

ESTUDIO QUÍMICO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS TIPO  
ANTOCIANINAS PRESENTES EN DOS ESPECIES DE FLORES SILVESTRES  
(*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

NATALIA ESTEFANÍA SOLARTE IMBACHI

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PASTO  
2019

ESTUDIO QUÍMICO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS TIPO  
ANTOCIANINAS PRESENTES EN DOS ESPECIES DE FLORES SILVESTRES  
(*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

NATALIA ESTEFANÍA SOLARTE IMBACHI

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de  
Químico

DIRECTOR  
NELSON HUMBERTO HURTADO GUTIÉRREZ  
Doctor en Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Colombia

UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PASTO  
2019

Las ideas y conclusiones aportadas en el presente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor.

Artículo 1° del acuerdo No. 324 del 11 de octubre de 1966, emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez  
Director

Jesús Antonio Cabrera Moncayo  
Jurado

William Hidalgo Bucheli  
Jurado

San Juan de Pasto, 27 de Junio de 2019

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme en todo momento por darme la fortaleza necesaria para afrontar cada obstáculo y por cada una de las nuevas oportunidades que me ha brindado.

A mis padres, hermanitas y sobrina por ser el motor que impulsa mi vida.

A mi director de tesis, Dr. Nelson Humberto Hurtado Gutiérrez por su confianza, orientación y apoyo en el desarrollo de mi proceso de investigación.

A la Universidad de Nariño y a la Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales (VIPRI) por el financiamiento de este trabajo.

A mis profesores del Departamento de Química de la Universidad de Nariño por todas sus enseñanzas y por ser parte de mi proceso formativo.

Al personal de la sección de laboratorios de la Universidad de Nariño, por su colaboración en el análisis de HPLC-PAD.

A la universidad de Sevilla-España especialmente al grupo de investigación “color y calidad en alimentos” dirigido por el Doctor Francisco José Heredia por en análisis de las muestras por UHPLC-ESI-MS y resultados del estudio colorimétrico.

A mis amigos y compañeros Estefanía Carrera, María Claudia, Andre Samper y Esteban Rosero. Así mismo a todos los integrantes del GIPIB por su compañerismo y colaboración.

## DEDICATORIA

*A Dios por todas las bendiciones recibidas, por ser el pilar de mi vida y la luz de mis días.*

*A mi madre Yamile, por haberme apoyado en todo momento, sobre todo en aquellos tiempos difíciles en donde no encontraba salida, por sus consejos, sus valores, su comprensión, por creer en mí y por la motivación constante, que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada por su amor.*

*A mi padre Napoleón por sus ejemplos de perseverancia y constancia con los cuales he forjado mi carácter y mi coraje para conseguir mis objetivos, pero sobre todo por sus sacrificios dándome siempre prioridad para que yo cumpla mis sueños.*

*A mis hermanitas Diana y María Alejandra por cada sonrisa, cada palabra de apoyo y amor incondicional.*

*A mi sobrinita y ahijada Isabella por alegrar mis días.  
¡Eres mi pedacito de cielo!*

*¡Ustedes son mi motivación más grande!*

*Natalia Estefanía Solarte Imbachi*

## RESUMEN

En este trabajo de investigación se aislaron, cuantificaron e identificaron los pigmentos tipo antocianinas y flavonoles presentes en dos variedades de flores silvestres (*Tibouchina mollis* y *Tibouchina urvilleana*) del Departamento de Nariño.

El estudio de los resultados mostraron que el extracto crudo de *Tibouchina urvilleana* tiene un mayor contenido de antocianinas monoméricas  $4,45 \pm 0,015$  mg cy-3-glu/ 100g de flor fresca, pero menor contenido de antocianinas poliméricas con respecto a la cantidad presente en el *extracto crudo de Tibouchina mollis* ( $76,67 \pm 0,52$  % de color polimérico). Los análisis realizados a las muestras por cromatografía líquida (HPLC-PAD) y espectrometría de masas (UHPLC-ESI-MS), permitió identificar parcialmente la presencia de diferentes compuestos de tipo flavonol y antocianinas.

La prueba de múltiples rangos permitió establecer que existen diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los valores del contenido fenólico total (CFT) y TEAC. En general, los extractos crudos ECM y ECU mostraron valores relativamente bajos con respecto a los extractos purificados EPM y EPU, esto como producto del enriquecimiento mediante cromatografía con Amberlita XAD-7. El mayor CFT y la mayor actividad antioxidante (TEAC) en las dos especies lo presentaron los extractos purificados EPU ( $194,79 \pm 1,16$  mg AG/ g EPU seco y  $13,07 \pm 0,023$  mmol TROLOX/ g EPU seco) y EPM ( $216,09 \pm 1,91$  mg AG/ g EPM seco y  $14,83 \pm 0,263$  mmol TROLOX/ g EPM seco) y las fracciones más pesadas F5-M ( $199,33 \pm 8,93$  mg AG/ g F5-M seco y  $13,97 \pm 0,402$  mmol TROLOX/ g F5-M seco) y F5-U ( $174,89 \pm 12,13$  mg AG/ g F5-U seco y  $12,38 \pm 0,567$  mmol TROLOX/ g F5-U seco).

Mediante la colorimetría triestímulo fue posible establecer que existen diferencias notables en la estabilidad del color de los extractos crudos aislados de *T.mollis* (ECM) y *T.urvilleana* (ECU).

## ABSTRACT

In this research project the pigments anthocyanin and flavonol were isolated, quantified and identified in two varieties of wild flowers (*Tibouchina mollis* and *Tibouchina urvilleana*) of Nariño-Department.

The study of the results that the crude extract of *Tibouchina* had a higher content of monomeric anthocyanins  $4.45 \pm 0.015$  mg cy-3-glu / 100 g of fresh flower, but lower content of polymeric anthocyanins with respect to the amount present in the crude extract of *Tibouchina mollis* ( $76.67 \pm 0.52\%$  of polymeric color). The analysis performed on the different *T.urvilleana* and *T.mollis* samples by coupled liquid chromatography (HPLC-PAD) and mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS) allowed to partially identify the presence of different compounds of the flavonol and anthocyanin type.

The multi-rank test allowed to establish that there are statistically significant differences when comparing the values of the total phenolic content (CFT) and TEAC. In general, the crude extracts of *T. mollis* and *T.urvilleana* (ECM and ECU) were lower in value in the CFT and TEAC in comparison to the purified extracts (EPM and EPU), this was the product of the enrichment by means of Amberlita XAD-7. The highest CFT and the highest antioxidant activity (TEAC) in the two species were presented by purified EPU extracts ( $194.79 \pm 1.16$  mg AG / g dry EPU and  $13,07 \pm 0.023$  mmol TROLOX / g dry EPU) and EPM ( $216.09 \pm 1.91$  mg AG / g dry EPM and  $14,83 \pm 0.263$  mmol TROLOX / g dry EPM) and the heavier fractions F5-M ( $199.33 \pm 8.93$  mg AG / g F5 -M dry and  $13,97 \pm 0.402$  mmol TROLOX / g F5-M dry) and F5-U ( $174.89 \pm 12.13$  mg AG / g F5-U dry and  $12.38 \pm 0.567$  mmol TROLOX / g F5- U dry).

By means of tristimulus colorimetry it was possible to notice the differences in the color stability of the isolated crude extracts of *T.mollis* (ECM) and *T.urvilleana* (ECU).



## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	19
1. OBJETIVOS .....	21
1.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2. ESTADO DEL ARTE .....	22
2.1. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1.1. FAMILIA MELASTOMATACEAE .....	22
2.1.2. Usos y nombres vernáculos de algunas especies <i>Tibouchina</i> .....	23
2.1.3. <i>Tibouchina mollis</i> .....	24
2.1.4. <i>Tibouchina urvilleana</i> .....	25
2.1.5. PIGMENTOS DE ORIGEN NATURAL .....	26
2.1.5.1. Carotenoides.....	27
2.1.5.2. Clorofilas.....	28
2.1.5.3. Betalaínas.....	29
2.1.6. Flavonoides .....	30
2.1.7. ANTOCIANINAS.....	32
2.1.7.1. Estructura química de las antocianinas .....	33
2.1.7.2. Características espectrales de las antocianinas .....	35
2.1.7.3. Factores que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas.....	36
2.1.8. Las antocianinas como antioxidantes .....	39
2.1.9. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS.....	40
2.1.9.1. Métodos de caracterización de antocianinas.....	41
2.1.10. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	43
2.1.10.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas mediante el método del pH diferencial	43
2.1.10.2. Cuantificación de antocianinas poliméricas mediante el método de pH sustractivo	44
2.1.10.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales .....	45

2.1.11.	MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE <i>IN-VITRO</i>	46
2.1.11.1.	Ensayo de capacidad antioxidante equivalente TROLOX (TEAC)	47
2.1.11.2.	Método DPPH	49
2.1.12.	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO	50
2.1.12.1.	El espacio de color CIELAB (1976)	50
2.1.12.2.	Diferencias cuantitativas de color usando CIELAB	51
2.2.	ANTECEDENTES	53
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
3.1.	RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	59
3.2.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS	59
3.2.1.	Obtención de los extractos crudos ECM y ECU	59
3.2.2.	Eliminación de mucílagos	60
3.2.3.	Obtención de extractos purificados EPM y EPU	61
3.2.4.	Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas	62
3.3.	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS	64
3.3.1.	Cuantificación de antocianinas monoméricas	64
3.3.2.	Cuantificación de antocianinas poliméricas	65
3.4.	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS	65
3.4.1.	ANÁLISIS POR HPLC-PAD	65
3.4.2.	ANÁLISIS POR UHPLC-ESI-MS	66
3.5.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)	66
3.6.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	67
3.6.1.	Método TEAC	67
3.6.2.	Método DPPH ( <i>2,2-difenil-1-picrilhidrazilo</i> )	67
3.7.	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO	68
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
4.1.	PRUEBAS PRELIMINARES	70

4.2.	CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS DOS ESPECIES DE FLORES.....	71
4.3.	EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS .....	72
4.4.	SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y POLIMÉRICAS .....	73
4.5.	CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS.....	73
4.5.1.	Cuantificación de antocianinas monoméricas .....	73
4.5.2.	Cuantificación de antocianinas poliméricas .....	76
4.5.3.	IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS.....	77
4.5.3.1.	Análisis por HPLC analítica (HPLC-PAD) .....	77
4.5.3.2.	Análisis por UHPLC-ESI-MS .....	78
4.5.3.2.1.	Identificación parcial de compuestos antociánicos en los extractos y fracciones aisladas de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .....	78
4.5.3.2.2.	Identificación parcial de flavonoles en los extractos purificados y fracciones aisladas de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .....	87
4.6.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT).....	99
4.7.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	105
4.7.1.	Método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al TROLOX).....	105
4.7.2.	Método DPPH.....	112
4.8.	DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO .....	116
4.8.1.	Estudio preliminar.....	116
4.8.2.	Características colorimétricas .....	122
5.	CONCLUSIONES.....	136
	PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN .....	138
	RECOMENDACIONES.....	139
	BIBLIOGRAFÍA.....	140
	ANEXOS .....	156

