confirma que presenta solo una glicosidación en la posición 3 (ver tabla N° 22 y apartado a) de la sección 2.3.3.4) (ROBERT, 2001)

Tabla N° 22. Absorbancias en la  $\lambda_{m\acute{a}x}$  absorbancia y a 440 nm de las antocianinas puras.

Antocianina Monomérica <sup>a</sup>	Concentración <sup>b</sup>	$\lambda_{m\acute{a}x}$ <sup>c</sup>	Abs $\lambda_{m\acute{a}x}$	Abs $\lambda_{440}$	$A_{440}/A_{m\acute{a}x}$
B	32,0	536,0	0,71	0,15	0,21
C	33,0	535,6	0,59	0,12	0,20
D	81,1	535,6	0,30	0,06	0,21
E	30,0	534,0	0,60	0,17	0,28

<sup>a</sup> Datos con DS de tres replicas, <sup>b</sup> ppm, <sup>c</sup> nm.

#### 4.2.4 Elucidación estructural.

4.2.4.1 Antocianina monomérica pura E. En el sistema CLAE tipo analítico se utilizó cianidina-3-O-glucosa (Cy-3-Glu) como patrón, el cual presentó un tiempo de retención (tr) de 14,27 min (ver figura 55), que es igual al de las antocianinas referenciadas como E en los espectros de las figuras 41 y 47 con tr de 14,26 y 14,25 min respectivamente. Para confirmar que se trataba de la misma antocianina, se determinaron los máximos de absorbancia, los cuales mostraron, a 495,8 nm el máximo de absorbancia para la Cy-3-Glu (ver figura 56) y 495,5 y 494,4 nm para las antocianinas referenciadas como E en las figuras 41 y 46 (ver figuras 50 y 51). Concluyendo que la antocianina referenciada como E en los espectros de CLAE tipo analítico de los extractos purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), corresponde a la Cy-3-O-Glu (ver figura 57).

Figura 55. Espectro de CLAE tipo analítico de la cianidina-3-O-glucosa.

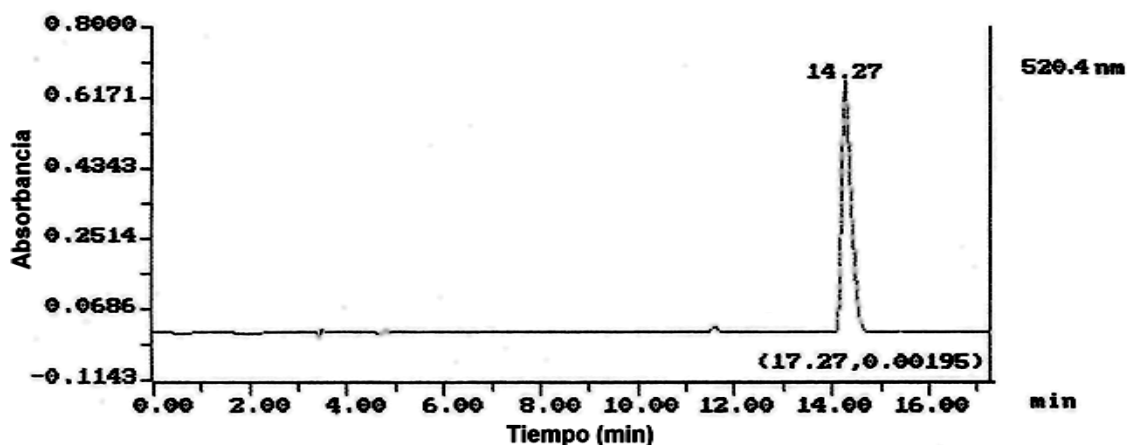


Figura 56. Espectro de Uv-Vis de la cianidina-3-O-glucosa.

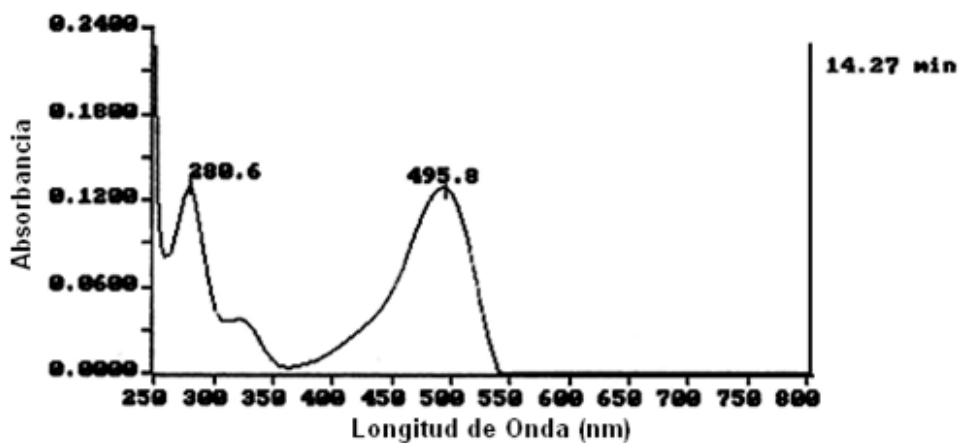
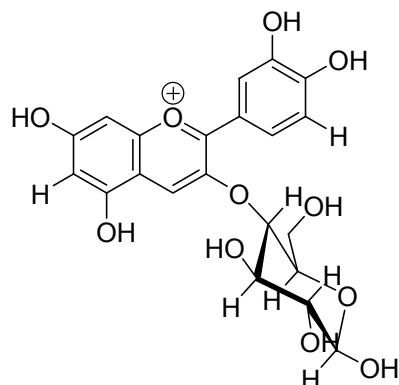


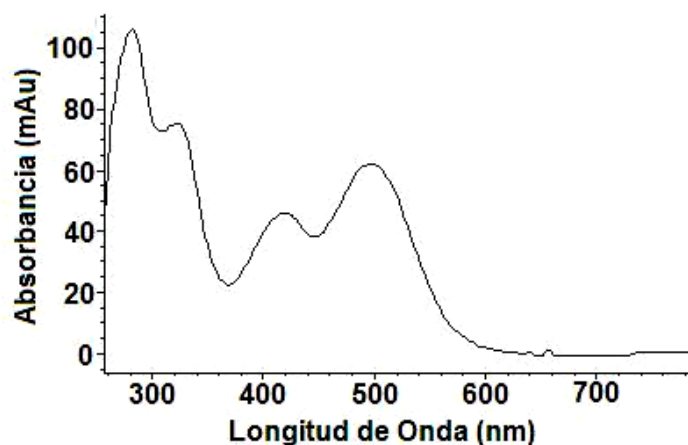
Figura 57. Estructura de la cianidina-3-O-glucosa.



4.2.4.2 Antocianina monomérica pura D. El espectro de masa de la antocianina D presenta un ión molecular  $[M^+] = 741$ , un fragmento de  $m/z = 579$  que corresponde posiblemente a la unión de la aglicona con una metilpentosa ( $C_6H_{12}O_5$ ) y una hexosa ( $C_6H_{12}O_6$ ), un fragmento de  $m/z = 433$  que corresponde a la unión de la aglicona con una hexosa (glucosa ó galactosa) y un fragmento de  $m/z = 271$  el cual es característico de la pelargonidina y de la luteolinidina (ver figura 59). Con respecto al fragmento en  $m/z = 579$  en el espectro de la figura 59 confirma que la aglicona esta unida a una metilpentosa y que la perdida de 741 a 579 corresponde a una hexosa, debido a que si la perdida fuera de una metilpentosa habría un fragmento con  $m/z = 595$ .(LONGO, 2006)

Con el espectro UV-Vis de la antocianina D (ver figura 54) se confirmó que la aglicona corresponde a la luteolinidina, debido a que la pelargonidina presenta un hombro característico entre los 450 y 500 nm. Este hombro es independiente a las sustituciones que pueda tener esta aglicona (ver figura 58). (GIUSTI, 2001).

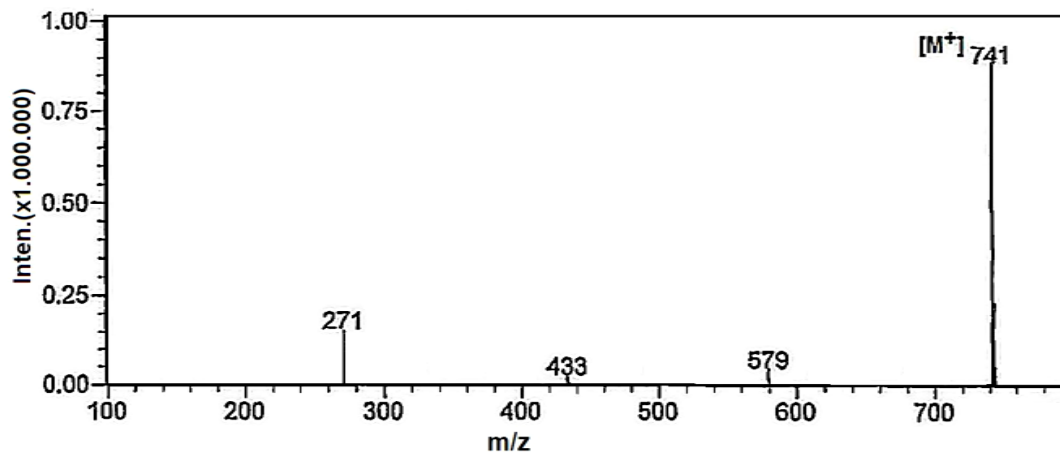
Figura 58. Espectro de UV-Vis de la pelargonidina.



Por lo anterior la estructura que se propone para la antocianina referenciada como D es la Luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa; en donde, n<sup>1</sup> es la posición de la glicosidación en 5, 7, 3' o 4' de la luteolinidina.

En donde: la hexosa puede ser glucosa o galactosa y como metilpentosas la ramnosa o la fucosa (ver figura 5).

Figura 59. Espectro de masa de la antocianina monomérica D.

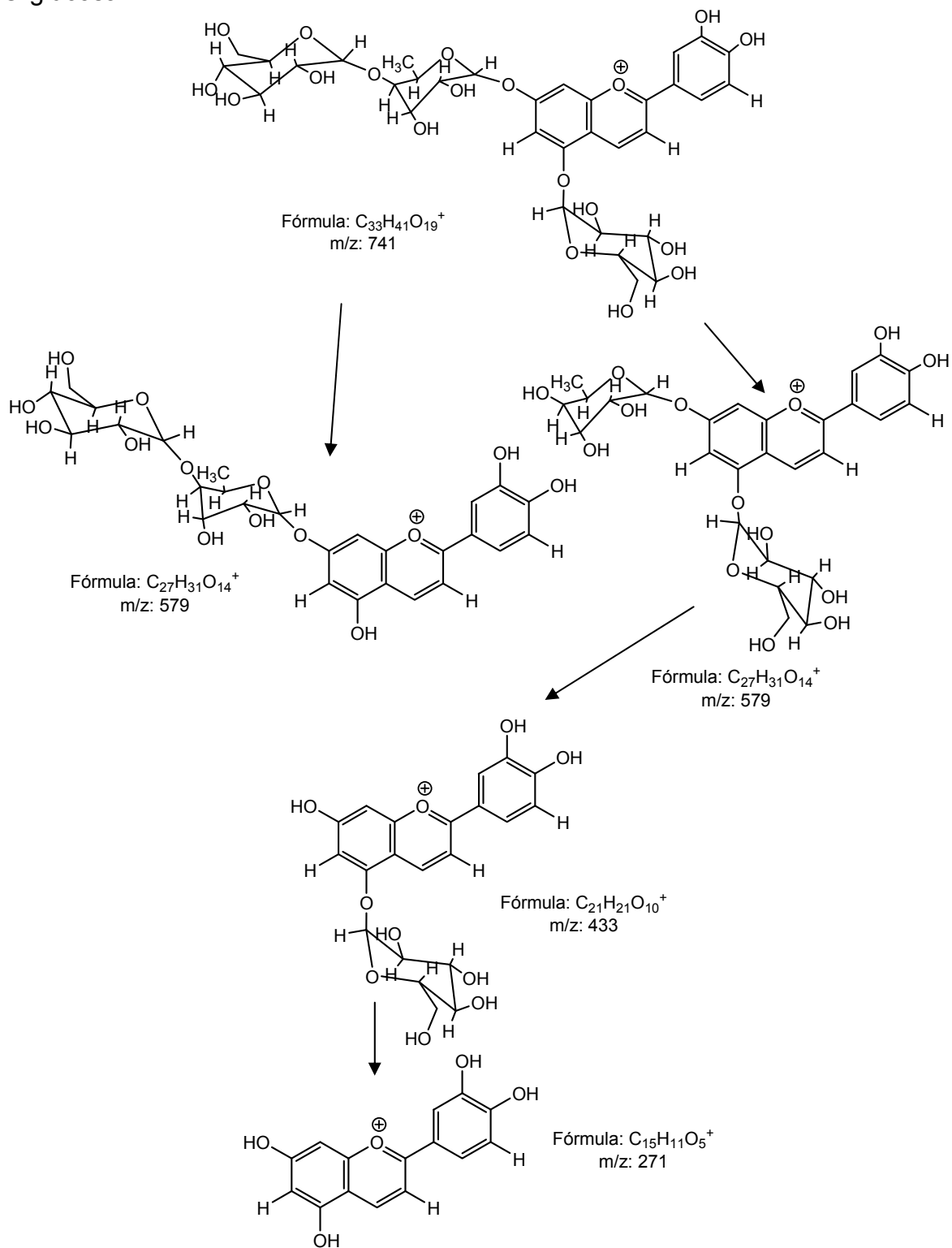


Se propone las posibles fragmentaciones de la luteolinidina, utilizando como hexosa la glucosa en la posición 5 y como metil pentosa la ramnosa unida a una glucosa en la posición 7, se muestran en la figura 60.