## LISTA DE TABLAS

		pág.
Tabla 1.	Algunos géneros de Melastomataceae Nativos de Colombia.	25
Tabla 2.	Antocianinas comunes, estructura, color y absorción máxima.	37
Tabla 3.	Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de <i>Tibouchina kingii</i> .	59
Tabla 4.	Fracciones de antocianinas monoméricas y poliméricas en los extractos EPU y EPM.	74
Tabla 5.	Contenido antocianinas monoméricas en extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	75
Tabla 6.	Prueba de Múltiple Rangos para los valores del contenido de antocianinas monoméricas para los extractos crudos y purificados de <i>T.urvilleana</i> y <i>T.mollis</i> .	76
Tabla 7.	Contenido de antocianinas poliméricas de los extractos crudos y purificados de <i>T.urvilleana</i> y <i>T.mollis</i> .	77
Tabla 8.	Prueba de múltiple rangos para los valores del contenido de antocianinas poliméricas de los extractos crudos y purificados de <i>T.urvilleana</i> y <i>T.mollis</i> .	78
Tabla 9.	Antocianinas identificadas parcialmente en los extractos purificados EPM y EPU.	83
Tabla 10.	Parámetros espectroscópicos (UV-Vis) para las antocianinas mayoritarias presentes en EPM y EPU.	85
Tabla 11.	Compuestos tipo antocianina presentes en los extractos purificados EPM y EPU y las fracciones obtenidas de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	87
Tabla 12.	Flavonoles identificados parcialmente en los extractos purificados EPM y EPU.	91
Tabla 13.	Principales flavonoles detectados en EPM, EPU y las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular F3, F4 y F5 aisladas de los pétalos de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	97
Tabla 14.	Flavonoles y antocianinas reportados en especies <i>Tibouchina</i>	99
Tabla 15.	Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación del CFT.	100
Tabla 16.	Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método Folin-Ciocalteu.	101
Tabla 17.	Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	102
Tabla 18.	Prueba de múltiple rangos para el CFT de extractos purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	103

Tabla 19.	Prueba de múltiple rangos para el CFT de las fracciones de mayor peso molecular de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	104
Tabla 20.	Contenido fenólico reportado en algunas especies de flores silvestres.	105
Tabla 21.	Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación de la actividad antioxidante (TEAC).	106
Tabla 22.	Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC.	107
Tabla 23.	Capacidad antioxidante equivalente al TROLOX en los extractos y fracciones obtenidos de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	108
Tabla 24.	Prueba de múltiple rangos para la capacidad antioxidante TEAC de extractos purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	111
Tabla 25.	Prueba de múltiple rangos para la capacidad antioxidante TEAC de las fracciones de mayor peso molecular de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	111
Tabla 26.	Ecuaciones de correlación y parámetro EC <sub>50</sub> calculado para los extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> mediante el método DPPH.	112
Tabla 27.	Prueba de múltiple rangos para la actividad antioxidante de extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> mediante el método DPPH.	113
Tabla 28.	Contenido de fenoles totales, TEAC y DPPH para extractos crudos, purificados y fracciones aisladas de <i>T.mollis</i> .	113
Tabla 29.	Contenido de fenoles totales, TEAC y DPPH para extractos crudos, purificados y fracciones aisladas de <i>T.urvilleana</i> .	114
Tabla 30.	Comparación de la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los extractos crudos de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> con otros extractos de especies de flores.	115
Tabla 31.	Condiciones preliminares evaluadas en la estabilidad de ECM y ECU.	117
Tabla 32.	Condiciones usadas para la colorimetría triestímulo.	120
Tabla 33.	Valores inicial y final del tono o matiz del extracto crudo de <i>T.mollis</i> a 0°C, T. ambiente y 80°C.	130
Tabla 34.	Valores inicial y final del tono o matiz del extracto crudo de <i>T.urvilleana</i> a 0°C, T. ambiente y 80°C.	130
Tabla 35.	Diferencias de color para el extracto crudo de <i>T.mollis</i> a 0°C, T.ambiente, 80°C a pH 1, 2, 3.	131
Tabla 36.	Diferencias de color para el extracto crudo de <i>T.urvilleana</i> a 0°C, T.ambiente, 80°C a pH 1, 2, 3.	133

## LISTA DE FIGURAS

		pág.
Figura 1.	<i>Tibouchina mollis</i> .	26
Figura 2.	<i>Tibouchina urvilleana</i> .	27
Figura 3.	Estructura básica de carotenoides.	29
Figura 4.	Estructura química de la clorofila a y b.	30
Figura 5.	Estructuras generales del ácido betalámico, betacianinas y betaxantinas.	31
Figura 6.	Algunas especies de vegetales con contenido de betalaínas.	32
Figura 7.	Estructura química de diferentes flavonoides.	33
Figura 8.	Estructura de azúcares más comunes en antocianinas.	36
Figura 9.	Estructura básica de una antocianina.	37
Figura 10.	Formas principales de equilibrio de la antocianina en medio acuoso.	39
Figura 11.	Características espectrales de antocianinas en tampones de pH 1.0 y pH 4.5.	46
Figura 12.	Reacción de las antocianinas con metasulfito de sodio.	48
Figura 13.	Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin Cicocalteau.	48
Figura 14.	Estructura del catión radical ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante.	50
Figura 15.	Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante.	51
Figura 16.	El espacio de color CIELAB que muestra los parámetros L*, a*, b*, C* <sub>ab</sub> y h <sub>ab</sub> de un color determinado y la diferencia de color ΔE* <sub>ab</sub> .	53
Figura 17.	Etapas de desarrollo de la flor <i>Tibouchina semidecandra</i> .	56
Figura 18.	Selección del material vegetal.	61
Figura 19.	Proceso para la obtención de los extractos crudos de <i>T.mollis</i> y <i>T. urvilleana</i> .	62
Figura 20.	Purificación parcial de los extractos crudos de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	63
Figura 21.	Purificación de extractos crudos ECM y ECU sobre columna con Amberlita XAD-7.	64
Figura 22.	Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas	65
Figura 23.	Fracciones obtenidas de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	65
Figura 24.	Cuantificación de antocianinas monoméricas para extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> de <i>T.urvilleana</i> .	66
Figura 25.	Cuantificación de antocianinas poliméricas para extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> de <i>T.urvilleana</i> .	67
Figura 26.	Variación del color con respecto al pH de extractos crudos.	71

Figura 27.	Espectros UV-vis de extractos de crudos <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	72
Figura 28.	Perfiles cromatográficos registrados a 520 nm de los extractos purificados EPM y EPU.	79
Figura 29.	Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) para el compuesto <b>2'</b> .	80
Figura 30.	Estructura propuesta para el compuesto <b>2'</b> .	82
Figura 31.	Estructura química del compuestos <b>1'</b> .	82
Figura 32.	Estructura química del compuesto <b>6'</b> y <b>7'</b> .	84
Figura 33.	Estructura química del compuesto <b>4'</b> .	85
Figura 34.	Espectros UV-Vis de las antocianinas <b>2'</b> (tr: 17.841 min), <b>6'</b> (tr: 41.527 min) y <b>7'</b> (tr: 44.850 min).	86
Figura 35.	Perfiles cromatográficos registrados a 360 nm de los extractos purificados EPM y EPU.	88
Figura 36.	Estructura química de los compuestos <b>2</b> y <b>3</b> .	92
Figura 37.	Estructura química del compuesto <b>9</b> .	93
Figura 38.	Estructura propuesta para el compuesto <b>4</b> .	93
Figura 39.	Estructura química de los compuestos <b>10</b> y <b>11</b> .	94
Figura 40.	Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto <b>1</b> .	95
Figura 41.	Estructuras químicas propuestas para los compuestos <b>1</b> y <b>12</b> .	96
Figura 42.	Estructura química del compuesto <b>7</b> .	96
Figura 43.	Recta de calibrado para determinar el CFT.	101
Figura 44.	Diagrama de barras del contenido fenólico (mg AG/g muestra) de extractos y fracciones obtenidos a partir de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	103
Figura 45.	Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC).	107
Figura 46.	Diagrama de barras de valores de TEAC (mmol TROLOX / g muestra) de extractos y fracciones obtenidas a partir de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	109
Figura 47.	Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las muestras de <i>T.mollis</i> .	110
Figura 48.	Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las muestras de <i>T.urvilleana</i> .	110
Figura 49.	Variación del color del extracto crudo ECM y ECU a diferentes valores de pH.	116
Figura 50.	Análisis del ECU a 80°C.	117
Figura 51.	Comportamiento de extractos crudos ECM y ECU almacenado a 0°C en diferentes condiciones de pH 3, 5, 8.	
Figura 52.	Comportamiento de extractos crudos ECM y ECU almacenados a 80°C en diferentes condiciones de pH 1, 2, 3.	120

Figura 53.	Variación de la luminosidad en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3.	123
Figura 54.	Variación del croma en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3.	125
Figura 55.	Variación del matiz en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3.	128
Figura 56.	Diferencias de color de ECM a 0°C, 80°C y T.ambiente a pH 1, 2, 3.	132
Figura 57.	Diferencias de color de ECU a 0°C, 80°C y T.ambiente a pH 1, 2, 3.	134



## LISTA DE ANEXOS

	pág.
ANEXO A. Certificado de clasificación taxonómica impartido por el Herbario –PSO-de la Universidad de Nariño.	155
ANEXO B. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin.	156
ANEXO C. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS•+.	156
ANEXO D. Coloración violeta característica del radical DPPH.	156
ANEXO E. Perfiles cromatográficos de F1-M, F2-M, F3-M, F1-U, F2-U, F3-U, F4-U registrados a 520 nm.	157
ANEXO F. Perfiles cromatográficos de F3-M, F4-M, F5-M, F3-U, F4-U, F5-U registrados a 360 nm.	160
ANEXO G. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones de <i>T.mollis</i> .	163
ANEXO H. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones de <i>T.urvilleana</i> .	164
ANEXO I. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del CFT para los extractos purificados y fracción de mayor peso molecular de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	165
ANEXO J. Compuestos mayoritarios identificados parcialmente en las fracciones aisladas de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	166
ANEXO K. Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos crudos, purificados y fracciones de <i>T.mollis</i> .	167
ANEXO L. Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos crudos, purificados y fracciones de <i>T.urvilleana</i> .	167
ANEXO M. Gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos purificados y fracción de mayor peso molecular de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	168
ANEXO N. Construcción de las curvas dosis-respuesta para los extractos crudos y purificados de <i>T.mollis</i> y <i>T.urvilleana</i> .	169
ANEXO O. Curva dosis respuesta para el control ácido ascórbico usado en DPPH.	171
ANEXO P. ECM y ECU a pH 1, 2, 3 y T. ambiente y 0°C	171
ANEXO Q. Parámetros CIELAB	173

## GLOSARIO

**AGLICONA:** compuesto químico formado a partir de un glucósido cuando un átomo de hidrógeno sustituye a un grupo glicosilo.

**ANTIOXIDANTE:** son moléculas que participan en la eliminación de especies reactivas de oxígeno que causan estrés oxidativo (ROS) y se definen como aquellas sustancias que podrían impedir la oxidación del sustrato a bajas concentraciones.

**ANTOCIANINA:** pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos.

**CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA:** consiste en una técnica de separación donde la fase inmóvil es apolar y la fase móvil tiene una polaridad moderada. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

**CROMÓFORO:** un grupo de átomos en un compuesto químico que son responsables de la coloración del compuesto

**ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS):** técnica analítica que permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura de diferentes moléculas.

**IN VITRO:** que sucede o que tiene lugar en un tubo de ensayo, en un medio de cultivo o en otro ambiente artificial en el laboratorio.

**MACERACIÓN QUÍMICA:** proceso de extracción sólido-líquido.

**MUCÍLAGO:** sustancia gelatinosa de algunas plantas que contiene proteínas y polisacáridos y es similar a goma vegetal.

**PIGMENTOS:** son compuestos químicos que absorben la luz en el intervalo de longitud de onda de la región visible.

**RADICAL LIBRE:** átomo o molécula que contiene al menos un electrón no apareado y existente por un breve período de tiempo antes de reaccionar para producir una molécula estable.