---

<sup>1</sup> La utilización de n en el nombre propuesto se debe a que con los análisis realizados no se puede confirmar en qué posición y sus posibles combinaciones, está unida el azúcar o los azúcares a la aglicona.

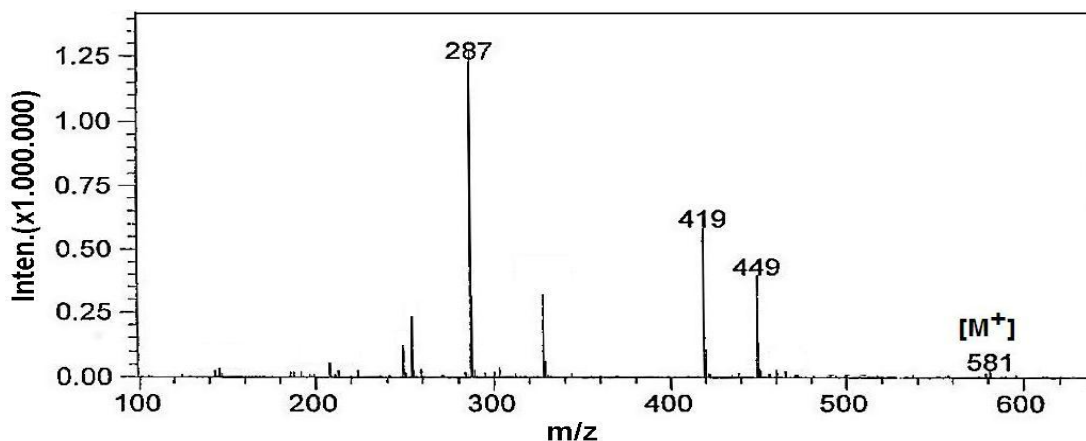
Figura 60. Posibles fragmentaciones de la luteolinidina-5-O-ramnosa-O-glucosa-7-O-glucosa.



4.2.4.3 Antocianina monomérica pura C. El espectro de masa de la antocianina C presenta un ion molecular  $[M^+] = 581$ , un fragmento de  $m/z = 449$  que corresponde a la unión de la aglicona con una hexosa (glucosa ó galactosa), un fragmento  $m/z = 419$  que corresponde a la unión de la aglicona con una pentosa ( $C_5H_{10}O_5$ ) y un fragmento de  $m/z = 287$  el cual es característico de la cianidina (Cy) (ver figura 61). La glicosidación en la posición 3 y 5 se confirmó con la relación de la  $A_{440}/A_{máx}$  (0,202) obtenida en el espectro de Uv-Vis de la antocianina (ver sección a) del apartado 2.3.3.4). Por lo anterior la estructura propuesta para la antocianina C es la cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa; en donde n es la posición de la glicosidación en el carbono número 3 o 5 de la Cy. (TIAN, 2005)

Donde, la hexosa puede ser glucosa o galactosa y la pentosa puede ser la ribosa, xilosa y arabinosa (ver figura 5).

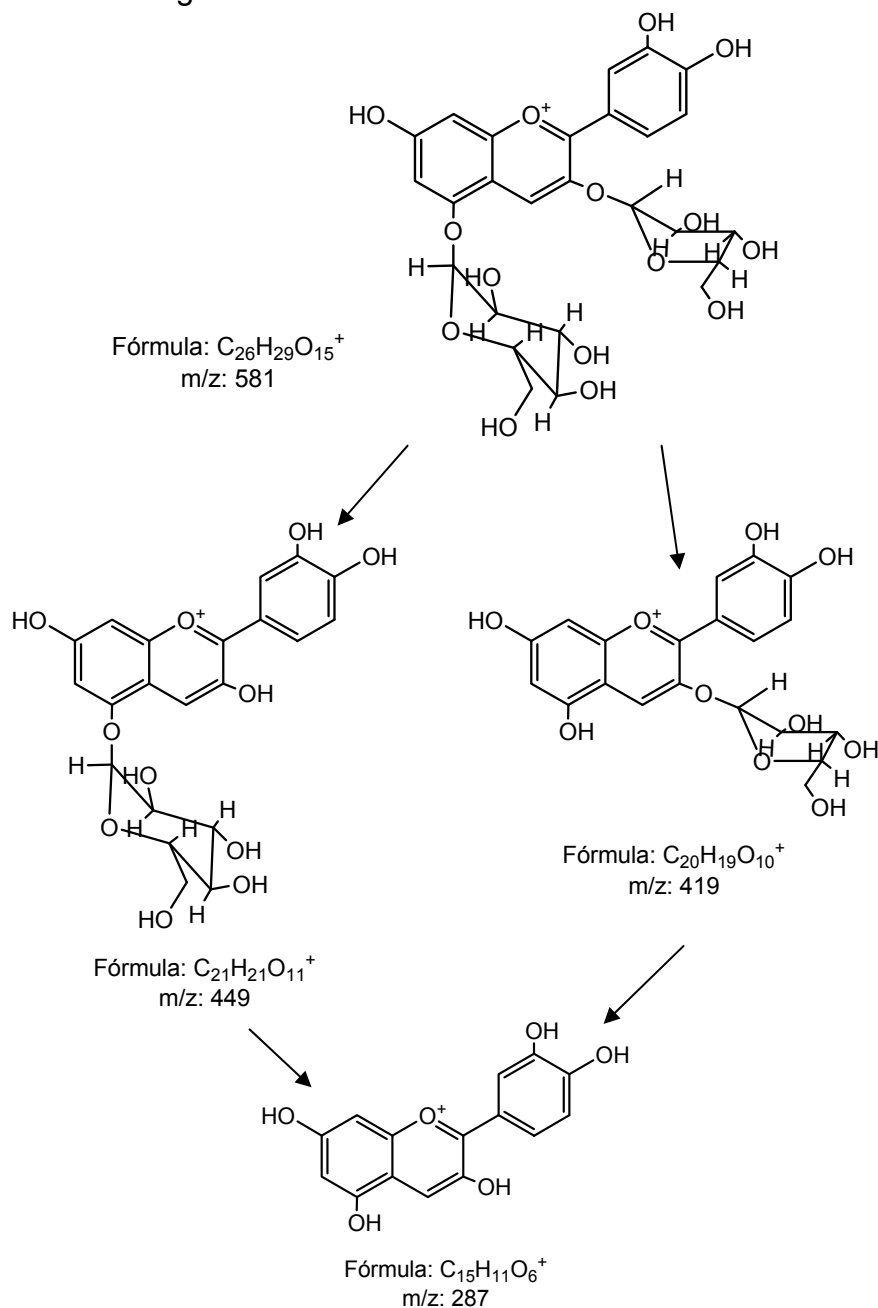
Figura 61. Espectro de masa de la antocianina monomérica C.



Se propone las posibles fragmentaciones de la Cy, utilizando como hexosa la glucosa en la posición 5 y como pentosa la arabinosa en la posición 3, se muestran en la figura 62.



Figura 62. Posibles fragmentaciones de la cianidina-3-O-arabinosa-5-O-glucosa.



#### 4.2.4.4 Antocianina monomérica pura B.

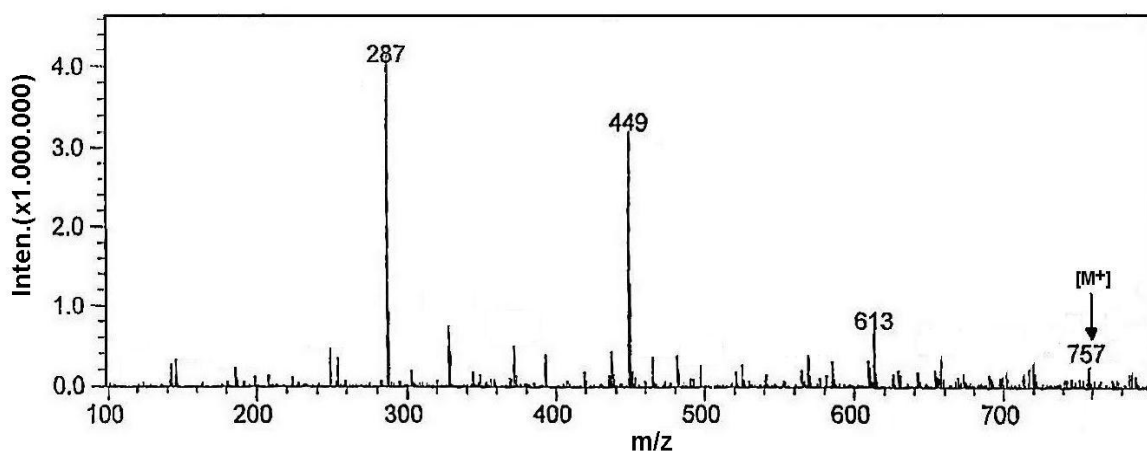
a) Espectro de masas. El espectro de masa de la antocianina B presenta un ion molecular  $[M^+] = 757$ , un fragmento de  $m/z = 613$  que corresponde a la unión de la aglicona con dos hexosas (glucosa ó galactosa), un fragmento de  $m/z = 449$  que corresponde a la unión de la aglicona con una hexosa y un fragmento de  $m/z = 287$  el cual es característico de la cianidina (Cy) (ver figura 63). Se confirma que

las hexosas están unidas a la aglicona y no la metilpentosa ya que no existe un fragmento de  $m/z = 595$ . La glicosidación en la posición 3 y 5 se confirmó con la relación de la  $A_{440}/A_{máx}$  (0,209) obtenida en el espectro de Uv-Vis de la antocianina (ver sección a) del apartado 2.3.3.4). (MONTORO, 2006)

Por lo anterior la estructura propuesta para la antocianina C es la cianidina-n-O-hexosa-O-metilpentosa-n-O-hexosa; en donde n es la posición de la glicosidación en el carbono número 3 o 5 de la Cy.

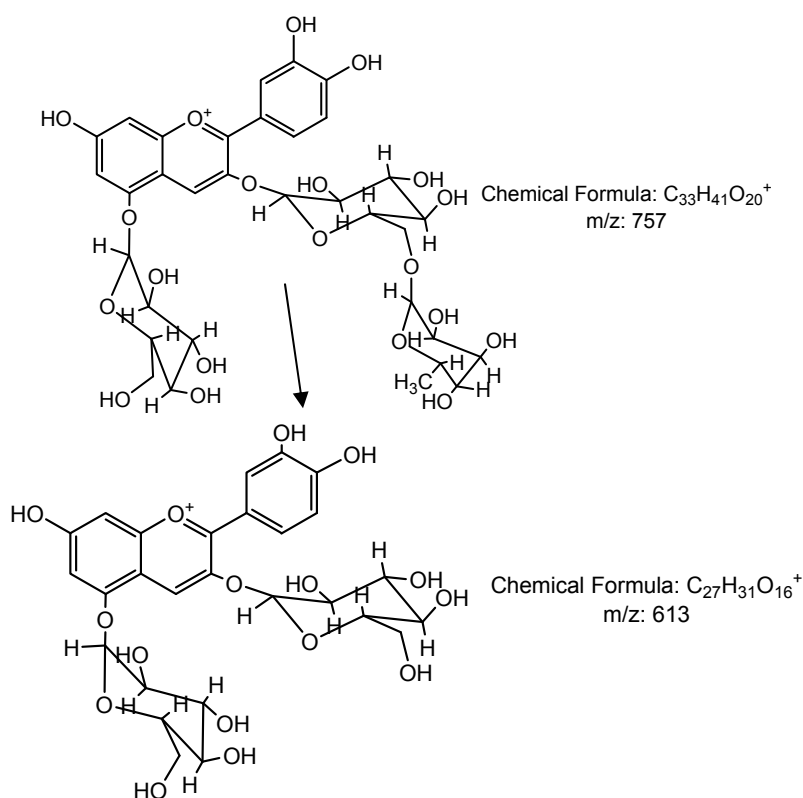
En donde: la hexosa puede ser glucosa o galactosa y como metilpentosas la ramnosa o la fucosa (ver figura 5).

Figura 63. Espectro de masa de la antocianina monomérica B.



Se propone las posibles fragmentaciones de la Cy, utilizando como hexosa la glucosa unida a una metilpentosa (ramnosa) en la posición 3 y una glucosa en la posición 5, se muestran en la figura 64.

Figura 64. Posibles fragmentaciones de la cianidina-3-O-glucosa-O-ramnosa-5-O-glucosa.



b) Espectro de RMN  $^1H$ . Para verificar la estructura química de la antocianina mayoritaria referenciada como B en el espectro de la figura 63, se tomó el espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica ( $^1H$ ), con el cual se confirmó que la aglicona es una cianidina (ver figura 67) y que una de las azúcares unida a esta es la ramnosa, debido a que presenta señales características con un desplazamiento ( $\delta$ ) de 1,37 ppm, correspondiente al metilo del azúcar y a 4,43 ppm que corresponde al carbono 1'' (ver figura 66). También se pudo confirmar que la estructura está compuesta por una aglicona y tres azúcares, las cuales se evidencian por los 22 protones integrados en la región comprendida de 1,37 a 4,1 ppm. Este resultado es coherente con el obtenido en el espectro de CLAE-EM en el cual tentativamente se propuso la estructura de la cianidina-n-O-hexosa-O-metilpentosa-n-O-hexosa para esta antocianina, aclarando que la metilpentosa es la ramnosa (ver figura 67). Se debe aclarar que para una identificación completa de los azúcares y de su posición, es necesario un análisis de RMN en 2D (TOCSY) con el cual se puede obtener una ubicación espacial de los protones de estos azúcares; análisis que no se logró determinar en esta investigación, debido a la poca cantidad de antocianina obtenida en la purificación del extracto XC en la CLAE tipo preparativo (ver tabla N° 21).