## INTRODUCCIÓN

Las antocianinas son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares; son inofensivos y de fácil incorporación en medios acuosos, lo que los hace interesantes para su uso como colorantes naturales en la industria. Estos pigmentos son los responsables de los colores brillantes de naranja, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutas de algunas plantas<sup>1</sup>. Con los años, la comunidad científica se ha centrado en estas moléculas tratando de determinar tanto su química como sus propiedades.<sup>2</sup> Gracias a dichos conocimientos, se sabe que las antocianinas desempeñan papeles relevantes en la propagación de las plantas y además se ha podido demostrar que están asociadas con posibles beneficios terapéuticos<sup>3</sup> que incluyen: la reducción de enfermedades coronarias, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorias y antidiabéticas; además del mejoramiento de la agudeza visual y del comportamiento cognitivo<sup>4</sup>.

En los últimos veinte años, se han identificado un gran número de estructuras nuevas; se han acumulado evidencias de beneficios en la salud humana y se han comenzado a determinar los procesos de absorción y biotransformación de las antocianinas en el organismo humano; por otra parte, han surgido nuevas aplicaciones de antocianinas como colorantes o compuestos bioactivos para ser explotados en las industrias textil, farmacéutica y cosmética<sup>5</sup>. La literatura muestra también que este tipo de pigmentos pueden servir como biomateriales, los cuales tienen la particularidad de trabajar en ensamblajes altamente organizados, desde macro a nanoescala. Lo anterior, debido a la estructura particular de este tipo de compuestos, la cual es deficiente de electrones. La gran disponibilidad de flores, frutas y hojas de color, permite la extracción de diferentes antocianinas adecuadas para su utilización en dispositivos funcionales. Por lo tanto, representan una clase natural de compuestos comúnmente encontrados que al entrar en contacto con la radiación también los convierte en buenos y atractivos biomateriales. De hecho, estos compuestos son no contaminantes, son totalmente biodegradables y de bajo costo.

---

<sup>1</sup>PAZMIÑO, Alexandra., GIUSTI, Mónica., WROLSTAD, Ronald., y GLÓRIA, Beatriz. *Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants*. In: Food Chemistry. April (2001). vol. 75(2). p. 211–216.

<sup>2</sup> HE, Jian., y GIUSTI, Mónica. *Antocianinas: colorantes naturales con propiedades que promueven la salud*. In: Revisión anual de ciencia y tecnología de los alimentos. November (2010). vol. 1 (1), 163–187.

<sup>3</sup>DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. *Colouring our foods in the last and next millennium*. In: International Journal of Food Science and Technology. November (1999). vol. 35, p. 5-22.

<sup>4</sup>ULLAH Rahat, KHAN Mehtab, ALI SHAH Shahid, SAEED Kamran y MYEONG Ok Kim. *Natural Antioxidant Anthocyanins—A Hidden Therapeutic Candidate in Metabolic Disorders with Major Focus in Neurodegeneration*. In: Nutrients. May (2019). vol. 11(3). p. 1-32.

<sup>5</sup> GOTO, Toshio y KONDO, Tadao. *Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation*. In: Angew Chemistry. (1991). vol. 30. p. 17-33.

En consecuencia, pueden reemplazar con éxito otros pigmentos artificiales, normalmente caros, difíciles de sintetizar, con escasa disponibilidad y los cuales se ha demostrado tienen un efecto tóxico en los seres humanos<sup>6</sup>.

Desde esta perspectiva, es de gran interés investigar el potencial y las características fisicoquímicas de estos compuestos como colorantes e impulsar el descubrimiento de nuevas fuentes, que alternativamente contribuyan a una utilización más racional de nuestra biodiversidad. Cabe mencionar que, aunque el departamento de Nariño es una región con una rica biodiversidad en flora, los recursos que se nos ofrecen son sub-utilizados. En estos casos podemos citar las dos especies de flor comúnmente llamadas sietecueros y angelito propuestas para este trabajo (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) que actualmente son únicamente de uso ornamental y que eventualmente podrían ser mejor aprovechadas como una fuente de pigmentos con este tipo de características. De igual forma los estudios que se han realizado en el mundo sobre la caracterización química y actividad antiradical de antocianinas presentes en flores del género *Tibouchina* son escasos de manera que con este trabajo también se espera generar valioso conocimiento sobre la composición y capacidad antioxidante de los pigmentos presentes en las dos especies de flor.

---

<sup>6</sup> BETTINI, S. *et al.* Spectroscopic investigations, characterization and chemical sensor application of composite LangmuireSchäfer films of anthocyanins and oligophenylenevinylene derivatives. *In*: Dyes and Pigments. January (2012), vol 94, 156–162.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición y actividad antioxidante *In vitro* de los pigmentos tipo antocianinas aislados de dos especies de flores (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*).

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Extraer y cuantificar los pigmentos presentes en dos especies de flores (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) mediante extracción con solventes, técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
- ❖ Estudiar la capacidad antioxidante de los pigmentos mayoritarios a nivel *In-vitro* mediante la técnica TEAC (actividad antioxidante equivalente TROLOX).
- ❖ Identificar los pigmentos mayoritarios presentes en (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) mediante UV-Vis y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-ESI-MS).
- ❖ Estudiar la estabilidad del color de los extractos crudos de (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) en función del pH, mediante colorimetría triestímulo.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. MARCO TEÓRICO

#### 2.1.1. FAMILIA MELASTOMATACEAE

Es la familia que incluye a tunos, sietecueros y mayos. Es la séptima familia más diversa del planeta, con 180 géneros y alrededor de 4.400 especies distribuidas en todos los países intertropicales y subtropicales<sup>7</sup>. Suramérica cuenta con 166 géneros y Colombia es el país con mayor diversidad de la familia al nivel neotropical, con alrededor de 900 especies y 62 géneros nativos. El mayor número de especies se encuentra en bosques húmedos de los Andes, Chocó Biogeográfico y la Amazonia, en todos los rangos altitudinales inclusive hasta las zonas de páramo; la familia es muy escasa o inexistente en zonas xerofíticas y subxerofíticas<sup>8</sup>. La familia en general carece de importancia industrial o medicinal, pero la tiene como ornamental por sus hojas llamativas especialmente en especies foráneas o por la belleza y colorido de las flores, como en los géneros *Tibouchina*<sup>9</sup>. Los mayos (propriamente especies de *Tibouchina*) derivan su nombre por su espectacular floración masiva en los bosques andinos y altoandinos regularmente durante el mes de mayo. En Colombia se conocen 62 géneros nativos de Melastomataceae distribuidos en todas las ecorregiones y tipos de vegetación. En la tabla 1 se presentan algunos de ellos<sup>10</sup>.

---

<sup>7</sup>GOLDENBERG, Renato. *et al. Taxonomia de Melastomataceae No Brasil: Retrospectiva, Perspectivas e Chave de Identificação Para Os Gêneros*. En: Rodriguesia. (2012). vol. 63(1). p. 145–61.

<sup>8</sup>MENDOZA Humberto y RAMÍREZ, Bernardo. Guía Ilustrada de géneros de melastomataceae y memecylaceae de Colombia: género *Tibouchina*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, (2006). ISBN: 958-8151-67-8. p.226

<sup>9</sup> URIBE, Lorenzo. *Catálogo ilustrado de las plantas de Cundinamarca: Passifloraceae, Begoniaiceae, Melastomataceae*. En: Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá. (1972). vol. 5.

<sup>10</sup> MENDOZA Humberto y RAMÍREZ, Bernardo. Guía Ilustrada de géneros de melastomataceae y memecylaceae de Colombia: género *Tibouchina*. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, (2006). ISBN: 958-8151-67-8. p.226

Tabla 1. Algunos géneros de Melastomataceae Nativos de Colombia

Género	Tribu	No especies	Distribución	Altitud (msnm)
		Colombia		
<i>Acisanthera</i>	Melastomeae	9	CH, MA, SN, AN, OR, EG.	0-2.130
<i>Brachyotum</i>	Melastomeae	8	SN, AN.	2.600-4.500
<i>Ernestia</i>	Melastomeae	4	CAR, MA, AN, OR, AM.	0-1.800
<i>Macairea</i>	Melastomeae	8	OR, EG.	0-900
<i>Monochaetum</i>	Melastomeae	27	SN, AN.	1.100-3.500
<i>Pilocosta</i>	Melastomeae	1	SN, AN	300-2.500
<i>Siphanthera</i>	Melastomeae	5	OR, EG.	100-650
<i>Tibouchina</i>	Melastomeae	28	CAR, CH, MA, VI, SN, AN, OR, EG, AM.	0-3.800

Notas: CAR (región Caribe); CH (Chocó); MA (región Magdalena medio); VI (Valles interandinos del Cauca y Magdalena); SN (Sierra Nevada); AN (región andina por encima de los 1000 m); OR (Orinoquía); EG (Escudo Guayanes); AM (Amazonia y piedemontes sur-oriental de Los Andes por debajo de los 1000 m).

Fuente: Recopilado MENDOZA Humberto y RAMÍREZ, Bernardo. p. 64 (2006).

### 2.1.2. Usos y nombres vernáculos de algunas especies *Tibouchina*

*Tibouchina lepidota* es regularmente talada para posteaduras, pues su madera es compacta y resistente a la humedad; se siembra para proteger riberas y regularmente es cultivada en jardines de zonas frías en el Valle, Cauca y Nariño; en éste último departamento, municipio de Ricaurte, es conocida como «mayo»; en los departamentos de Antioquia y del Quindío se conoce como «sietecueros» *Tibouchina mollis* se conoce en el Quindío como «angelito»<sup>11</sup> y Nariño con los nombres de «mayo», «pucasacho» y «pucayamta»; en el Alto Putumayo se conoce como «Shenagufa» (Kamtsá) y en Cauca como «san juanita» y «castaño». En la misma región se conoce a *Tibouchina grossa* con el nombre de «colorado», en tanto que el Quindío se conoce como «sietecueros de páramo», «sietecueros enano» y en Antioquia como «sietecueros rojo». *Tibouchina urvilleana*, nativa de Brasil, es muy frecuente en jardines de zonas frías pues presenta flores grandes de pétalos color violeta<sup>12</sup>.

<sup>11</sup>VARGAS, William. *Guía ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales. Manizales: Universidad de Caldas, Centro Editorial.* (2002). p. 814.

<sup>12</sup>TODZIA, Carol and ALMEDA, Frank: *A revision of Tibouchina section Lepidotae (Melastomataceae: Tibouchineae).* In: *Proceedings of the California Academy of Science.* January (1991). vol. 47(6). p. 175-206.

### 2.1.3. *Tibouchina mollis*

Crece especialmente en sitios con altas pendientes y formando grupos densos entre 2500 y 3400 metros sobre el nivel del mar, se reconoce por sus tallos y ramas con abundantes ritidomas delgados de color naranja, ramillas densamente cubiertas de pelos café-rojizos; hojas pubescentes, elípticas a elípticolanceoladas; ápice agudo base obtusa a redondeada, margen suavemente dentada, inflorescencias terminales, paniculadas; flores pentámeras, cáliz vellosa, pétalos rosados de hasta 1.5 centímetros de longitud; fruto capsular con semillas café amarillento y alcanza hasta 8 metros de altura (Figura 1)<sup>13</sup>.

Figura 1. *Tibouchina mollis*



Fuente: Esta investigación

#### 2.1.3.1. Taxonomía<sup>14</sup>

Reino: Plantae  
División: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Myrtales  
Familia: Melastomataceae  
Género: *Tibouchina*  
Especie: *mollis*

#### 2.1.3.2. Distribución altitudinal<sup>15</sup>: Entre los 1700 y 3350m de altitud.

<sup>13</sup> VARGAS, William. *Guía ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales. Manizales*: Universidad de Caldas, Centro Editorial. (2002). p. 814.