Para la asignación de los protones característicos de la aglicona en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se determinó el  $\delta$  de estos (ver tabla N° 23) y se compararon con referencias bibliográficas. De esta forma se pudo asignar las señales para los protones 4, 6, 8, 2', 5' y 6' (ver tabla N° 23 y figura 67). Además, esta asignación se complementó por las predicciones en el  $\delta$  de cada protón y su clase; por ejemplo el H4 de la cianidina debe presentar un desplazamiento mayor a 8,8 ppm.

Tabla N° 23. Datos obtenidos del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina B.

Portones de la aglicona	Nombre	$\delta$	$\delta^a$	$\delta^b$	$\delta^c$	$\delta^d$	$\delta^e$	Clase	Integra
H 4		8,82	8,97	8,92	8,98	9,02	8,96	S	1
H 6		6,56	6,76	6,65	6,71	6,65	6,73	d	1
H 8		6,80	6,98	6,87	6,96	6,90	6,94	D	1
H 2'		8,08	8,13	8,01	8,09	8,04	8,05	S	1
H 5'		6,85	7,10	7,00	7,04	7,02	7,05	D	1
H 6'		7,84	8,37	8,21	8,29	8,26	8,28	ddnd	1
Glicosidos									
H 1'' (Ram)	H	4,43	4,73	4,63	--	--	--	m	--
--	K	3,85						s	--
--	I	4,03						S <sub>ancho</sub>	--
--	L	3,76						d	--
--	J	3,92						S <sub>ancho</sub>	--
--	M	1,98						m	--
H 6'' (Ram)	N	1,37	1,23	1,16	--	--	--	t	--

<sup>a</sup> CABRITA, 2000, <sup>b</sup> NAKAYAMA, 2004, <sup>c</sup> DOUGALL, 1998, <sup>d</sup> KOŠIR, 2002,

<sup>e</sup> ØYVIND, 2001, s= singlete, d=doblete, ddnd=doble doblete no definido

S<sub>ancho</sub>=singlete ancho no definido, m=multiplete, t=triplete

Figura 65. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina B (campo bajo).

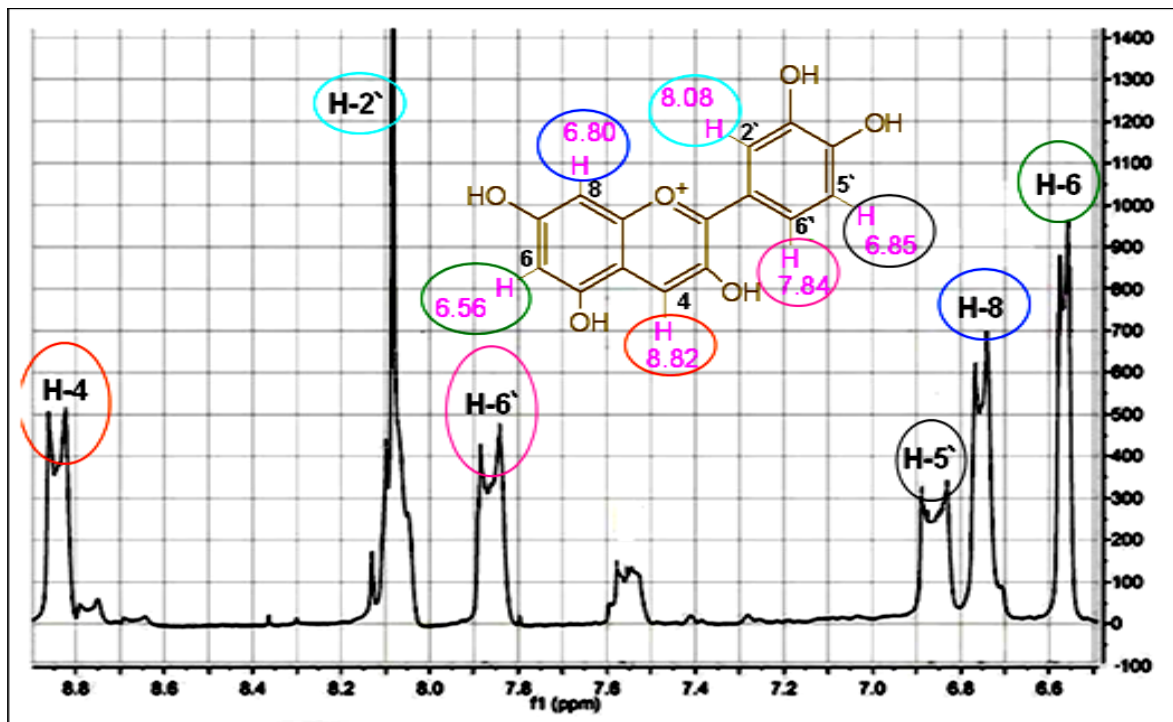


Figura 66. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la antocianina B (campo alto).

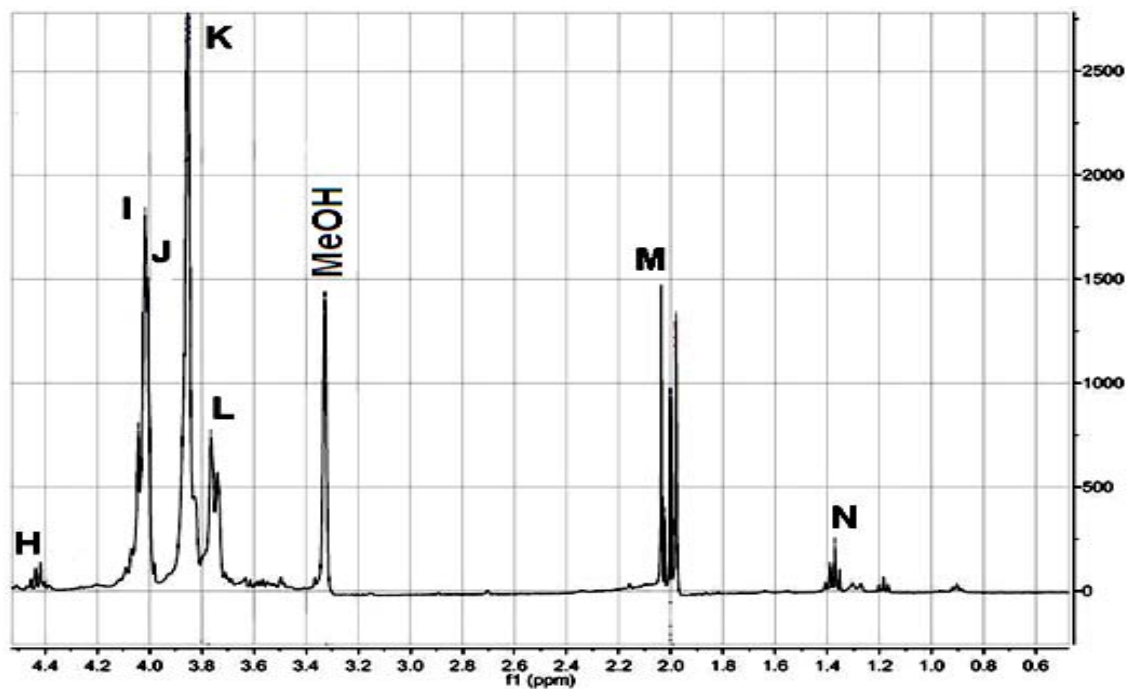
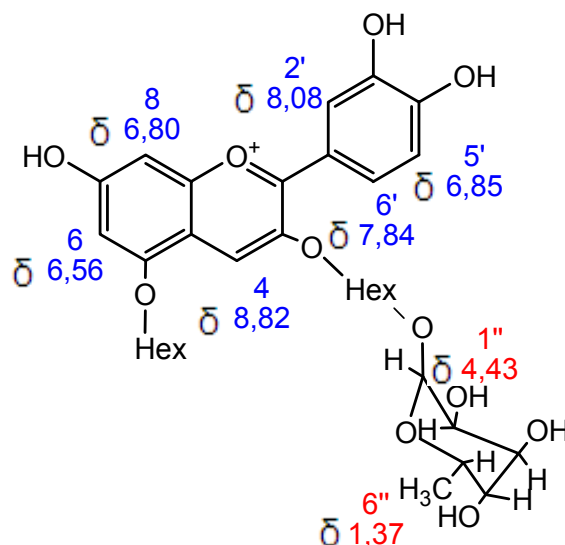


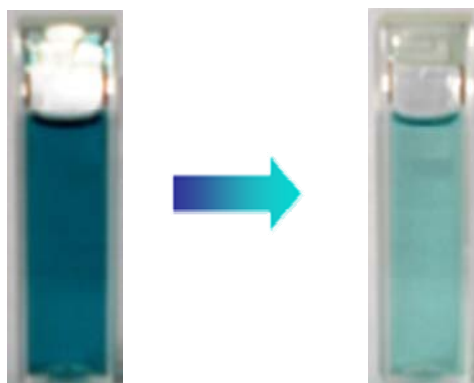
Figura 67. Estructura de la cianidina-3-O-hexosa-ramnosa-5-O-hexosa.



#### 4.2.5 Determinación de la capacidad antioxidante.

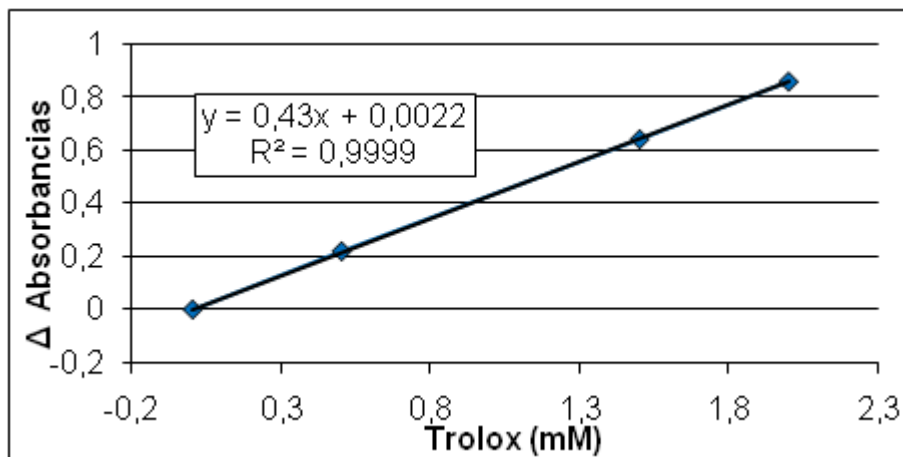
4.2.5.1 Método de  $ABTS^{+•}$ . Este método se basa en la decoloración del radical  $ABTS^{+•}$  por acción de un antioxidante (ver figura 68).

Figura 68. Cambio de color del radical  $ABTS^{+•}$  por acción de un antioxidante.



Para cuantificar la actividad antioxidante de cada muestra se empleó una curva de calibración utilizando Trolox como patrón (ver gráfica N° 6 y anexo B).

Gráfica N° 6. Curva de calibración para el método de ABTS<sup>•+</sup>.



Con la ecuación de la recta de la gráfica N° 6 se calculó la concentración de Trolox (mM), la capacidad antioxidante equivalentes al trolox (TEAC) y el porcentaje de inhibición para el ácido ascórbico y los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP) (ver tabla N° 24).

a) Control del método con ácido ascórbico (AcA). Se utilizó AcA de referencia para verificar la linealidad del método utilizado (RE 1999). RE en 1999 reporta la concentración equivalente de trolox para el AcA igual a  $1,05 \pm 0,02$  mM, con un  $R^2 = 1$ .

En la tabla N° 24 se observa, el resultado promedio del TEAC para el ácido AcA ( $0,993 \pm 0,019$ ) y un  $R^2$  igual a 0,999, es decir que el método es lineal y los datos de las muestras son confiables, además la desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) son muy bajos (0,019 y 1,918 respectivamente) mostrando una alta repetitividad del método.

Los mM de Trolox resultan de la ecuación de la recta, el % de inhibición resulta de la ecuación mostrada en el apartado a) de la sección 3.3.2.4 y el TEAC se calculó con la siguiente fórmula:

$$TEAC = \frac{\text{mmol Trolox}}{\text{mmol AcA}}$$

De igual forma se realizó el cálculo para los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP) y para las antocianinas puras (B, C y D).

b) Resultados del método de ABTS<sup>+</sup> de los extractos CrC, CrP, XC y XP. Comparando los resultados del % de inhibición de la tabla N° 24; con respecto al AcA, los extractos CrC y CrP presentan menor actividad antioxidante y los extractos XC y XP una mayor actividad para la captura del radical libre. Esta comparación indica que los extractos XC y XP tienen una mayor actividad de capturar radicales libres que el AcA; ya que, presentan un porcentaje de inhibición de 1,9 y 1,6 veces mayor respectivamente.

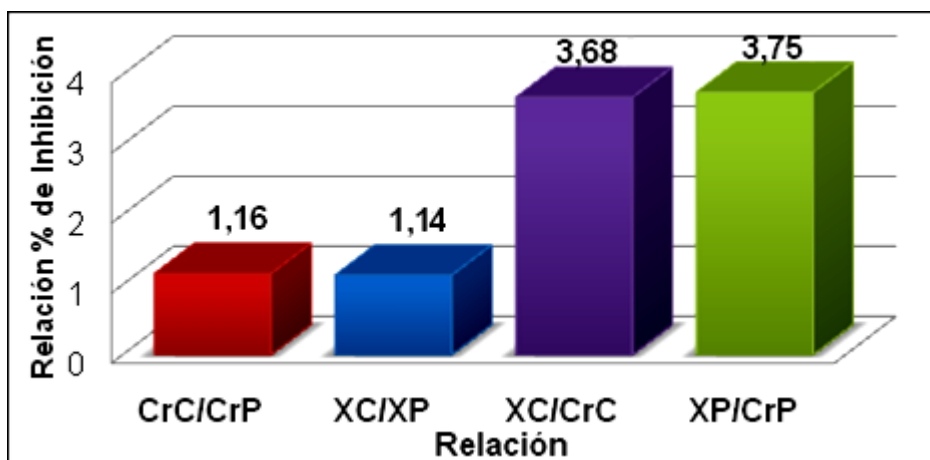
Entre los extractos crudos CrC, CrP y purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 (XC y XP) los que presentan mayor porcentaje de inhibición son los extractos CrC y XC; indicando en la cáscara una mayor concentración de compuestos antioxidantes que en la pulpa (ver gráfica N° 7).

Tabla N° 24. Resultados del método de ABTS<sup>+</sup> de los extractos de AcA, CrC, CrP, XC y XP.

Muestra <sup>a</sup>	Trolox <sup>b</sup>	TEAC <sup>c</sup>	% de Inhibición
CrC	0,50 ±0,03	14,73 ±0,78	22,90 ±1,21
CrP	0,43 ±0,02	13,31 ±0,69	19,72 ±1,01
XC	1,87 ±0,03	122,31 ±1,95	84,19 ±1,33
XP	1,64 ±0,11	71,52 ±4,64	73,96 ±4,79
AcA	0,99 ±0,02	5638,57±108,14 <sup>d</sup>	44,92 ±0,86

<sup>a</sup> Datos con ± DS de tres réplicas, <sup>b</sup> mM, <sup>c</sup> μmol Trolox/ g fruta, <sup>d</sup> μmol Trolox/ g AcA

Gráfica N° 7. Relación de % de inhibición.

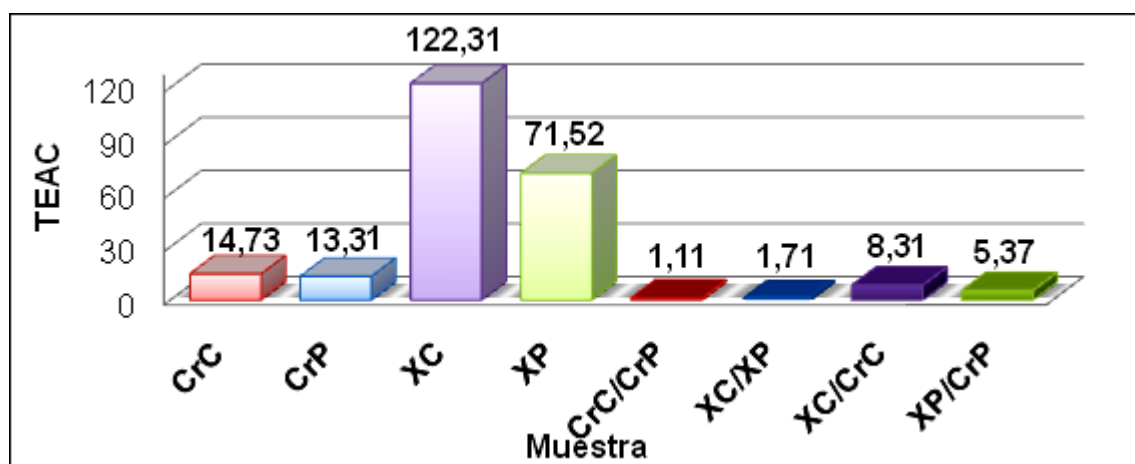


En la gráfica N° 8 se observa las relaciones de la actividad antioxidante de los diferentes extractos del mortiño; en donde, el extracto XC es más de 8 veces que el TEAC del extracto CrC y el extracto XP es más de 5 veces que el del extracto



CrP; indicando que las muestras purificadas por CC con amberlita XAD-7 tienen mayor actividad de capturar radicales libres que sus homólogos sin procesar. Estos resultados colocan al extracto purificado de mortiño como una buena fuente de compuestos antiradicales que pueden ser útiles para la industria farmacéutica y/o alimenticia.

Gráfica N° 8. Relación de TEAC de los diferentes extractos del mortiño.



En el caso de las antocianinas purificadas por CLAE tipo preparativo cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y Luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D), el % de inhibición es mayor que el del AcA (ver tabla N° 24.) indicando que son buenos antioxidantes. El orden de antioxidantes, para este caso, es C, D y B (ver tabla N° 25).

Comparando los % de inhibición de la tabla N° 21 y 22, se observa que los extractos purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), son mejores antioxidantes que las antocianinas puras, debido a que en estos extractos se encuentran más compuestos polifenólicos ocasionado por el enriquecimiento en CC usando amberlita XAD-7.

Tabla N° 25. Resultados del método de ABTS<sup>++</sup> para las antocianinas puras.

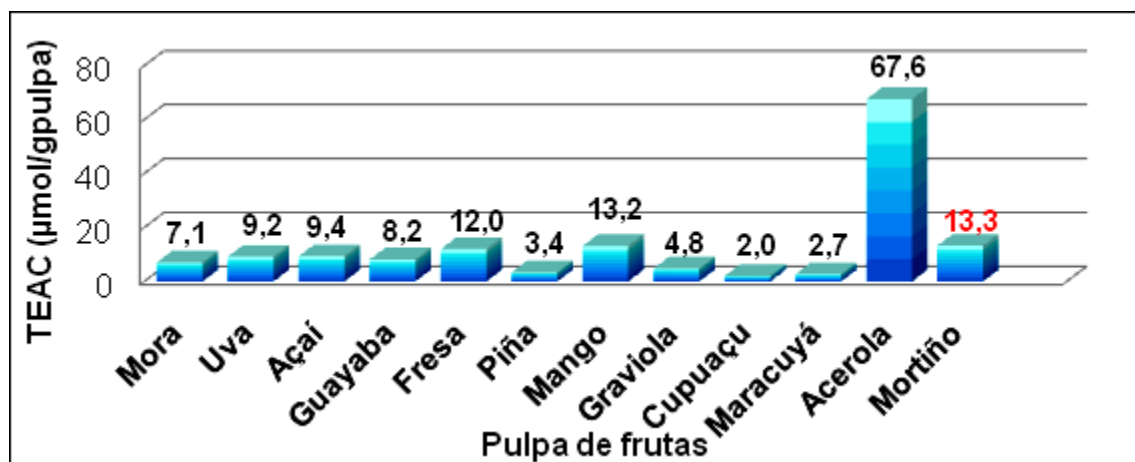
Muestra <sup>a</sup>	Trolox <sup>b</sup>	TEAC <sup>c</sup>	% de Inhibición
B	1,14 ±0,01	0,37 ±0,003	51,55 ±0,42
C	1,39 ±0,01	0,42 ±0,004	62,86 ±0,53
D	1,27 ±0,01	0,31 ±0,002	57,49 ±0,38

<sup>a</sup> Datos con ± DS de tres replicas, <sup>b</sup> mM, <sup>c</sup> μmol Trolox/ g liofilizado

Comparando el fruto del mortiño con otras frutas tropicales, se observa que tiene mayor actividad antioxidante (ver gráfica N° 9), siendo superada solo por la

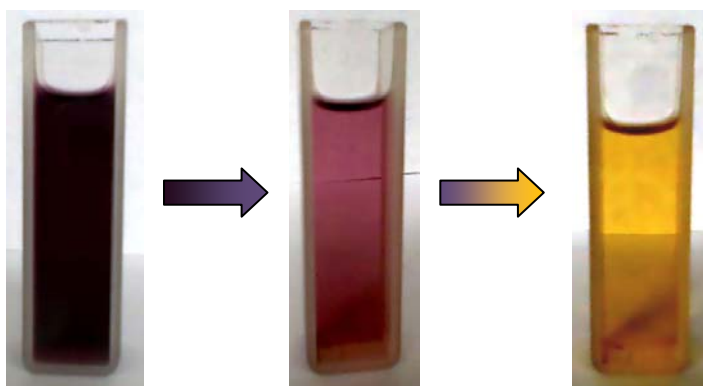
acerola (KUSKOSKI, 2005). La pulpa del cupuaçu es la que presenta menor TEAC con respecto al extracto del mortiño (aproximadamente 7 veces menor).

Gráfica N° 9. Comparación de los resultados de TEAC entre extractos crudos de pulpa de frutos tropicales.



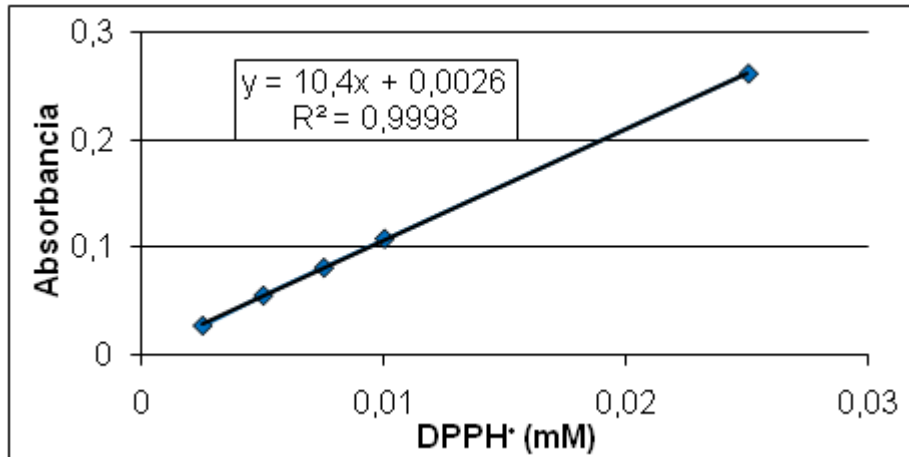
4.2.5.2 Método de DPPH<sup>•</sup>. Este es un método de decoloración del radical DPPH<sup>•</sup> por acción de un antioxidante (ver figura 69).

Figura 69. Cambio de color del radical DPPH<sup>•</sup> por acción de un antioxidante.



Para determinar la concentración del DPPH<sup>•</sup> remanente de la reacción con los extractos, se realizó una curva da calibración con el radical (ver gráfica N° 10 y anexo C).

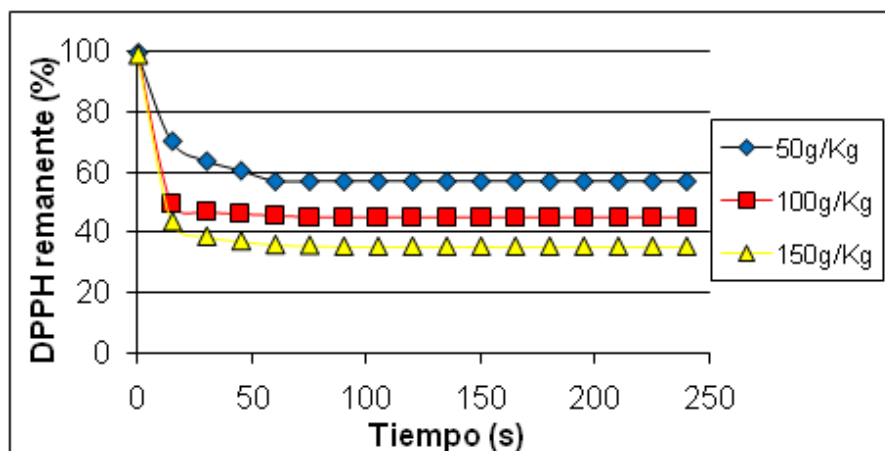
Gráfica N° 10. Curva de calibración del radical del método DPPH'



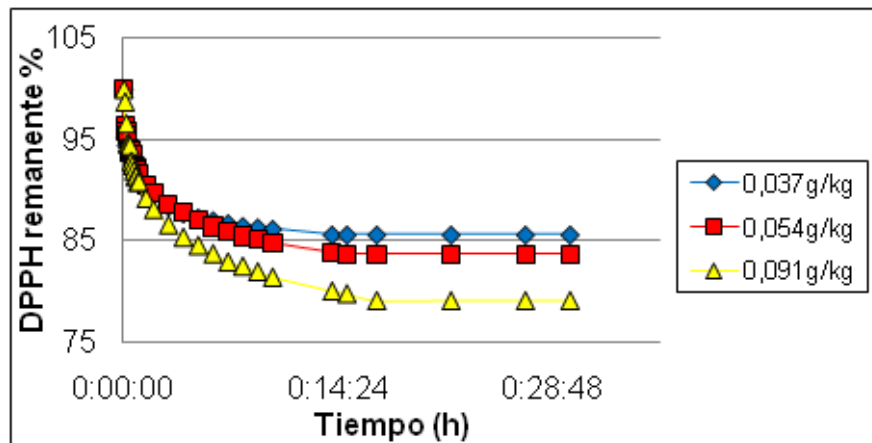
Como antioxidante de referencia, se utilizó ácido ascórbico (AcA). En la gráfica N° 11 se observa el DPPH' remanente (%) respecto al tiempo para las muestras de ácido ascórbico (AcA), los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados con cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC), pulpa (XP) y para las antocianinas puras cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosararnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D).

Gráfica N° 11. Gráficas de los DPPH' remanentes versus el tiempo para cada muestra tratada.

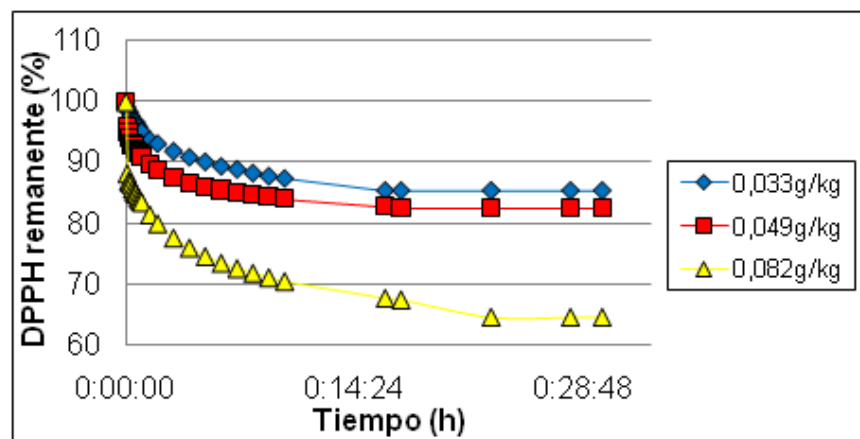
a) Gráfica del patrón de AcA.