<sup>14</sup> UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. [En línea]. [Citado el 26 de Julio de 2018]. [Última actualización 14 de febrero de 2007]. Disponible en: < <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/64173/>>

<sup>15</sup> RODRÍGUEZ, José Olimpo, PEÑA, José y RODRÍGUEZ, Eduardo. *Flora de los Andes. Cien especies del Altiplano CundiBoyacense*. Villegas Editores. Bogotá, Colombia. (1984). p. 103.



2.1.3.3. Distribución geográfica en Colombia<sup>16</sup>: Esta especie se distribuye desde Colombia hasta Perú.

#### 2.1.4. *Tibouchina urvilleana*

Se trata de un arbusto de envergadura mediana nativo de Brasil, con tendencia a tener un crecimiento en anchura bastante espacioso, aunque en altura puede alcanzar alrededor de los 2 o 3 m (Figura 2). Posee un porte erguido, moderadamente ramificado y hojas persistentes, las cuales son pilosas en ambas caras, ovaladas, puntiagudas, de textura aterciopelada, de color verde bronce por la cara superior y más claro por la inferior, tiene de tres a cinco nervios muy pronunciados. Sus bellísimas flores son de color azul-violeta purpúreo poseen diez estambres curvos de color púrpura, tienen un cáliz veloso y crecen en los extremos del tallo. La corola es un delgado tubo que se abre en cinco grandes pétalos redondeados. La floración se presenta desde enero hasta mayo y pese a que las flores son bastante efímeras, con la correcta cantidad de luz y calor aparecerán intermitentemente durante todo el año<sup>17</sup>.

Figura 2. *Tibouchina urvilleana*



Fuente: RODRÍGUEZ, José Olimpo, PEÑA, José y RODRÍGUEZ, Eduardo (1984)

---

<sup>16</sup> ALZATE, Fernando. *et al. Tibouchina mollis (Bonpl.) Cogn.* En: Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Rodrigo, Bernal. Grandstein, y Marcela Celis, eds. (2015).

<sup>17</sup> PLANTAS Y FLORES. [En línea]. [Citado el 26 de Julio de 2018]. [Última actualización, 30 de Junio de 2018]. Disponible en: < <https://plantayflor.blogspot.com/2010/01/tibouchina-urvilleana-tibouchina.html>>

#### 2.1.4.1. Taxonomía<sup>18</sup>

Reino: Plantae  
Phylum: Magnoliophyta  
Clase: Magnoliopsida  
Orden: Myrtales  
Familia: Melastomataceae  
Género: Tibouchina  
Epíteto específico: *urvilleana*

#### 2.1.5. PIGMENTOS DE ORIGEN NATURAL

Los pigmentos naturales se pueden considerar como metabolitos secundarios, los cuales han sido ampliamente definidos como compuestos que no tienen un papel reconocido en el mantenimiento de procesos vitales de las plantas, tales como el crecimiento o la replicación. Hasta ahora, se han identificado más de 100.000 metabolitos secundarios, que probablemente representan solo el 10% del número total real en la naturaleza y tan solo la mitad de las estructuras han sido elucidadas por completo<sup>19</sup>. Los metabolitos secundarios comprenden grupos grandes y diversos de sustancias químicas que son específicas para ciertas especies de plantas; estos generalmente se almacenan en vacuolas celulares. Además de su valor intrínseco a la planta, muchos metabolitos secundarios son comercialmente valiosos y se utilizan como productos farmacéuticos. Actualmente, aproximadamente el 25% de todos los medicamentos prescritos provienen de plantas y en el caso del descubrimiento y diseño de fármacos contra el cáncer, el porcentaje es aún mayor<sup>20</sup>.

Una serie de fitoquímicos también se utilizan en alimentos como colorantes o saborizantes y algunos se usan como fragancias en perfumes<sup>21</sup>. Algunos metabolitos secundarios tienen un papel muy importante en la interacción de la planta con su entorno y por lo tanto pueden considerarse biológicamente activos<sup>22</sup>; junto con la fragancia, la forma y el tamaño de una planta, los pigmentos sirven

<sup>18</sup>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. [En línea]. [Citado el 26 de Julio de 2018]. [Última actualización 14 de febrero de 2007]. Disponible en: < <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/616590/>>.

<sup>19</sup>ZHONG, J. and SHANGHAI Jiao. *Comprehensive Biotechnology Plant Secondary Metabolites*. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Segunda Edición. Elsevier. (2010). vol. 6, p. 3883–3819.

<sup>20</sup>M. Greenwell and P.K.S.M. Rahman. *Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment*. In: International J Pharm Sci Res. October (2015). vol. 6(10). p. 4103–4112.

<sup>21</sup>DAVEY, M. *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Segunda Edición. Elsevier. (2003). vol. 3. p. 1388–1395.

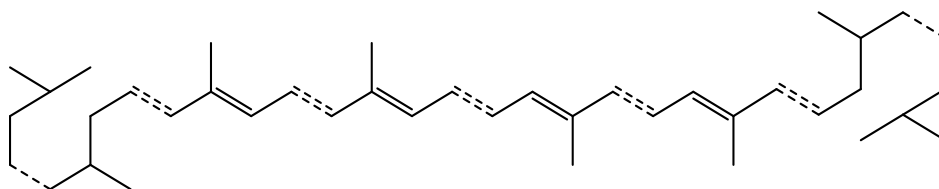
<sup>22</sup>ZHONG, J. and SHANGHAI Jiao. *Comprehensive Biotechnology Plant Secondary Metabolites*. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Segunda Edición. Elsevier. (2010). vol. 6, p. 3883–3819.

como señales esenciales para que los polinizadores encuentren sus huéspedes o ser también un mecanismo de defensa contra depredadores. Los animales herbívoros y frugívoros se basan en el color para identificar tejidos comestibles y para evaluar el grado de madurez de la fruta o verdura. Los pigmentos vegetales más comunes son carotenoides, clorofilas, antocianinas y betalainas. Mientras que los primeros se ubican en plastidios especializados, estos últimos se depositan en la vacuola<sup>23,24</sup>.

#### 2.1.5.1. Carotenoides

Los carotenoides son compuestos constituidos por ocho unidades de isopreno. Estas unidades se unen en un patrón de cabeza a cola, pero el orden se invierte en el centro de la molécula (Figura 3)<sup>25</sup>. El licopeno (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) se considera el primer carotenoide lineal coloreado en la biosíntesis de muchos otros carotenoides naturales. Los carotenoides son pigmentos liposolubles, de color amarillo, naranja o rojo que se encuentran en la mayoría de las plantas superiores<sup>26</sup>. Las funciones primarias de los carotenoides en las plantas dependen de la ubicación: en los tejidos fotosintéticos, las funciones principales son la recolección de luz y la fotoprotección, y en otros tejidos contribuyen principalmente al color de las flores y frutas y actúan como antioxidantes<sup>27</sup>. Los carotenoides que contribuyen significativamente a los colores de la planta incluyen tres formas de caroteno ( $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ), licopeno y las xantofilas que contienen oxígeno. El  $\beta$ - caroteno y las xantofilas de color amarillo predominan en las hojas y otros tejidos fotosintéticos<sup>28</sup>.

Figura 3. Estructura básica de carotenoides



Fuente: Recopilado de KAIMAINEN, Mika (2014).

<sup>23</sup>DELGARDO-VARGAS, F. JIMENEZ, A. R. and PAREDES-LÓPEZ, O. *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability.* In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. June (2000). vol. 40. p. 173–289.

<sup>24</sup>FOSSEN, Torgils, *et al.* *Anthocyanins of grasses.* In: Biochemical Systematics and Ecology. June, (2002). vol. 30. p. 855–864.

<sup>25</sup>KAIMAINEN, Mika. *Stability of Natural Colorants of Plant Origin.* Doctoral Thesis in Food Sciences. University of Turku. Food Chemistry and Food Development. Department of Biochemistry, (2014). p. 6.

<sup>26</sup>MORTENSEN, Alan. *Carotenoids and other pigments as natural colorants.* In: Pure and Applied Chemistry, (2006). vol.78 (8). p. 1478

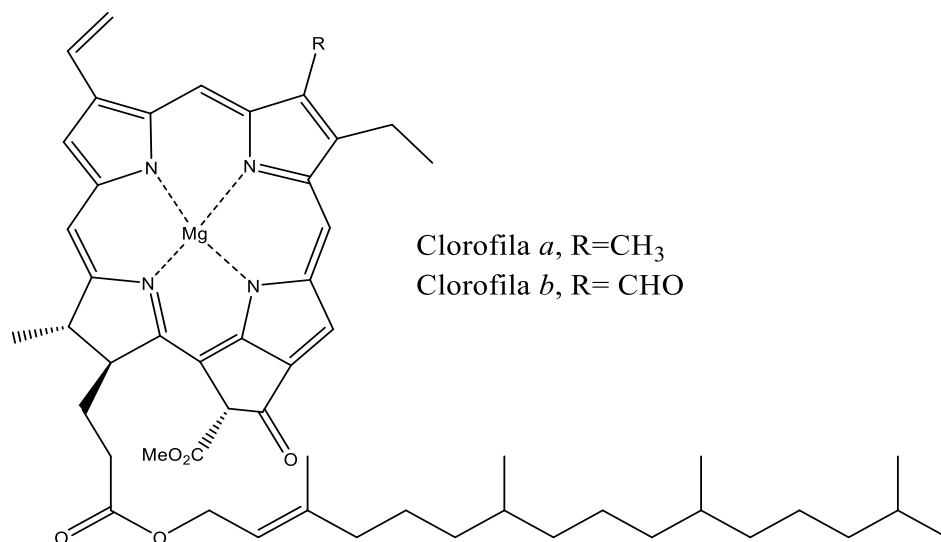
<sup>27</sup>HOWITT, Crispin and POGSON, Barry. *Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues.* In: Plant, Cell and Environment. March, (2006), vol. 29(3). p. 435–445.

<sup>28</sup>ALKEMA, Joy and SEAGER, Spencer. *The chemical pigments of plants.* In: Journal of Chemical Education. March, (1982), vol. 59(3). p. 183.

### 2.1.5.2. Clorofilas

Las clorofilas son los principales pigmentos verdes que capturan la luz en los organismos fotosintéticos, incluidas las plantas verdes, las algas y las bacterias. Las clorofilas son esenciales en la fotosíntesis, la cual permite transformar la energía del sol en energía química (en forma de glucosa) de modo que así, las clorofilas han permitido que la vida tal como la conocemos se origine y evolucione<sup>29</sup>. Las clorofilas son compuestos que tienen un anillo de porfirina de tetrapirrol sustituido con un ion de magnesio coordinado en el medio y un grupo de fitol monoinsaturado de 20 carbonos esterificado, que hace que estos compuestos sean parcialmente solubles en aceite, aunque el anillo de porfirina también le confiere a la molécula características polares. En la naturaleza se encuentran varias clorofilas que difieren en los sustituyentes del anillo de porfirina, pero en las plantas verdes solo se encuentran dos variantes, las clorofilas a y b, en una proporción aproximada de 3:1. Las estructuras de las clorofilas a y b difieren solo en un sustituyente y se muestran en la figura 4<sup>30</sup>.