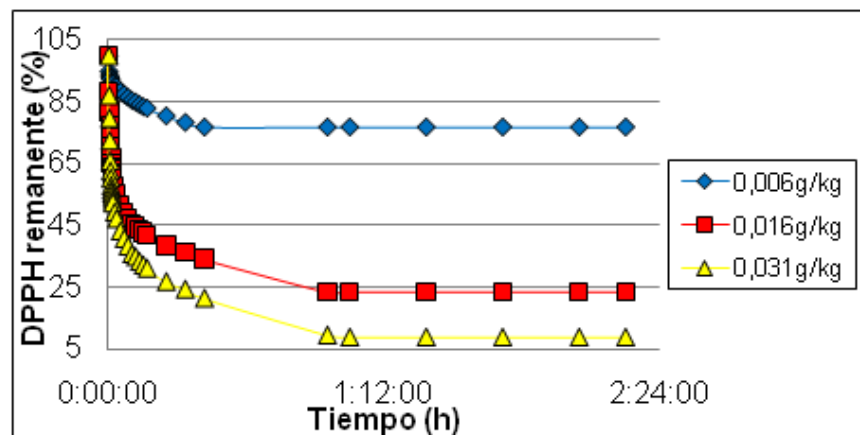
b) Gráfica para el extracto CrP.



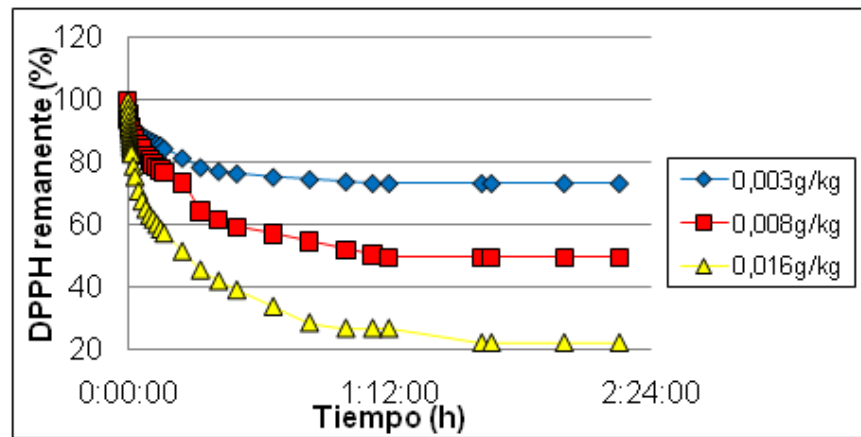
c) Gráfica para el extracto CrC.



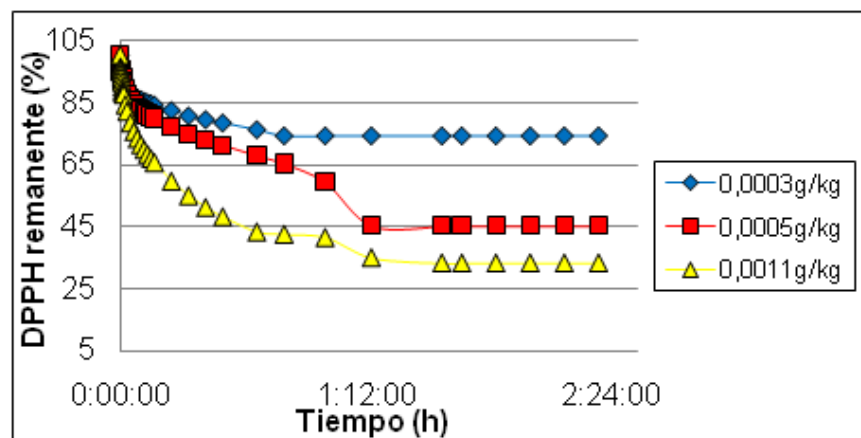
d) Gráfica para el extracto XP.



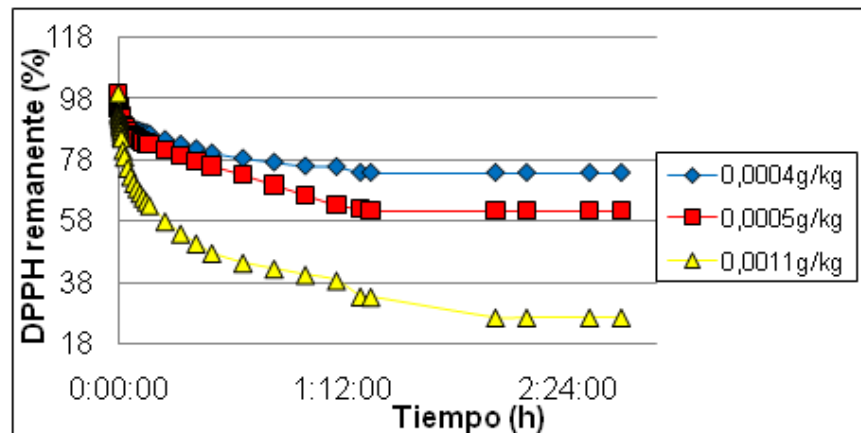
e) Gráfica para el extracto XC.



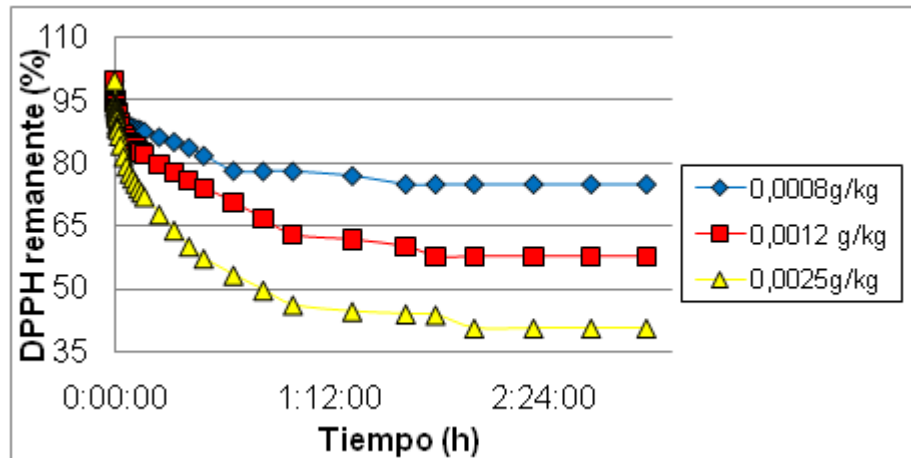
f) Gráfica para la antocianina B.



g) Gráfica para la antocianina C.



h) Gráfica para la antocianina D.



Con base en la gráfica N° 11 (a, b, c, d, e, f, g y h) se observa un comportamiento similar; en donde, a mayor concentración de antioxidante menor será el porcentaje de DPPH<sup>•</sup> remanente y el tiempo para que la reacción se estabilice, será mayor.

En la tabla N° 26 se muestra los tiempos de estabilización de la reacción, % de DPPH<sup>•</sup> remanente y % de inhibición para el ácido ascórbico (AcA), los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados con cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC), pulpa (XP) y para las antocianinas puras cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D).

Tabla N° 26. Tiempo de estabilización de la reacción del antioxidante con el DPPH<sup>\*</sup>.

Muestra	Tiempo <sup>a</sup>	Concentración <sup>b</sup>	% DPPH <sup>*</sup> <sub>rem</sub>	% Inhibición
AcA	60	50	56,98	26,51
	75	100	45,34	34,38
	90	150	35,27	41,07
CrP	840	0,037	85,68	14,27
	900	0,054	83,75	16,19
	1020	0,091	79,11	20,82
CrC	980	0,033	85,31	14,64
	1040	0,049	82,46	17,48
	1380	0,082	64,46	35,42
XP	1500	0,006	76,86	23,07
	3430	0,015	23,42	76,35
	3780	0,031	8,50	91,22
XC	4040	0,003	73,40	30,39
	4310	0,008	49,65	52,81
	5840	0,016	22,25	78,69
B	2880	3 x10 <sup>-4</sup>	74,44	25,94
	4410	5 x10 <sup>-4</sup>	45,34	54,76
	5650	1,1 x10 <sup>-3</sup>	33,33	66,67
C	4660	4 x10 <sup>-4</sup>	73,87	26,12
	4860	5 x10 <sup>-4</sup>	61,79	38,15
	7260	1,1 x10 <sup>-3</sup>	26,65	73,15
D	5880	8 x10 <sup>-4</sup>	74,90	25,03
	6480	1,2 x10 <sup>-3</sup>	57,74	42,14
	7260	2,5 x10 <sup>-3</sup>	40,58	59,24

<sup>a</sup> En segundos, <sup>b</sup> g de antioxidante/kg de DPPH<sup>\*</sup>

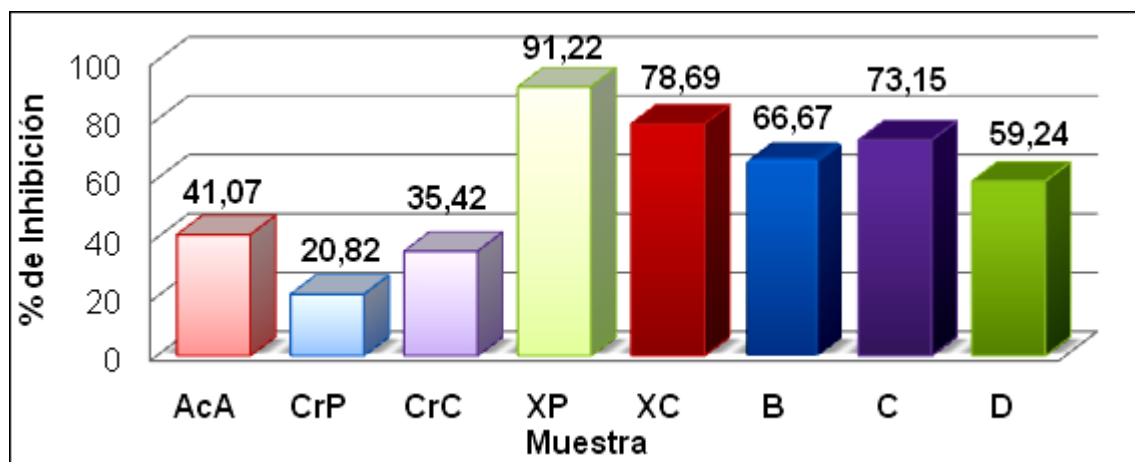
El AcA, presenta un mayor % de inhibición que los extractos crudos, pero menor que los extractos purificados en CC con la amberlita XAD-7, sin embargo la reacción tarda mas tiempo en estabilizarse para estos extractos. Siendo el AcA eficaz, los extractos XC y XP eficientes y los extractos CrP y CrC menos eficientes y menos eficaces que el AcA y los extractos XC y XP, debido a que tardan mucho tiempo en estabilizarse y no proporcionan un porcentaje (%) de inhibición alto.

En el caso de las antocianinas cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D), estas presentan un % de inhibición mayor que el AcA pero solo a concentraciones altas y en tiempos de reacción muy prolongados, siendo estos

extractos eficientes en la captura de un radical, pero menos eficaces que los extractos CrC, CrP, XC y XP.

En la gráfica N° 12 se observa que el extracto con mayor % de inhibición es el XP (91,218 %), el de menor % es el extracto CrP (20,816 %) y entre las antocianinas puras la que presentó el mayor % de inhibición fue la C (73,147 %). Se debe tener en cuenta que esta comparación es independiente del tiempo de reacción.

Gráfica N° 12. Porcentaje de inhibición de las muestras en la mayor concentración de los extractos AcA, CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.



La tabla N° 27 muestra la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración del radical a la mitad ( $EC_{50}$ ), el tiempo necesario ( $T_{EC_{50}}$ ) y la eficiencia del antioxidante (EA) para el ácido ascórbico (AcA), los extractos crudos de cáscara (CrC), pulpa (CrP), purificados con cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC), pulpa (XP) y para las antocianinas cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D).

Tabla N° 27. Parámetros calculados de las diferentes muestras para el método de DPPH\*.

Parámetro	Muestra							
	AcA	CrP	CrC	XP	XC	B	C	D
$EC_{50}^a$	74,90	0,40	0,14	0,01	0,01	$5,94 \times 10^{-4}$	$6,59 \times 10^{-4}$	$1,82 \times 10^{-3}$
$T_{EC_{50}}^b$	1,16	30,22	54,19	40,57	77,90	73,07	97,23	114,34
$EA^c$	0,01	0,08	0,13	2,61	1,67	23,05	15,60	4,81

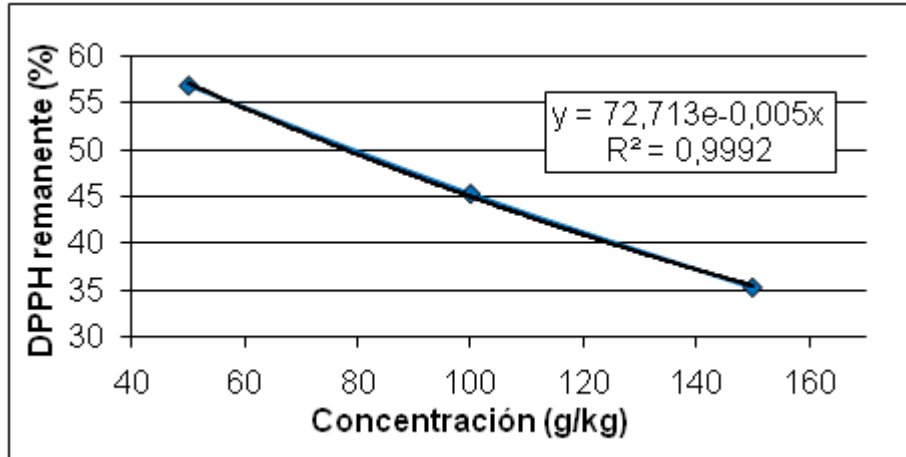
<sup>a</sup> g antioxidante/ kg de DPPH\*, <sup>b</sup> En minutos, <sup>c</sup> kg DPPH\*/g antioxidante\*min

La EA para el AcA se calculó a partir de las gráficas N° 13 y 14, así (ver gráficas en el anexo D de los extractos, CrC, CrP, XC, XP, B, C y D):



Primero se graficó el % DPPH• remanente contra la concentración de la muestra:

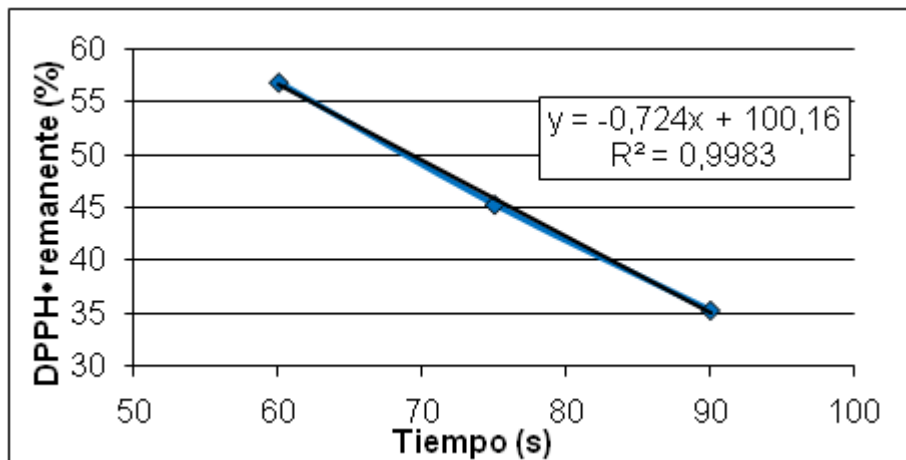
Gráfica N° 13. EC<sub>50</sub> para el AcA.



Con la ecuación de esta gráfica se calcula la concentración de antioxidante que necesario para reducir la concentración del radical a la mitad (EC<sub>50</sub>).

Después se graficó el % DPPH• remanente contra el tiempo que tarda la reacción en estabilizarse:

Gráfica N° 14. T<sub>EC50</sub> para el AcA.

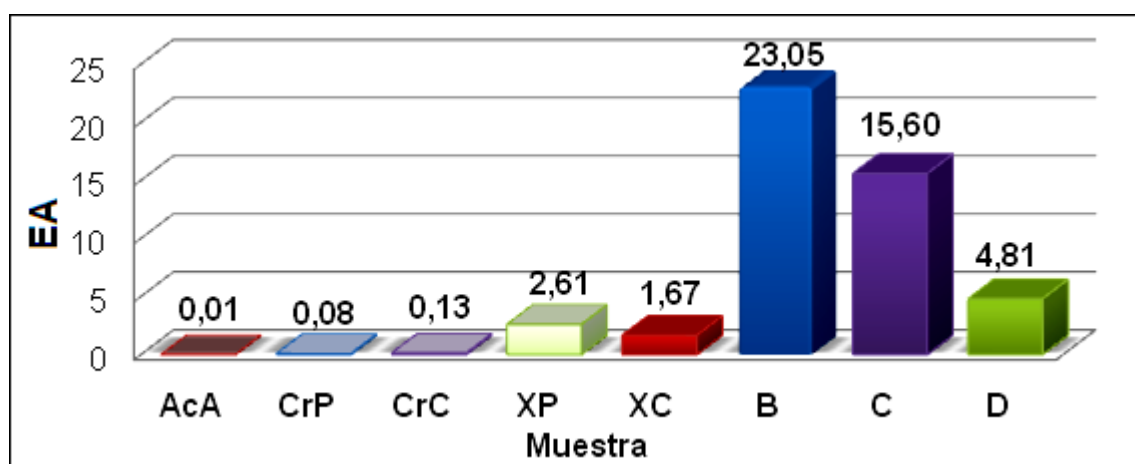


Con la ecuación de esta gráfica se calcula el tiempo que tarda el antioxidante para reducir la concentración del radical a la mitad en minutos (T<sub>EC50</sub>).

Hallados la concentración ideal y el tiempo que tardaría la reacción, se calculó la eficiencia del antioxidante (EA) para el AcA (ver apartado b) de la sección 2.3.2.4). De igual forma se calculó el EA para los extractos CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.

El extracto que presentó una mayor EA es el XP (2,61) y el que presentó la menor EA fue el CrP (0,08). En el caso de las antocianinas puras la que presentó mayor EA fue la B (23,05) que a su vez es mayor que todos los extractos (ver gráfica N° 15). Esta comparación es dependiente del tiempo, en donde la antocianina B es la más eficaz debido a que tarda menos tiempo y necesita una concentración menor para disminuir en un 50 % la concentración de un radical libre como el DPPH<sup>•</sup>.

Gráfica N° 15. Eficiencia antiradical (EA).



4.2.6 Comparación de los análisis de antocianinas totales, fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.

En los extractos crudos de cáscara (CrC) y pulpa (CrP), la capacidad antioxidante de ABTS<sup>•+</sup> (TEAC) y DPPH<sup>•</sup> (EA) es baja, este resultado es coherente debido a que la concentración de fenoles totales (FT) y antocianos totales también es bajo (ver tabla N° 28).

Tabla N° 28. Comparación de AT, FT y ABTS<sup>+</sup>, DPPH<sup>\*</sup> de los extractos CrC, CrP, XC, XP, B, C y D.

Muestra	Antocianinas totales		Fenoles Totales <sup>c</sup>	ABTS <sup>+</sup>	DPPH <sup>*</sup>
	Monoméricas <sup>a</sup>	Poliméricas <sup>b</sup>		TEAC <sup>d</sup>	EA <sup>e</sup>
CrP	36,12	2,86	281,64	13,31	0,08
CrC	65,07	1,99	352,16	14,73	0,13
XP	172,56	8,42	2009,30	71,52	2,61
XC	637,06	4,60	3384,49	122,31	1,67
B <sup>d</sup>				0,36	23,05
C <sup>d</sup>				0,42	15,60
D <sup>d</sup>				0,31	4,81

<sup>a</sup> mg Cy-3-Glu/ L, <sup>b</sup> %, <sup>c</sup> mg ácido gálico/100g fruta, <sup>d</sup> μmol Trolox/ g fruta, <sup>d</sup> μmol Trolox/ g liofilizado, <sup>e</sup> g antioxidante/ kg de DPPH<sup>\*</sup>

En los extractos purificados por cromatografía de columna (CC) con amberlita XAD-7 de cáscara (XC) y pulpa (XP), la constante observada en los análisis de AT, FT y TEAC es que el extracto XC presenta una mayor cantidad de AT, FT y TEAC que el extracto XP, sin embargo el extracto XP presenta una mayor EA que el XC, esto se debe a que en la metodología del DPPH<sup>\*</sup> se tiene en cuenta el tiempo de reacción y concentraciones ideales en las cuales la concentración del radical se ve disminuido en un 50 %. La capacidad antioxidante que presentan estos extractos es alta debido que presentan una gran cantidad de FT y de AT monoméricas por el enriquecimiento de los extractos por CC con amberlita XAD-7.

Haciendo una comparación de los métodos de ABTS<sup>+</sup> y DPPH<sup>\*</sup> en el caso de las antocianinas cianidina-n-O-hexosa-n-O-hexosa-ramnosa (B) cianidina-n-O-pentosa-n-O-hexosa (C) y luteolinidina-n-O-metilpentosa-O-hexosa-n-O-hexosa (D), las antocianinas B y C presentaron la mejor actividad antioxidante en los método de DPPH<sup>\*</sup> y ABTS<sup>+</sup> respectivamente y la antocianina D presentó la menor actividad antioxidante en ambos métodos.

## 5. CONCLUSIONES.

El fruto de mortiño presenta una alta concentración de antocianinas monoméricas, de fenoles totales y una concentración baja de antocianinas poliméricas, por lo que facilitan la purificación con técnicas como CLAE tipo preparativo.

En la pulpa se identificaron tentativamente por medio de las técnicas de RMN  $^1\text{H}$  y CLAE-EM, las antocianinas cianidina-O-hexosa-O-ramnosa-O-hexosa y la cianidina-3-O-glucosa las cuales se encuentran igualmente en la cáscara. Esto se confirmó con análisis de CLAE tipo analítico y espectros de UV-Vis.

Por medio del método del pH sustractivo, se semicuantificaron las antocianinas poliméricas del fruto del mortiño lo que demuestra que la concentración de este tipo de compuestos es de alrededor del 10 %, lo que facilitó la purificación de las antocianinas monoméricas por medio de CLAE tipo preparativo.

Los extractos de la cáscara del mortiño, mostraron una mayor cantidad de antocianinas totales, fenoles totales y una mejor capacidad antioxidante (TEAC) que los extractos de la pulpa.

El extracto purificado de la pulpa por cromatografía de columna (CC) usando amberlita XAD-7, fue mejor antioxidante (método DPPH) frente a su homólogo de la cáscara.

Realizando una comparación de los fenoles totales (FT) y antocianinas totales monoméricas (AT) de la pulpa del mortiño con otros frutos, se encontró que relativamente se ubica entre las frutas que tienen mayor contenido de estos compuestos. De igual forma, ésta fracción tiene una buena TEAC en comparación con los mismas pulpas.

## 6. RECOMENDACIONES

Realizar un estudio acerca de la estabilidad de los pigmentos tipo antocianina presentes en el mortiño, ya que este fruto presentó una buena cantidad de antocianinas totales, fenoles totales y una buena capacidad antioxidante para la captura de radicales libres a nivel *in vitro*.

Realizar análisis *in vivo* de capacidad antioxidante de fracciones puras con el fin de tener un mejor acercamiento acerca de las propiedades nutraceuticas de este fruto.

Para evitar polimerizaciones y degradaciones de las antocianinas se debe realizar las extracciones, purificaciones y caracterizaciones de los pigmentos en el menor tiempo posible.

Es necesario buscar un método de purificación en el que procese mayor cantidad de muestra con el fin de tener fracciones puras suficientes para un análisis completo por RMN.

## BIBLIOGRAFÍA

ARJONA, Beatriz. El Mortiño o Agrás (*vaccinium meridionale*, ericacea) Como Planta Promisoria en la Región del Parque Arví. Medellín: Universidad Nacional, sede Antioquia. 2001, 15 p.

AGROINFO, Métodos Oficiales de Análisis de Vinos. (En línea). Bogotá (Consultada el 10 de Noviembre de 2006) disponible en la dirección electrónica [http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis\\_vinos7.asp](http://www.infoagro.com/viticultura/vino/analisis_vinos7.asp)

BADUI S. Química de los alimentos. Tercera edición. Alambra Mexicana. México. 1999 648 p.

BRIDLE P., Timberlake C. F. Anthocyanins as Natural Food colours- selecte aspects. *Food chemistry*. 1997, (58) p. 103-109.

BRITTON, George. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J*. 1995 (9) p.1551-1558.

CABRITA L., Frøystein N., Andersen Ø., Anthocyanin trisaccharides in blue berries of *Vaccinium padifolium*. *Food Chemistry* 69, 2000. p. 33-36

CALVO, Miguel. Bioquímica de los alimentos (En línea). Madrid: (Consultada el 20 de octubre del año 2006) disponible en la dirección electrónica: <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/pigmentos/otroscolores.html>

CEDILLO-LÓPEZ, Coatzin D., Cruz-Salgado M. y Beltrán-Orozco M. Identificación de los Espectros de antocianinas del Fruto del Cerezo Dulce (*Prunus Avium*) variedad sweetheart, en diferentes condiciones de extracción. VII congreso Nacional de Ciencia de Alimentos y III foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Guanajuato Gto. 2004. p. 351-357

CHEN P., Chu S., Chiouc H., Kuo W., Chiang C., HSIEH Y., Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyaniding 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Letters* 2006 (235) p.248–259

CURTIS H. y Barnes N., Biología, Quinta Edición. Ed. Médica panamericana, Buenos Aires, 1993 1286 p.

De la RUA, Adelaida, El poder curativo de las frutas. Intermedio Editores. Corantioquia. 1999. 135 p.

DELGADO, F. y Paredes, O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. *CRC Press*, 2003. 327 p.

DELGADO, F., Jiménez, A., Paredes, O. Natural pigments: Carotenoids, antocyanins and betalains. Characteristics, biosíntesis, procesing and stability. *Grito Rev. Food Sci. Nut*, 2000 (40) p. 173-289.

DEWICK Paul, Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach, second edition, John Wiley & Sons Inc, 2002, 515 p.

DOUGALL D., Baker D., Gakh E., Redus M., WHITTEMORE N. Anthocyanins from wild carrot suspension cultures acylated with supplied carboxylic acids. *Carbohydrate Research* 310. 1998, pag 177-189

EINBONDA L. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry* 2003, (84) p. 23–28.