Figura 4. Estructura química de la clorofila a y b



Fuente: Recopilado de SCHEER, H. (1991)

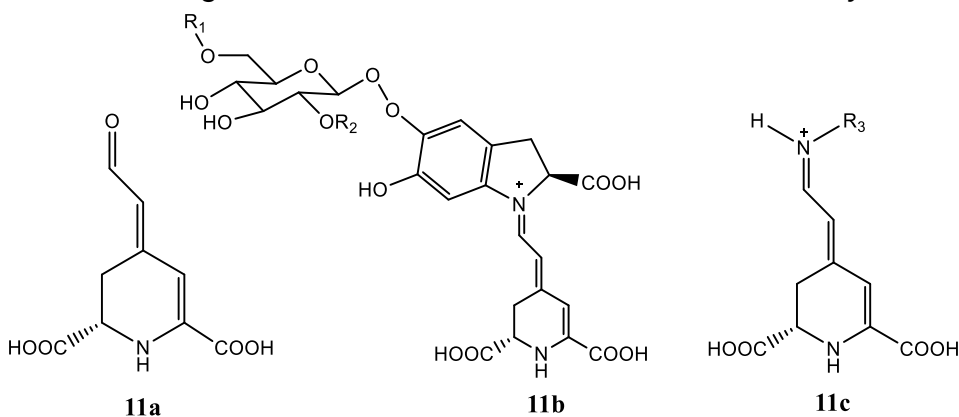
<sup>29</sup> SCHWARTZ, S. *et al.* *Colorants in Fennema's Food Chemistry*. (4th Edición), eds. S. Damodaran, K.L. Parkin & O.R. Fennema, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, (2008) p. 571–638.

<sup>30</sup> SCHEER, H. *Structure and occurrence of chlorophylls in Chlorophylls*, ed. H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, FL. (1991). p. 3–30.

### 2.1.5.3. Betalaínas

Las betalaínas reemplazan a las antocianinas en flores y frutos de plantas de la mayoría de las familias de *Caryophyllales*. Son pigmentos nitrogenados solubles en agua y se sintetizan a partir del aminoácido tirosina en dos grupos estructurales (Figura 5): las betacianinas de color rojo-violeta y las betaxantinas amarillo-anaranjadas. El ácido betalámico, cuya estructura se presenta en la figura **11a**, es el cromóforo común en todos los pigmentos de betalaína<sup>31</sup>. En las betacianinas, hay un anillo aromático en forma de un grupo ciclodopa **11b** y en las betaxantinas, la sustitución es una amina o aminoácido **11c**. El anillo aromático en betacianinas amplía la conjugación del cromóforo y su absorción máxima es alrededor de 540 nm (rojo o violeta), mientras que el máximo de absorción de betaxantinas es de aproximadamente 480 nm (amarillo)<sup>32</sup>.

Figura 5. Estructuras generales del ácido betalámico, betacianinas y betaxantinas



Fuente: Recopilado de AZEREDO, Henriette (2009)

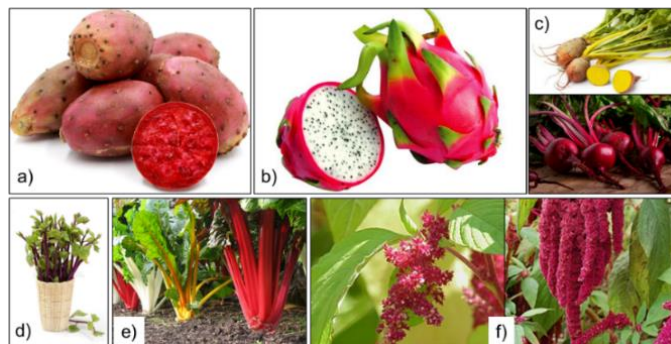
Las betalaínas se pueden encontrar en diferentes partes de la planta (raíces, frutos y flores) y se acumulan en las vacuolas celulares, principalmente en los tejidos epidérmicos y subepidérmicos; y en algunas ocasiones en los tallos de las plantas. Durante mucho tiempo, la remolacha roja fue prácticamente la única fuente de betalaínas conocida. Ahora, se han investigado otras, principalmente el fruto del

<sup>31</sup> STRACK, Dieter, VOGT, Thomas and SCHLIEMANN, Willibald. *Recent advances in betalain research*. In: *Phytochemistry*. October, (2002). vol. 62. p. 247–269.

<sup>32</sup> AZEREDO, Henriette. *Original Article Betalains: Properties, Sources, Applications, and Stability – a Review*. In: *International Journal of Food Science and Technology*. September, (2009). vol. 44. p. 2365–2376

cactus pera espinoso<sup>33</sup> y la pitaya rojo púrpura o conocida también como fruta del dragón<sup>34</sup>, entre otros estudios se encuentran: las raíces de remolacha roja y amarilla (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*), las hojas de espinaca india (*Basella rubra* L), los tallos de color de algunas especies de acelga (*Beta vulgaris* L. ssp. *cicla*) y los granos y hojas de amaranto (*Amaranthus* ssp), (Figura 6)<sup>35</sup>. La estabilidad de las betalaínas se ve afectada por diversos factores fisicoquímicos, la degradación de estos pigmentos está influenciada por factores endógenos, tales como enzimas de las plantas como polifenoloxidasas, peroxidasa, y  $\beta$ - glucosidasa y por las condiciones que prevalecen en el medio de extracción, principalmente la temperatura, el oxígeno y el pH<sup>36</sup>.

Figura 6. Algunas especies de vegetales con contenido de betalaínas



(a) Fruto del cactus pera espinoso, (b) pitahaya rojo-púrpura, (c) remolacha roja y amarilla, (d) espinaca india (e) tallos de acelga rojos y amarillos, (f) granos y hojas de amaranto.

Fuente: Recopilado de AZEREDO, Henriette (2009).

#### 2.1.6. Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios pertenecientes a la clase de los fenilpropanoides, tienen el rango de color más amplio, desde el amarillo pálido al azul. En particular, las antocianinas, una clase de flavonoides, son responsables de los colores naranja a azul que se encuentran en muchas flores,

<sup>33</sup> MOBHAMMER, Marcus, STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. *Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear*. In: Innovative Food Science and Emerging Technologies. December, (2006). vol. 7. p. 275-287.

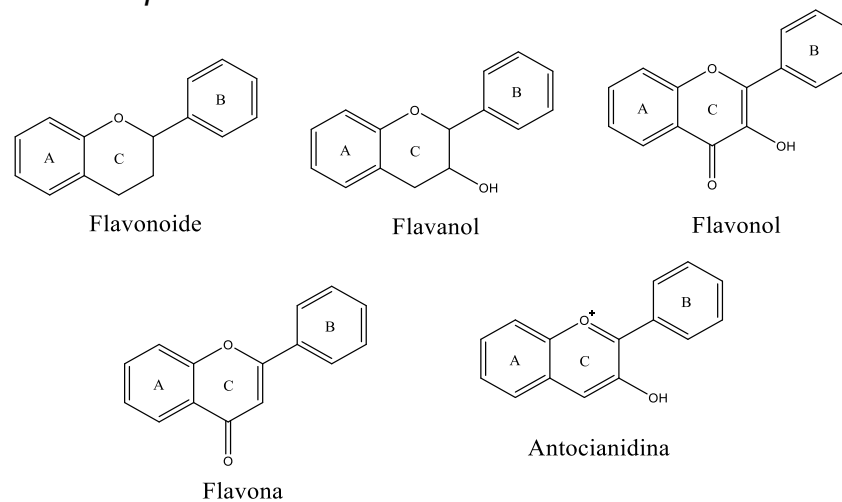
<sup>34</sup> HERBACH, Kristen, MAIER, Christine, STINTZING, Florian and Carle Reinhold. (2007). *Effect of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice*. In: European Food Research and Technology. March, (2007). vol. 224. p. 649-658.

<sup>35</sup> AZEREDO, Henriette. *Original Article Betalains : Properties, Sources, Applications, and Stability – a Review*. In: International Journal of Food Science and Technology. September, (2009). vol. 44. p. 2365–2376.

<sup>36</sup> STINTZING, Florian C. and CARLE, Reinhold. *Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications*. In: SOCACIU, Carmen (Ed.), Food Colorants. Chemical and Functional Properties. Boca, Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, (2008). p. 286.

hojas, frutos, semillas y otros tejidos. Se distribuyen ampliamente en las plantas de semillas, son solubles en agua y se almacenan en vacuolas. Las betalaínas, son compuestos que contienen nitrógeno y son derivados del ácido betalámico. También son solubles en agua y se almacenan en vacuolas, pero se encuentran solo en el orden Caryophyllales<sup>37</sup>. Los flavonoides tienen una estructura básica de C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, están ampliamente distribuidos entre las plantas terrestres. Dependiendo de sus estructuras, los flavonoides pueden clasificarse en una docena de grupos, como chalconas, flavonas, flavonoles y antocianinas (Figura 7)<sup>38</sup>. La modificación de flavonoides con grupos hidroxilo, metilo, glicosilo y acilo da como resultado varios miles de estructuras. Los flavonoides desempeñan un papel importante como compuestos de defensa y como moléculas de señalización en la reproducción, la patogénesis y la simbiosis<sup>39</sup>.

Figura 7. Estructura química de diferentes flavonoides



Fuente: Recopilado de MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., *et al.* (2002)

Se producen en grandes cantidades y cuando se introducen en el medio ambiente tienen efectos significativos sobre la composición del suelo y los microambientes que las plantas que lo habitan. También, hay una evidencia del papel de los flavonoides en la alelopatía (interacciones planta-planta)<sup>40</sup>. Los flavonoides están entre los metabolitos secundarios de plantas mejor caracterizados en términos de

<sup>37</sup> BOO, Hee-ock, *et al.* *Extraction and Characterization of Some Natural Plant Pigments*. In: *Industrial Crops y Products*. February, (2012). vol. 40. p. 129–35

<sup>38</sup> MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., *et al.* *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. En: *Nutrición hospitalaria*, 2002. vol. 17(6). p. 271-278.

<sup>39</sup> TANAKA, Yoshikazu, NOBUHIRO Sasaki and AKEMI Ohmiya. *Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids*. In: *Plant Journal*, vol. 54(4). January, (2008). p. 733–49.

<sup>40</sup> KOES, Ronald, QUATTROCCHIO, Francesca and Mol Joseph. *The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution*. In: *BioEssays*. February, (1994). vol. 16. p. 123-132.

química, mecanismo de coloración, bioquímica, genética y biología molecular<sup>41</sup>. Por ejemplo las antocianinas se usan ampliamente como colorantes alimentarios naturales, por ejemplo, los acilglucósidos de cianidina de la col morada (*Brassica oleracea var. Capitata*) y *Perilla frutescens*.

### 2.1.7. ANTOCIANINAS

Las antocianinas (del griego anthos = flor y kianos = azul) son los pigmentos más importantes de las plantas vasculares; son inofensivos y de fácil incorporación en medios acuosos, lo que los hace interesantes para su uso como colorantes naturales<sup>42</sup>. Estos pigmentos son responsables de los brillantes colores naranja, rosa, rojo, violeta y azul en las flores y frutos de algunas plantas. Juegan un papel definido en la atracción de los animales para la polinización y la dispersión de semillas; por lo tanto, tienen un valor considerable en la co-evolución de las interacciones planta-animal. Pueden actuar como fitoalexinas o como agentes antibacterianos, que pueden ser factores importantes junto con otros flavonoides en la resistencia de las plantas contra el ataque de insectos. Por ejemplo, Hedin *et al*<sup>43</sup> demostró que la cianidina-3-glucósido protege las hojas de algodón contra el gusano del tabaco<sup>44</sup>.

Hasta ahora, se conocen 600 antocianinas diferentes principalmente en forma de heterósidos<sup>45</sup>. Otra propiedad importante de las antocianinas es su actividad antioxidante, que desempeña un papel vital en la prevención de las enfermedades neuronales y cardiovasculares, el cáncer y la diabetes, entre otros<sup>46</sup>. Hay varios informes centrados en el efecto de las antocianinas en los tratamientos contra el cáncer<sup>47</sup>, la nutrición humana y su actividad biológica<sup>48</sup>. Por lo tanto, debido al enorme potencial de las antocianinas naturales como pigmentos saludables, hay un número creciente de informes encontrados en la literatura sobre diversos campos

---

<sup>41</sup> GROTEWOLD, Erich. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer (2006). [On-line]. Available in: <<http://rushim.ru/books/mechanizms/the-science-of-flavonoids.pdf>>

<sup>42</sup> PAZMIÑO-DURÁN, Alexandra. *et al. Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants*. In: Food Chemistry. November, (2001), vol. 75(2). p. 211–216.