GALVANO F., La Fauci L., Lazzarino G., Fogliano V., Ritieni A., Ciappellano S., Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004 (15) p.2 -11

GIUSTI M. and Wrolstad R.. Characterizations and measurement anthocyanins by UV-Visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical Chemistry* (2001). Ed John Wiley & Sons, Inc.

JARAMILLO, Juan. Procesos industriales para elaboración de saborizantes de mora para yogurt, pulpa de mora y mortiño. Área de Investigación, valor agregado a la producción y agroindustria rural. CORPOICA, 2006. (En línea) (Consultada el 13 de mayo del año 2008) disponible en la dirección electrónica <http://www.corpoica.org.co/Ofertas/ofertas2.asp>

KALLITHRAKA S., Mohdaly A., Makris D, Kefalas P., Determination of major anthocyanin pigments in Hellenic native grape varieties (*Vitis vinifera* sp.): association with antiradical activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, N° 18. 2005, p. 375–386

KOŠIR I. y Kidrič J. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta* 458. 2002, p 77–84

KURT B. G. Torssell, Natural Product Chemistry, second Edition, Sweden:Apotekarsocieten. 1997, 480 p.

KUSKOSKI M., Asuero A., García-Parilla C., Troncoso A., Fett R. Actividad Antioxidante De Pigmentos Antociánicos, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2004, 24(4) p. 691-693.

KUSKOSKI M., Asuero A., Troncoso A., Mancini-Filho J., Fett R.. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 2005. 25(4) p. 726-732

LIANG Xiao-Tian y Fang Wei-Shuo. Medicinal Chemistry of Bioactive Natural Products, second edition. Wiley-interscience John Wiley & Sons Inc, 2006, 475 p.

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

LUQUE, Ernesto. Bioquímica descriptiva. Universidad de Nariño. Pasto. 1995, 274 p.

MANETAS Yiannis. Why some leaves are anthocyanic and why most anthocyanic leaves are red?. *Flora* 2006 (201) p.163–177

MARTÍNEZ-FLÓREZ, J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002 (XVII)(6) p.271-278

MONTORO P., Tuberoso C., Perrone A., Piacente S., Cabras P., Pizza C., Characterisation by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of anthocyanins in extracts of *Myrtus communis* L. berries used for the preparation of myrtle liqueur. *Journal of Chromatography A*. 2006 (1112) p. 232–240

NAKAYAMA M., Okada M., Taya-Kizu M., Urashima O., Kan Y., Fukui Y. and Koshioka M. Coloration and Anthocyanin Profile in Tulip Flowers. *JARQ* 38 (3), 2004 pag. 185–190

ØYVIND, M. and Fossen T. Characterization of anthocyanins by NMR. Department of Chemistry, University of Bergen, Allegt. 41, N-5007 Bergen, Norway. 2001

PÉREZ Arbelaez, *Planta Útiles de Colombia*, Tercera Edición. Víctor Hugo. 1990. 213 p.

PLAN DE DESARROLLO MUNICIPAL DE BUESACO 2004 – 2007, Alcaldía municipal, 2004.

POMAR F., Novo M y Masa A., Varietal differences among the anthocyanin profiles of 50 red table grape cultivars studied by high performance liquid chromatography. *Elsevier B.V.* 2005. 07.096 p. 34-41



PRIOR, R. y Cao, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.*, 1999 (27) p. 1173-1181

RAMIREZ-TORTOSA, C. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E depleted rats. *Free Rad. Biol. Med.* 2001 (31) p.1033-1037

RE R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 1999 (26) p. 1231–1237

REDDY AR. Scheffler B, Srivastava MN, Arvind K, Satyanarayan PV, Suresh N, Madan M., Chalcone synthase (*CHS*) gene in rice (*Oryza sativa* L.): expression and molecular mapping. Plant Genome IV, San Diego, California, USA. 1996, p. 341-352.

ROBERT W. Drust and Ronal E. Wrolstad. Separation and Characterization of anthocianins by HPLC. Current protocols in food analytical Chemistry. Ed John wiley & sons, Inc. 2001

ROLDÁN G., Velásquez L. y Machado T. Biología Integrada. Norma Bogotá 1984. 345 p.

SALAZAR, Edgar, Identificación y zonificación de los bosques del Parque Arqueológico y turístico de “El alto del Chocho”. Corantioquia. 1997.

SANCHEZ C., Larrauri J., A procedure to measure the anti-radical efficiency of polyphenols, instituto del frio, departamento de metabolismo y nutricion, consejo superior de investigaciones científicas, Journal of science food agriculture. UK 1998.

SARMA A., Sreelakshmi Y., Sharma R. Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation. Elsevier Science Ltd Vol 45 N° 4. 1997, p. 671-674

SARMA, A , Sharma, R. Anthocyanin-DNA copigmentation complex: mutual protection against oxidative damage. *Phytochemistry* 52. 1999 p. 1313–1318

SCORDINO M., Di Mauro A., Passerini A. and MACCARONE E. Adsorption of Flavonoids on Resins: Cyanidin 3-Glucoside. *J. Agric. Food Chem.* 2004, (52) p. 1965-1972.

SNODDERLY, D. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1995 (62) p.1448S-1461S.

TIAN Q., Giusti M., Stoner G, Schwartz S., Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *Journal of Chromatography A*. 2005, (1091) p. 72–82

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA (UDEA). Flavonoides. (En línea) Medellín: (consultada el 29 de septiembre del año 2006) disponible en la dirección electrónica: <http://huitoto.udea.edu.co/~farmacogfit/Flavonoides/>

VALLEJO, D. Fomento al mortiño (*Vaccinium meridionale*) como especie promisoría del Parque Regional Arví. Corantioquia. 2000.

VAN BUREN J. Fruit Phenolics. Capítulo 11 en *The Biochemistry of Fruits and their products*, Hulme, A.C. (Editor), Academic Press, Londres. 1970 p. 269 - 300.

VIRGLI E. Scaccini C., Packer L., Rimbach G., Cardiovascular disease and nutritional Phenolics. FL, USA. Ed, Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon M.. 2001 p. 88 - 99.

WROLSTAD R., Durst R. y Lee Jungmin. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science & Technology* 2005 (16) p. 423–428.

## ANEXOS

Anexo A. Datos para la curva de calibración para el método de Folin Ciocalteu.

Tabla N° 1. Datos para la curva de calibración.

Ácido gálico (ppm)	Absorbancia
50	0,071
100	0,139
150	0,208
500	0,672

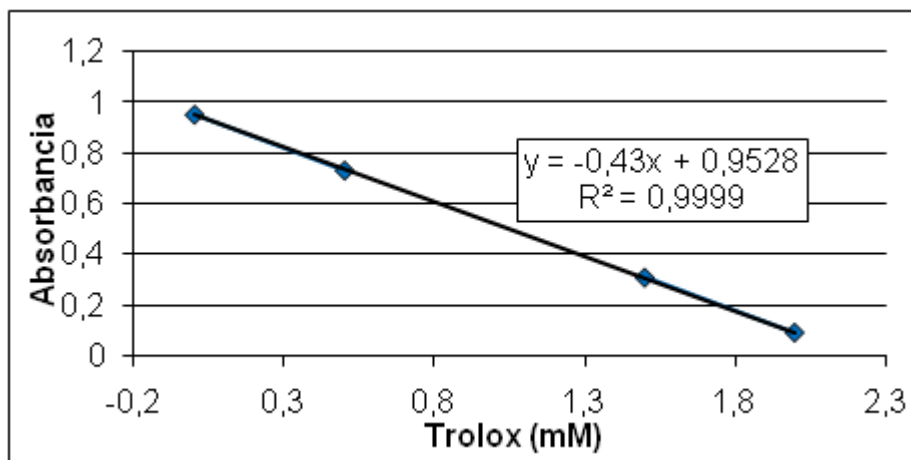
Anexo B. Datos para la curva de calibración del método de ABTS<sup>+</sup>

Tabla N° 1. Datos para la curva de calibración

Trolox (mM)	Absorbancia
0	0,955
0,5	0,817
1 <sup>a</sup>	0,689 <sup>a</sup>
1,5	0,341
2	0,281

<sup>a</sup> Dato descartado

Gráfica N° 1. Curva de calibración



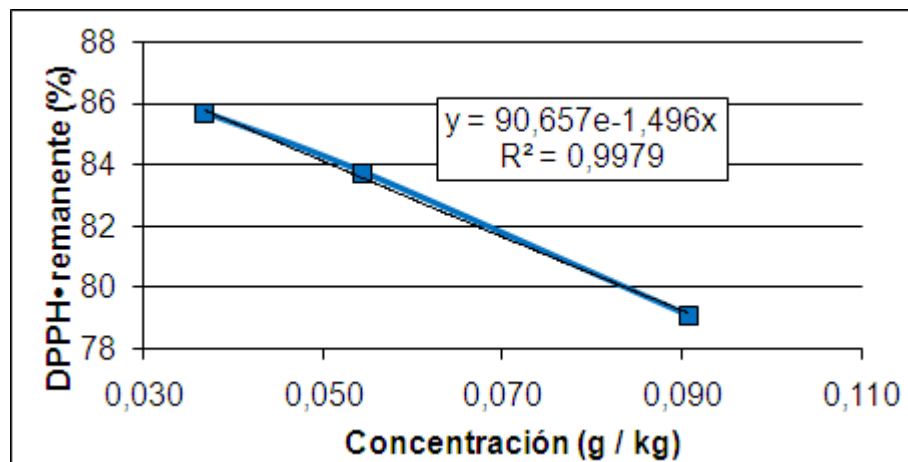
Anexo C. Datos para la curva de calibración del método de DPPH'

Tabla N° 1. Datos de la curva de calibración

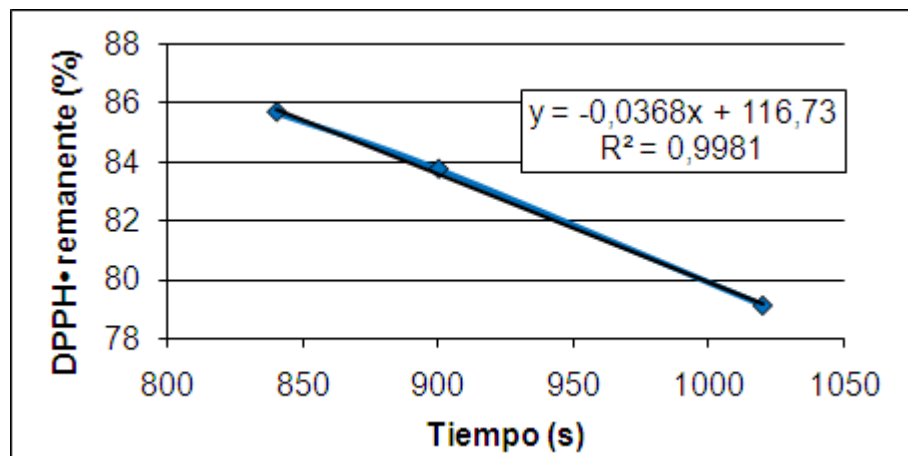
DPPH' [mM]	Absorbancia
$2,50 \times 10^{-3}$	0,027
$5,00 \times 10^{-3}$	0,055
$7,50 \times 10^{-3}$	0,081
$1,00 \times 10^{-2}$	0,108
$2,50 \times 10^{-2}$	0,262

Anexo D. Gráficas de  $EC_{50}$  y  $T_{EC50}$  de cada muestra tratada por el método de DPPH'

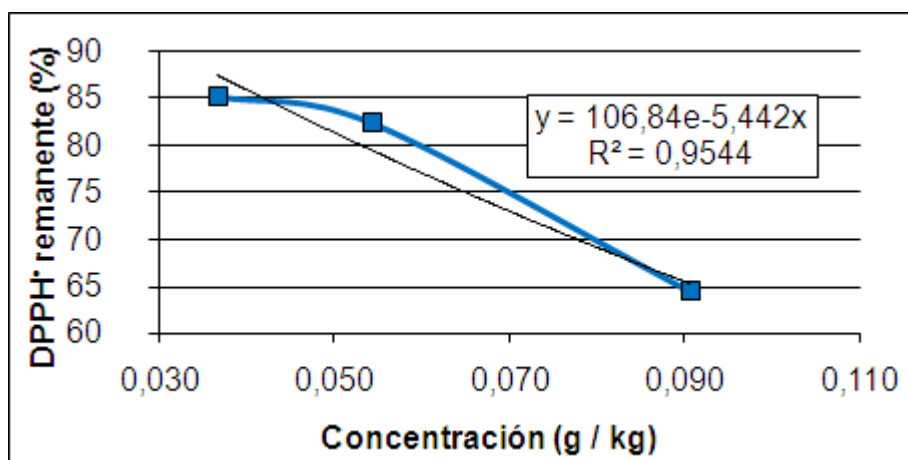
Gráfica N° 1.  $EC_{50}$  para el extracto CrP.



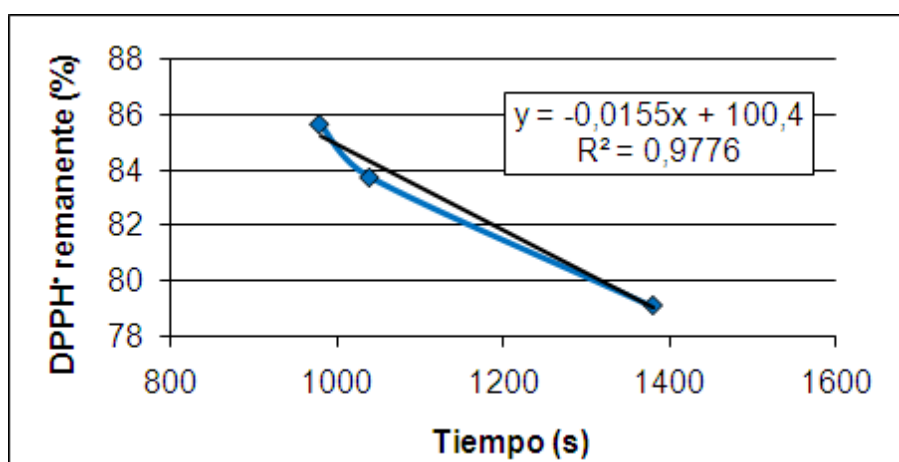
Gráfica N° 2.  $T_{EC50}$  para el extracto CrP.



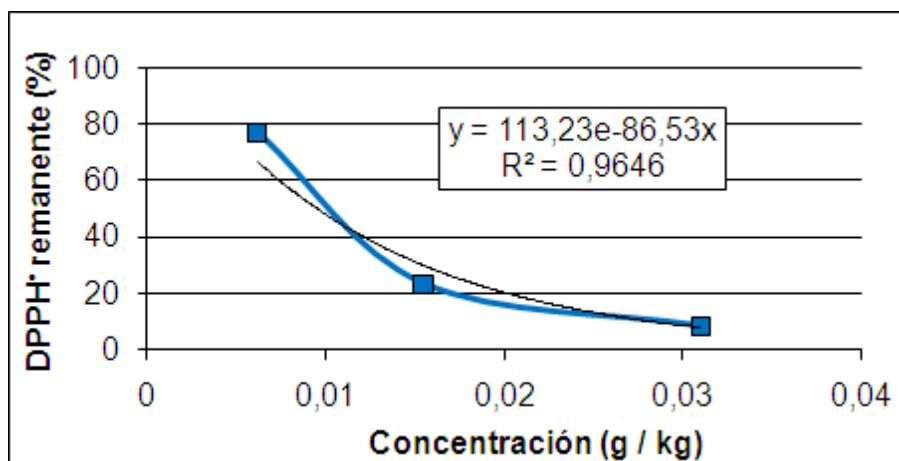
Gráfica N° 3. EC<sub>50</sub> para el extracto CrC.



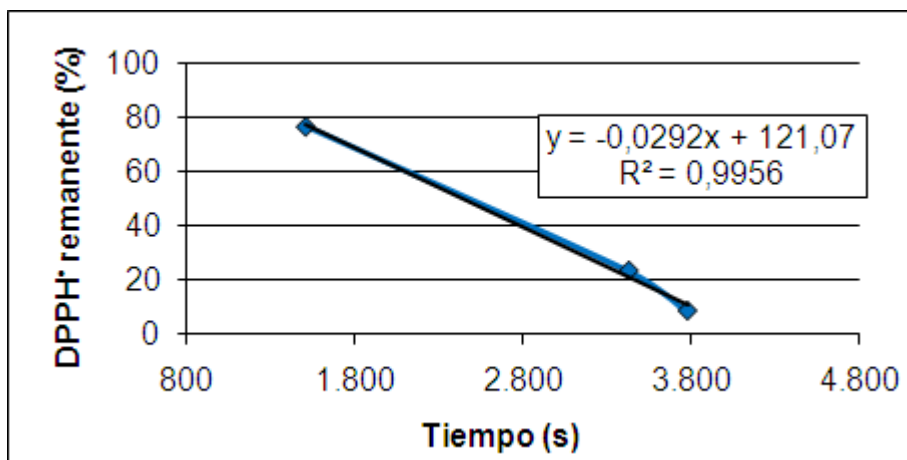
Gráfica N° 4. T<sub>EC50</sub> para el extracto CrC.



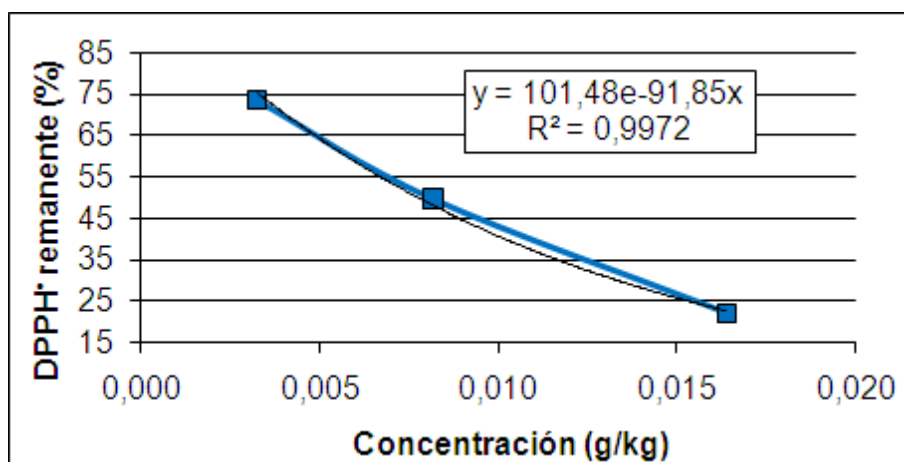
Gráfica N° 5. EC<sub>50</sub> para el extracto XP.



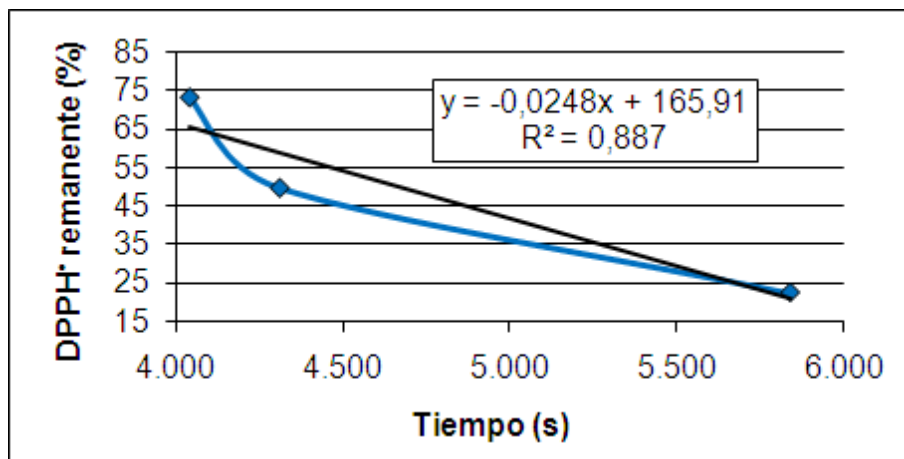
Gráfica N° 6. T<sub>EC50</sub> para el extracto XP.



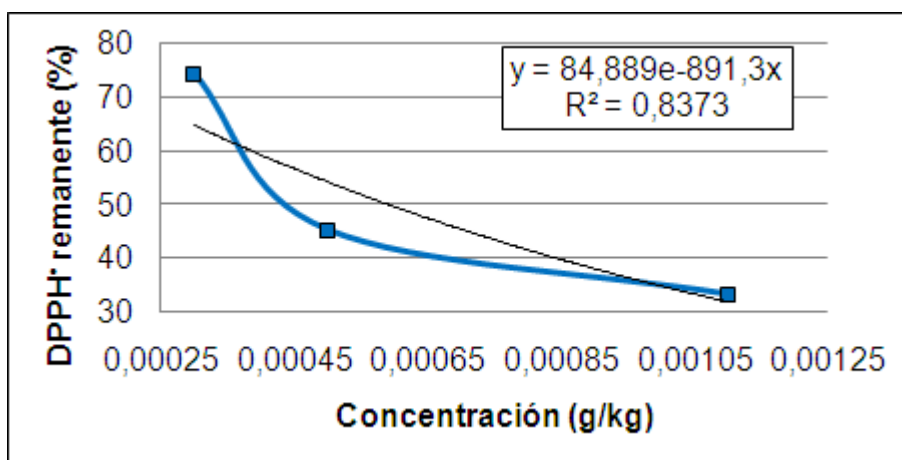
Gráfica N° 7. EC<sub>50</sub> para el extracto XC.



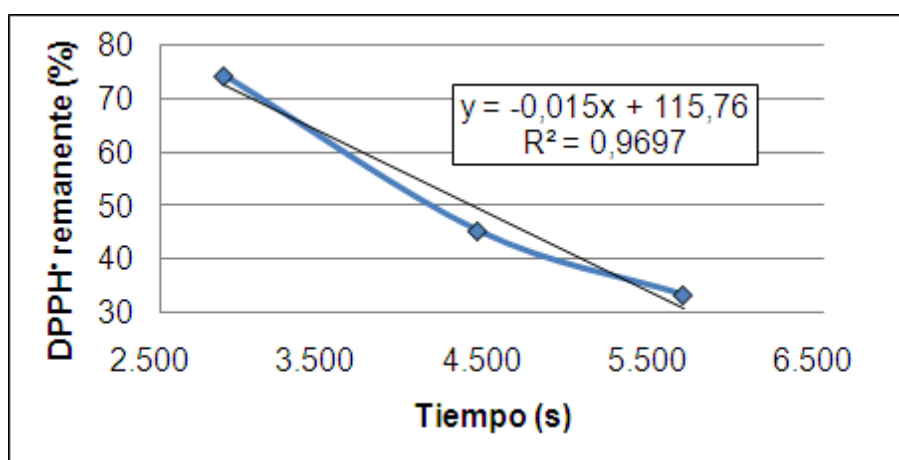
Gráfica N° 8. T<sub>EC50</sub> para el extracto XC.



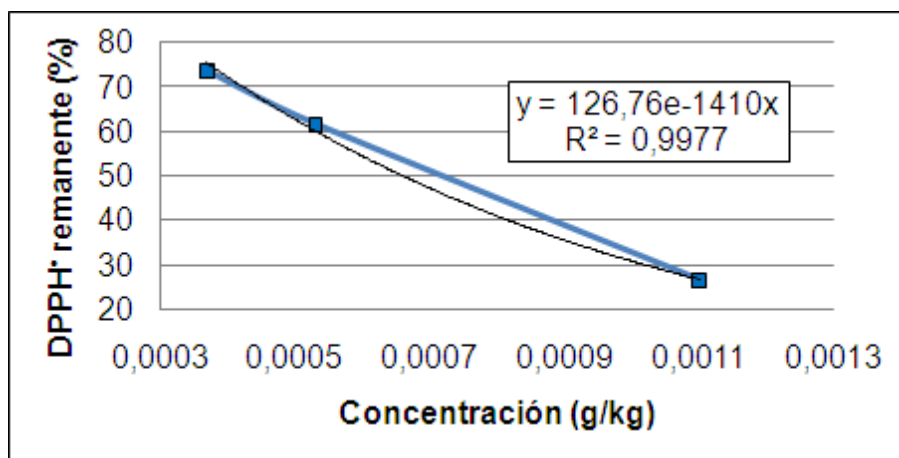
Gráfica N° 9. EC<sub>50</sub> para la antocianina B.



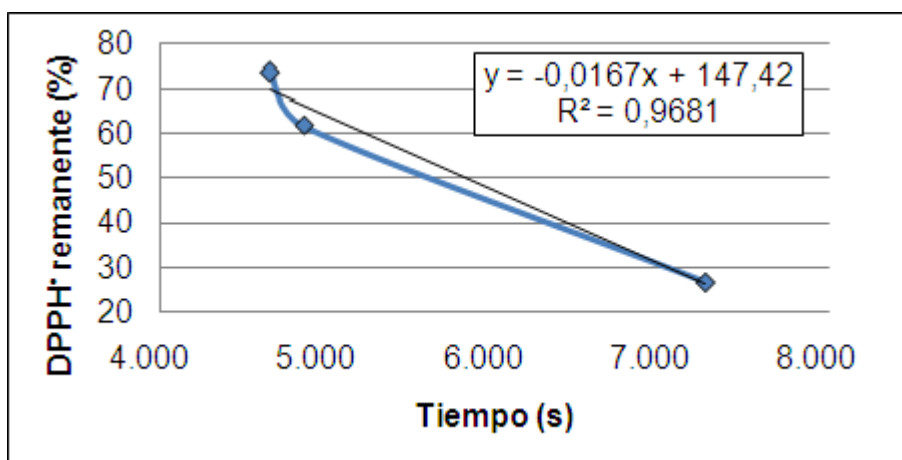
Gráfica N° 10. T<sub>EC50</sub> para la antocianina B.



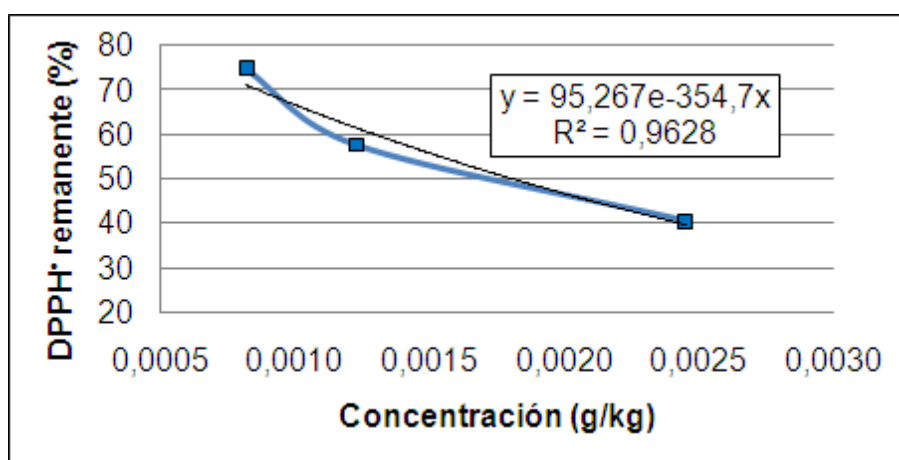
Gráfica N° 11. EC<sub>50</sub> para la antocianina C.



Gráfica N° 12. T<sub>EC50</sub> para la antocianina C.



Gráfica N° 13. EC<sub>50</sub> para la antocianina D.



Gráfica N° 14. T<sub>EC50</sub> para la antocianina D.