<sup>43</sup> KONG, Jin Ming, *et al. Analysis and Biological Activities of Anthocyanins*. In: Phytochemistry. (2003). vol. 64(5). p. 923–33.

<sup>44</sup> HEDIN, P. A. *et al. Plant Resistance to Insects*. In: American Chemical Society, Washington, DC, P. A. Hedin (Ed.). (1983). p. 347.

<sup>45</sup> GIULIANI, A. *Properties and Determination of Natural Pigments*. In: Encyclopedia of Food and Health Colors 1st ed. Elsevier Ltd. (2016). p. 274.

<sup>46</sup> KONCZAK, Izabela and ZHANG, Wey. *Anthocyanins-more than nature's colours*. In: Journal of Biomedicine and Biotechnology. December, (2004). vol. 5. p. 239–240.

<sup>47</sup> Nichenametla, S. N, Taruscio, T. G, Barney, D. L and Exon, J. H. *A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer*. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 46(2). p. 161–183.

<sup>48</sup> STINTZING, Florian C. and CARLE, Reinhold. Op. Cit. p. 286



tales como: desarrollo de técnicas analíticas para su purificación y separación<sup>49</sup>, aplicaciones en alimentos<sup>50</sup>, identificación y distribución en plantas<sup>51</sup>, seguimiento del color y cambios en el pigmento<sup>52</sup>, biosíntesis<sup>53</sup>, análisis cuantitativo utilizando técnicas cromatográficas y electroforéticas<sup>54</sup> y el efecto en el estrés de las plantas<sup>55</sup>.

#### 2.1.7.1. Estructura química de las antocianinas

Los flavonoides tienen un esqueleto de tres anillos de base. Las diferentes clases de flavonoides se distinguen por la oxidación del anillo C central. Las antocianinas comparten una estructura central de cromóforos, llamada antocianidina (aglicona), que varía solo en el número y la posición de los grupos hidroxilo y/o metilo. La adición de un resto de azúcar a esta base antocianidina forma la antocianina. Se han identificado al menos 18 antocianidinas diferentes de la naturaleza, pero las seis hidroxiantocianidinas son por mucho los tipos más comunes que se encuentran en las plantas superiores: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina. Estos se diferencian solo por tener uno, dos o tres grupos hidroxilo en el anillo B y si estos están metilados posteriormente<sup>56</sup>.

La modificación del anillo B tiene un efecto dramático en el color manifestado, si hay más grupos hidroxilo, entonces el color va hacia un tono más azulado; si hay más grupos metoxilo, entonces el enrojecimiento aumenta<sup>57</sup>. Por lo tanto, la pelargonidina es la base de muchos colores naranja a rojo, cianidina/peonidina rojo a púrpura, y delphinidina/ petunidina/malvidina<sup>58</sup>. Muchos factores, es decir, pH, calor, luz, metales y copigmentación, pueden afectar su estabilidad, color, tono y

---

<sup>49</sup> ANTOLOVICH, Michael, PRENZLER, Paul, ROBARDS, Kevin and Ryan, Danielle. *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*. In: *Analyst*. April, (2000). vol. 125(5). p. 989–1009.

<sup>50</sup> GIUSTI, Mónica y WROLSTAD, Ronald. *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. In: *Biochemical Engineering Journal*. June, (2003), vol. 14(3). p. 217–225.

<sup>51</sup> COOPER-DRIVER, Gillian. A. *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*. In: *Phytochemistry*. February, (2001), vol. 56(3). p. 229–236.

<sup>52</sup> BROUILLARD, R, CHASSAING, S and FOUGEROUSSE, A. *Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why it that red wine color lasts is so long* In: *Phytochemistry*. December, (2003), vol. 64(7). p. 1179–1186.

<sup>53</sup> MARTENS, Stefan, *et al.* *Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues*. In: *Biochemical Engineering Journal*. June, (2003). vol. 14(3). p. 227–235

<sup>54</sup> DA COSTA, Cristina, HORTON, Derek, and MARGOLIS, Sam. *Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis*. In: *Journal of Chromatography A*. June, (2000). vol. 881(1–2). p. 403–410.

<sup>55</sup> SIMMONDS, M. S. J. *Flavonoid–insect interactions: Recent advances in our knowledge*. In: *Phytochemistry*. Septiembre, (2003). vol. 64(1). p. 21–30.

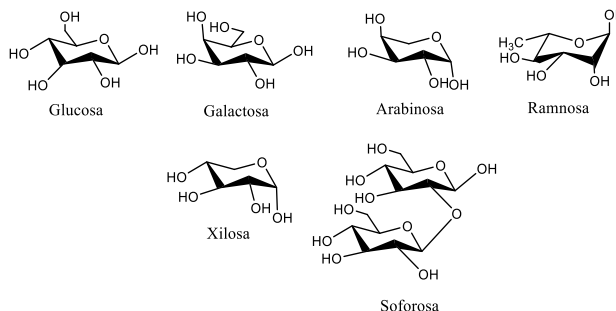
<sup>56</sup> DAVIES, K.M., K.E. SCHWINN, and K.S. GOULD. *Anthocyanins*. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 2. p. 355–63. (2017).

<sup>57</sup> DELGADO-VARGAS, Francisco y PAREDES-LÓPEZ, Octavio. In: *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. Boca Raton: CRC Press, (2003). p. 167-168.

<sup>58</sup> DAVIES, K.M., K.E. SCHWINN, and K.S. GOULD. *Anthocyanins*. In: *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* 2. p. 355–63. (2017).

densidad. En condiciones ácidas, los ocho enlaces conjugados en las estructuras de antocianinas que llevan una carga positiva en el anillo heterocíclico de oxígeno son responsables del intenso color rojo-naranja a azul-violeta. Muestran una longitud de onda de adsorción máxima entre 465 y 550 nm y una absorción significativa en el rango de UV entre 270 y 280 nm<sup>59</sup>. Como se mencionó anteriormente, para obtener una antocianina, la antocianidina debe combinarse con al menos una molécula de azúcar; así, las antocianinas glicosiladas también se pueden clasificar por el número de moléculas de azúcar en su estructura por ejemplo, monoglucósidos (un azúcar), diglucósidos (dos azúcares) y triglucósidos (tres azúcares)<sup>60</sup>. Los azúcares que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, xilosa y la arabinosa, ocasionalmente, la gentobiosa, la rutinosa y la soforosa (Figura 8). El azúcar que generalmente se une a la antocianidina en la posición 3 del grupo fenólico, pero que también puede hacerlo rara vez en las posiciones 5 y 7<sup>61</sup> les confiere a las antocianinas una gran solubilidad y estabilidad. Una estructura generalizada para los pigmentos de antocianinas se muestra en la figura 9 junto con las más comunes en la tabla 2<sup>62</sup>. La diversidad de estos compuestos se incrementa aún más por la combinación química de estos azúcares con ácidos orgánicos que pueden ser alifáticos o aromáticos y dan origen a las antocianinas aciladas<sup>63</sup>. Algunos ácidos más comunes son los ácidos cumárico, caféico, ferúlico, p-hidroxibenzoico, sináptico, malónico, acético, succínico, oxálico y málico<sup>64</sup>.

Figura 8. Estructura de azúcares más comunes en antocianinas



Fuente: Recopilado de PRIOR, Ronald L and XIANLI Wu. (2012)

<sup>59</sup> GIULIANI, A. Op. cit. p. 274

<sup>60</sup> DELGADO-VARGAS, Francisco and PAREDES-LÓPEZ, Octavio. Op. cit. p. 167

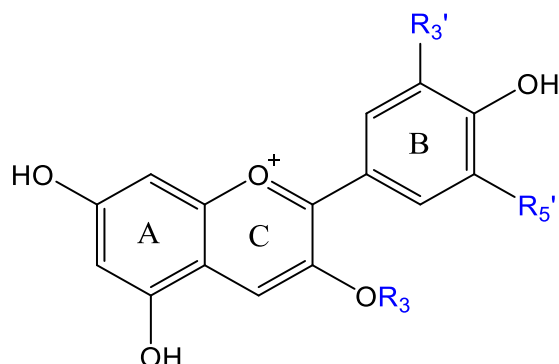
<sup>61</sup> AGUILERA-ORTÍZ, Miguel, VARGAS María del Carmen, CHEW-MADINAVEITA Gerardo y VELÁZQUEZ Jorge Armando. *Propiedades Funcionales de las Antocianinas*. En: Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Agosto, (2011). vol. 13(2). p. 16.

<sup>62</sup> ROSE, Paul M. *et al.* *Application of Anthocyanins from Blackcurrant (Ribes Nigrum L.) Fruit Waste as Renewable Hair Dyes*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2018). vol. 66. p. 6790–6798.

<sup>63</sup> PRIOR, Ronald L and XIANLI Wu. *Analysis Methods of Anthocyanins*. In: Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, chapter 5. First edition. (2012). John Wiley & Sons, Ltd. p. 149–180.

<sup>64</sup> BENOIT, I. *et al.* *Gene Overexpression and Biochemical Characterization of the Biotechnologically Relevant Chlorogenic Acid Hydrolase from Aspergillus niger*. In: Applied and Environmental Microbiology. (2007). vol. 73 (17): p. 5624-5632.

Figura 9. Estructura básica de una antocianina



Fuente: Recopilado de ROSE, Paul M. *et al.* (2018)

Tabla 2. Antocianinas comunes, estructura, color y absorción máxima

ANTOCIANINA	SUSTITUCIÓN			COLOR	$\lambda_{vis-m\acute{a}x}^a$
	R <sub>3</sub>	R <sub>3'</sub>	R <sub>5'</sub>		
<b>Pelargonidina-3-glucósido</b>	Glc	H	H	Anaranjado	503
<b>Cianidina-3-glucósido</b>	Glc	OH	H	Anaranjado-rojo	517
<b>Delfinidina-3-glucósido</b>	Glc	OH	OH	Azul-rojo	526
<b>Peonidina-3-glucósido</b>	Glc	OCH <sub>3</sub>	H	Anaranjado-rojo	517
<b>Petunidina-3-glucósido</b>	Glc	OCH <sub>3</sub>	OH	Azul-rojo	526
<b>Malvidina-3-glucósido</b>	Glc	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	Azul-rojo	529

<sup>a</sup> Los valores de  $\lambda_{vis-m\acute{a}x}$  indicados son para el 3-O-glucósido correspondiente en agua a pH 3.

Fuente: Recopilado de ROSE, Paul M. *et al.* (2018)

#### 2.1.7.2. Características espectrales de las antocianinas

La espectroscopia UV-Vis es una técnica valiosa que puede proporcionar información cualitativa y cuantitativa, requiriendo para ello, baja concentración del material puro y bajos costos<sup>65</sup>. Gracias a esta técnica se puede obtener información sustancial de las características espectrales de los antocianos. Todas las antocianinas muestran dos bandas distintivas de absorción, una en la región UV (260 a 280 nm) y otra en la región visible (490 a 550 nm). La forma del espectro puede proporcionar información sobre el número y la posición de las sustituciones glicosídicas y el número de acilaciones. La longitud máxima de absorción se

<sup>65</sup> CASSASA, F; SARI, Santiago. *Aplicación de los sistemas CIELAB a los vinos tinto. Correlación con algunos parámetros tradicionales*. En: Revista de Enología y Vinicultura. (2006). vol. 63; p. 5669-5684.

relaciona con el patrón de hidroxilación; por ejemplo, en una solución de metanol acidificada, la pelargonidina 3-glucósido exhibe una  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorción alrededor de 505 nm, la cianidina y la peonidina 3-glucósido tienen una  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 520 y 526 nm mientras que la delfinidina, malvidina y petunidina muestran una  $\lambda_{\text{máx}}$  entre 532 y 537 nm<sup>66</sup>.

Gracias a la relación estructura - longitud de onda máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ), se puede obtener información sobre la estructura de la antocianina. Por ejemplo, la relación entre ( $A_{440}/ A_{\lambda_{\text{vis-máx}}}$ ), indica la posición de la glicosilación, de manera que valores mayor o igual a 0,3 indica que la glicosilación estará en la posición 3, pero si la relación es menor de 0,2 indica que la antocianina tiene dos glicosilaciones en la posición 3 y 5<sup>67</sup>. Adicionalmente, la presencia de grupos acilo se ve reflejada en el espectro por la presencia de una tercera banda de absorción en la región de 310 a 360 nm, la relación de absorbancia a estas longitudes de onda ( $A_{\text{acil-máx}} / A_{\lambda_{\text{vis-máx}}}$ ), da una estimación de la presencia de acilaciones, por lo que, valores menores a 0,4 indica que no existen acilaciones, mientras que valores entre 0,5 y 0,7 determina la presencia de grupos acilo<sup>68</sup>.

### 2.1.7.3. Factores que determinan el color y la estabilidad de las antocianinas

❖ pH: Las antocianinas son compuestos bastante inestables y tienen una estabilidad máxima en condiciones ácidas. Al contrario de muchos otros colorantes naturales, el pH tiene un gran efecto sobre el color de las antocianinas porque la protonación y desprotonación de la molécula cambia y rompe el sistema de doble enlace conjugado que le da a la molécula su color<sup>69</sup>. En ambientes ácidos, las antocianinas existen como cuatro especies principales de equilibrio: la base A quinonoidal, el catión flavilio (AH<sup>+</sup>), el carbinol o pseudobase B y la chalcona C (Figura 10)<sup>70</sup>.

---

<sup>66</sup>HEREDIA, Fafar., FRANCIA-Aricha, E.M., RIVAS, Julián., VICARIO, Isabel and SANTOS Celestino. *Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. I. pH effect.* In: Food Chemistry. Diciembre (1998). vol. 63. p. 491-498.

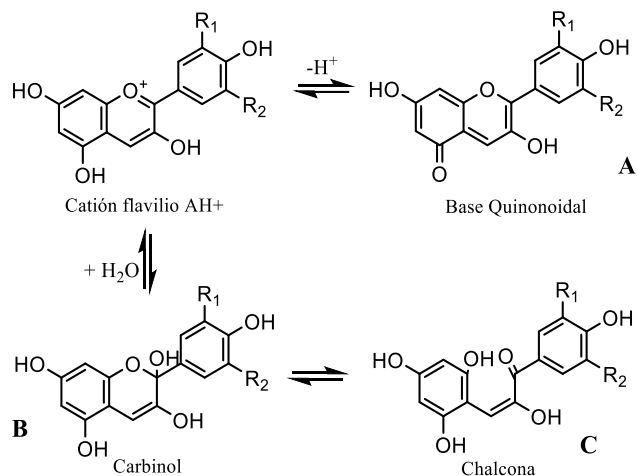
<sup>67</sup>ESCRIBANO, Teresa; SANTOS, Celestino and RIVAS, Gonzalo. *Anthocyanins in cereals.* In: Journal of chromatography. October (2004). vol. 1054. p. 129-141.

<sup>68</sup>GIUSTI, Mónica; RODRIGUEZ, Luis and WROLSTAD Ronald. *Molar absorptivity and color characteristics of acylated and nonacylated pelargonidin-based anthocyanins.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. October (1999). vol. 47. p. 4631-4637.

<sup>69</sup>JORDHEIM, Mónica. *Isolation, identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms.* In: Department of Chemistry, University of Bergen. Allégt. 41, 5007 Bergen, Norway (2007). p. 93.

<sup>70</sup>REIN, Maarit. *Copolymerization reactions and color stability of berry anthocyanins.* In: Department of Applied Chemistry and Microbiology. Division of Food Chemistry. University of Helsinki, (2005). p. 67.

Figura 10. Formas principales de equilibrio de la antocianina en medio acuoso



Fuente: Recopilado de REIN, Maarit (2005).

En un medio muy ácido (pH 0.5), el catión flavilio rojo es la única especie de equilibrio predominante. El aumento del pH provoca una disminución tanto de la intensidad del color como la concentración del catión flavilio pues este sufre un ataque nucleofílico por parte del agua y cambia a la forma incolora del carbinol, la cual ha perdido su doble enlace conjugado entre los anillos A y B y, por lo tanto, no absorbe la luz visible<sup>71</sup>. También se produce una rápida pérdida de protones del catión flavilio a medida que el pH se incrementa y aumenta la forma quinonoidal coloreada. Cuando el pH aumenta aún más, se produce la forma de carbinol y a través de la apertura del anillo, se forma la chalcona incolora. Las cantidades relativas de cada forma de equilibrio varían con el valor del pH y la estructura de una cierta antocianina<sup>72</sup>.

❖ **Temperatura:** La tasa de degradación de las antocianinas aumenta durante el procesamiento y almacenamiento a medida que aumenta la temperatura<sup>73</sup>. El incremento de la temperatura entre valores de pH 2 y 4 induce la pérdida del azúcar glicosilante de las antocianinas pues se produce la hidrólisis del enlace glicosídico, esto conduce a una mayor pérdida de color ya que las agliconas son menos estables que sus formas glicosídicas. Se postula que la formación de una chalcona es el primer paso en la degradación térmica de las antocianinas. Finalmente, la

<sup>71</sup> BROUILLARD R, MAZZA G, SAAD Z, ALBRECHT-Gary AM and CHEMINAT A. *The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions.* In: J Am Chem Soc. May (1989). vol. 111. p. 2604-2610.

<sup>72</sup> JACKMAN RL, SMITH JL. *Antocianinas y betalainas.* En: Hendry GAF, Houghton JD (eds) *Colorantes alimentarios naturales.* Springer, Boston, MA. (1996) p.244-309.

<sup>73</sup> MACCARONE Emanuele, MACCARRONE Angelo and RAPISARDA Paolo. *Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice.* In: Journal Food Science. (1985). vol. 50. p. 901-904.

degradación térmica conduce a productos marrones, especialmente en presencia de oxígeno.<sup>74</sup>

❖ Efecto de copigmentación: La copigmentación es un fenómeno en el que los pigmentos y otros compuestos orgánicos incoloros, o iones metálicos, forman asociaciones moleculares o complejas, generando un cambio o un incremento en la intensidad del color<sup>75</sup>. En la industria, este fenómeno se considera una interacción muy importante ya que el color es uno de los principales factores de calidad en la aceptación de un producto. Algunas investigaciones sugieren que la copigmentación de las antocianinas con otros compuestos (co-pigmentos) es el principal mecanismo de estabilización del color en las plantas<sup>76</sup>.

Los co-pigmentos son sistemas ricos en electrones  $\pi$  que pueden asociarse con iones flavilio, los cuales son bastante pobres en electrones. Esta asociación, proporciona protección contra el ataque nucleofílico del agua en la posición 2 del ion flavilio y para otras especies como los peróxidos y el dióxido de azufre en la posición 4<sup>77</sup>. Los co-pigmentos son generalmente incoloros, pero cuando se mezclan con una solución antociánica, se lleva a cabo una interacción que produce un efecto hiperacrómico y un cambio batocrómico en los espectros de absorción (región UV-Vis). Los co-pigmentos pueden ser flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales u otra antocianina<sup>78</sup>. La interacción antocianina-co-pigmento puede llevarse a cabo de cinco maneras diferentes dependiendo de las especies que interactúan. Si el co-pigmento es otra antocianina, se forma una autoasociación o una co-pigmentación intramolecular; cuando la interacción es con un metal, se lleva a cabo una complejación; en el caso de los co-pigmentos con pares de electrones libres, tiene lugar una pigmentación intermolecular. Finalmente, en el caso más complejo, la pigmentación conjunta puede llevarse a cabo por aglicón, azúcar, pigmento y protones al mismo tiempo<sup>79</sup>.

---

<sup>74</sup> ADAMS JB. *Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of Cyanidin I. In acidified aqueous solution at 100°C.* In: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. March (1973). vol. 24. p.747-762.

<sup>75</sup> BOULTON, Roger. *The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review.* In: *American Journal of Enology and Viticulture*. June (2001). vol. 52. p. 67–87.

<sup>76</sup> MAZZA, Giuseppe and BROUILLARD, Raymond. *The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions.* In: *Phytochemistry*. (1990). vol. 29(4). p. 1097–1102.

<sup>77</sup> MATSUFUJI, Hiroshi, et al. *Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals.* In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. May (2003). vol. 51(10). p. 3157–3161

<sup>78</sup> GARCÍA, Cristina and BRIDLE, Peter. *Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid.* In: *Food Chemistry*. January (1999) vol. 64(1). p. 21–26.

<sup>79</sup> CASTAÑEDA, Araceli., PACHECO, Lourdes., PÁEZ, M. Elena., RODRÍGUEZ, José and GALÁN Carlos. *Chemical studies of anthocyanins: A review.* In: *Food Chemistry*. September (2009). vol. 113(4). p. 859–871.

### 2.1.8. Las antocianinas como antioxidantes

Los radicales libres son necesarios para el estado vivo de las células y los organismos<sup>80</sup>. Algunos radicales libres, como el óxido nítrico, el anión radical superóxido y las especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o las especies reactivas de nitrógeno (RNS) ayudan las células en los procesos de señalización<sup>81</sup>. Sin embargo, la homeóstasis redox podría estar fuera de balance y se produce lo que se conoce como estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un estado desequilibrado, donde cantidades excesivas de ROS/RNS superan la capacidad antioxidante endógena, lo que lleva a la oxidación de enzimas, proteínas, ADN y lípidos. El estrés oxidativo es importante en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, incluidas las enfermedades coronarias, el cáncer y el envejecimiento<sup>82</sup>. Los antioxidantes pueden definirse como compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de materiales oxidables al eliminar los radicales libres y disminuir el estrés oxidativo.

La capacidad de los compuestos fenólicos para capturar los radicales libres depende de su estructura, en particular, de los átomos de hidrógeno del grupo aromático que pueden transferirse al radical libre<sup>83</sup> y de la capacidad del compuesto aromático para hacer frente al desacoplamiento de electrones como resultado del desplazamiento circundante del sistema de electrones  $\pi$ . La estructura química de las antocianinas es apropiada para actuar como antioxidantes, ya que pueden donar hidrógeno o electrones al radical libre o atraparlos y deslocalizarlos en su estructura aromática<sup>84</sup>.

El patrón de hidroxilación influye en la actividad antioxidante<sup>85</sup>, la cual es la base de muchos efectos beneficiosos para la salud de los flavonoides. Los grupos hidroxilo en las posiciones 3 'y 4' proporcionan una alta estabilidad al radical formado atrapando radicales libres y desplazando los electrones en el anillo B, así como los grupos hidroxilo libres en la posición 3 del anillo C, y en la posición 5 del anillo A , junto con el grupo carbonilo en la posición 4. Hay tres criterios estructurales importantes para evaluar la efectividad antirradical de un compuesto: (1) la

---

<sup>80</sup> DRÖGE Wulf. *Free radicals in the physiological control of cell function*. In: American Journal of Physiology (2002). vol. 82. p. 47-95.

<sup>81</sup> JING Pu. *Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemopreventive activity and structure/function relationships*. Thesis Ph.D. (2006). Ohio State University, U.S.A. p. 5-90.

<sup>82</sup> DAI Jin and MUMPER Russell. *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. In: Molecules. October (2010). vol. 15. p. 7313- 7352.

<sup>83</sup> MARTÍN Julia, SÁEZ Purificación, RAMOS Fernando, JÍMENEZ Ana María and FETT Agustín. *Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins*. In: Critical Reviews in Analytical Chemistry. March (2012). vol. 42(2). p.126-151.

<sup>84</sup> TIRZITIS Gunars and BARTOSZ Grzegorz. *Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights*. In: Acta Biochimica Polonia. February (2010), vol. 57(1). p. 139-142.

<sup>85</sup> HALBWIRTH Heidi. *The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway*. In: International Journal of Molecular Sciences. February (2010). vol. 11(2). p. 595-621.

presencia de grupos hidroxilo vecinos, es decir, en la posición del anillo B; (2) dobles enlaces en la conjugación 4-oxo del anillo C; y (3) grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 del anillo A. Los aglicones con hidroxilación idéntica en los anillos A y C, y un solo grupo OH en el anillo B (4'-OH), que incluye pelargonidina, malvidina y peonidina, tienen una actividad antioxidante menor cuando se comparan con los compuestos con los grupos 3',4' di-OH sustituidos (por ejemplo, cianidina)<sup>86</sup>.

### 2.1.9. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS

La extracción con solventes ha sido el método más común para la extracción de diversos compuestos que se encuentran en las frutas, incluidos los flavonoides. Las antocianinas son moléculas polares, por lo que los disolventes más comunes utilizados en las extracciones son mezclas acuosas de etanol, metanol o acetona<sup>87</sup>. Estas metodologías implican la co-extracción de sustancias no fenólicas como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas que requieren procesos de purificación posteriores (por ejemplo, extracción en fase sólida, SPE). Entre los métodos más comunes se encuentran aquellos que utilizan metanol o etanol acidificado como extractantes, sin embargo, en la industria se prefiere el etanol debido a la toxicidad del metanol.

En las extracciones con solventes acidificados se debe tener mucho cuidado y evitar los medios ácidos fuertes ya que las antocianinas aciladas podrían degradarse (reacción de hidrólisis) y en el caso de las antocianinas 3-monósido, los enlaces glucosídicos podrían destruirse<sup>88</sup>, de igual forma pueden causar la formación de aductos incoloros<sup>89</sup>. De acuerdo con los métodos de extracción reportados en la literatura, se puede observar que para extraer antocianinas aciladas y 3,5-diglucósidos, es necesario usar medios débilmente ácidos para evitar su hidrólisis como ácido fórmico o ácido acético<sup>90</sup>.

---

<sup>86</sup> BORS Wolf, MICHEL Christa and STETTMAIER Kurt. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. *In: Methods in Enzymology Methods Enzymol.* January (2001). vol. 335. p.166-180.

<sup>87</sup> KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I and HEINONEN, M. *Berry phenolics and their antioxidant activity.* *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry.* August (2001). vol. 49(8). p. 4076–4082.

<sup>88</sup> KAPASAKALIDIS, Petros., RASTALL, Robert., and GORDON, Michael. *Extraction of polyphenols from processed black currant (Ribes nigrum L.) residues.* *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (2006). vol. 54(11). p. 4016–4021.

<sup>89</sup> BERKÉ, Benedicte., CHÈZE, Catherine., VERCAUTEREN, Joseph and DEFFIEUX, Gérard. (1998). *Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts.* *In: Tetrahedron Letters.* vol. 39(32). p. 5771–5774.

<sup>90</sup> LEE, Jungmin., DURST, Robert and WROLSTAD, Ronald *Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments.* *In: Journal of Food Science.* (2002). vol. 67(5). p. 1660–1667.



Una purificación eficaz garantiza una mejor caracterización de los compuestos y, por lo tanto, una información espectral más confiable<sup>91</sup>. Los métodos de extracción propuestos hasta ahora no son selectivos para antocianinas, ya que son capaces de co-extraer una gran cantidad de otros compuestos, como azúcares o ácidos orgánicos<sup>92</sup>. En consecuencia, es necesario implementar nuevas técnicas de purificación para aislar las antocianinas de interés. En este sentido, se han propuesto una amplia variedad de técnicas; desde extracciones en fase sólida (SPE) y líquido-líquido (LLE)<sup>93</sup> hasta el uso de técnicas cromatográficas sofisticadas como la cromatografía contracorriente (CCC)<sup>94</sup>, cromatografía líquida de presión media (MPLC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)<sup>95</sup>. La SPE comúnmente se lleva a cabo en cartuchos C18 o Sephadex, en los que las antocianinas están fuertemente unidas a través de sus grupos hidroxilo y se separan posteriormente de otros compuestos al aumentar la polaridad con diferentes solventes<sup>96</sup>. La cromatografía en columna (CC) se ha utilizado con varios tipos de resinas o soportes no sólo para la purificación sino también para la separación. Por ejemplo, la Amberlita XAD-7 puede eliminar proteínas, mucílagos, pectinas y solutos de bajo peso molecular; y la Sephadex G-25 puede fraccionar las mezclas de polisacáridos, polipéptidos, proteínas globulares y ácidos nucleicos<sup>97</sup>.

#### 2.1.9.1. Métodos de caracterización de antocianinas

Se han desarrollado numerosos métodos para la caracterización de antocianinas. Generalmente, los análisis de rutina involucran técnicas espectrofotométricas y cromatográficas. La cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) con columnas C<sub>18</sub> es el método habitual de elección para separar las antocianinas en diferentes fuentes. Con estas columnas, el patrón de elución de las antocianinas depende principalmente de los coeficientes de partición entre la fase móvil y la fase estacionaria C<sub>18</sub>, y de la polaridad de los analitos. La fase móvil

<sup>91</sup> JAMPANI, Chandrasekhar., NAIK, Aduja and RAGHAVARAO, KSMS. *Purification of anthocyanins from jamun (Syzygium cumini L.) employing adsorption*. In: Separation and Purification Technology. (2014). vol. 575 (125). p. 170-178.

<sup>92</sup> COUTINHO, M. R., QUADRI, M., MOREIRA, R., and QUADRI, N. *Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage)*. In: Separation Science and Technology. July (2010). vol. 39(16). p.3769–3782

<sup>93</sup> FOSSEN, Torgils., and ANDERSEN, Øyvind. *Anthocyanins from red onion, Allium cepa, with novel aglycone*. In: Phytochemistry. April (2003). vol. 62(8). p. 1217–1220.

<sup>94</sup> SCHWARZ, Michael., WABNITZ, Tobias. C., and WINTERHALTER, Peter. *Pathway leading to the formation of anthocyanin–vinylphenol adducts and related pigments in red wines*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry, June (2003). vol. 51(12). p. 3682–3687.

<sup>95</sup> ALCALDE, Cristina., ESCRIBANO Teresa., SANTOS, Celestino., and RIVAS, Julian. C. *Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography*. In: Analytica Chimica. (2004). Acta, 513(1:18). p. 305–318

<sup>96</sup> DA COSTA, Cristina, HORTON, Derek, and MARGOLIS, Sam. Op cit. p. 403–410. (2000)

<sup>97</sup> ELLA Missang, CREPIN., Guyot, Sylvain., and RENARD, Catherine. *Flavonols and anthocyanins of bush butter, Dacryodes edulis (G. Don) H.J. Lam, Fruit. Changes in their composition during ripening*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003). vol. 51(25). p. 7475–7480

generalmente consiste en solvente A (agua: ácido carboxílico, 90:10) y solvente B (metanol o acetonitrilo: ácido carboxílico, 90:10). El medio ácido permite el desplazamiento completo del equilibrio al catión flavilio, lo que resulta en una mejor resolución y una gran absorbancia característica entre 515 y 540 nm, lo que explica la aplicación universal de la detección de DAD para la cuantificación de antocianinas. El orden de elución en las columnas C<sub>18</sub> es normalmente una función del número de grupos hidroxilo y su grado de metoxilación: (delfinidina < cianidina < petunidina < pelargonidina < peonidina < malvidina), junto con el número de glucósidos y su patrón de acilación (diglucósidos < monoglucósidos < acetilglucósidos < cafeína glucósidos < cumaroil-glucósidos<sup>98</sup>.

Los procedimientos de separación descritos anteriormente, especialmente la técnica de HPLC de fase inversa, han demostrado ser muy útiles, y la HPLC acoplada a la detección de matriz de diodos (DAD) se ha convertido en el método de elección para monitorear los perfiles antocianínicos. Con esta técnica, la identificación de compuestos se basa principalmente en el espectro UV-vis o el tiempo de retención en comparación con los compuestos estándar. Sin embargo, la detección de DAD no es suficiente para discriminar entre compuestos con características espectroscópicas similares y la falta de compuestos de referencia para la comparación hace que la espectrometría de masas sea una técnica de apoyo en la caracterización de antocianinas<sup>99</sup>.

Dado que los detectores UV-vis no pueden diferenciar los compuestos co-eluidos, la información de la estructura y la capacidad de identificación del compuesto que proporcionan estos métodos son muy limitadas. Por lo tanto, se necesita un análisis confirmatorio utilizando instrumentos más avanzados. La HPLC acoplada con un espectrómetro de masas de ionización por electrospray (MS), especialmente el espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) puede proporcionar espectros de masas de iones moleculares intactos e iones de fragmentos. Los picos se pueden identificar categóricamente al comparar su espectro de masas y el tiempo de retención con los compuestos de referencia. La información estructural de los métodos HPLC-ESI-MS permite verificar los resultados del perfil de antocianinas obtenidos por los sistemas HPLC-DAD.

La ionización por electrospray (ESI) en modo positivo es la elección unánime de detección para el análisis de las antocianinas. Se sabe que esta es una técnica de ionización suave que produce, en el modo de ion positivo, moléculas protonadas. Los compuestos bajo análisis están presentes en condiciones ácidas como iones

---

<sup>98</sup> GARY, Takeoka and LAN. Dao. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* In: W.J. Hurst (Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008, p. 247.

<sup>99</sup> NICOLETTI Isabella, BELLO Cristiano, DE ROSSI Antonella and CORRADINI Danilo. *Identification and quantification of phenolic compounds in grapes*. In: Journal Agriculture. Food Chemistry. (2008). vol. 56. p. 8801–8808.

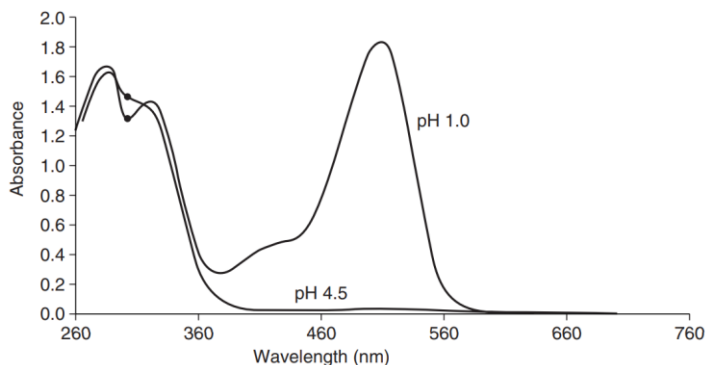
de flavilio. Por lo tanto, la producción de cationes moleculares  $M^+$  en sus espectros de masas ESI debería ocurrir de manera ideal con los rendimientos más altos<sup>100</sup>.

## 2.1.10. OTROS MÉTODOS DE ANÁLISIS

### 2.1.10.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas mediante el método del pH diferencial

Las antocianinas cambian de color de manera reversible con el pH, lo que limita su aplicación como colorantes en la industria, sin embargo proporcionan un método fácil y conveniente de medir la concentración total del pigmento<sup>101</sup>. Este método simple puede ser inapropiado en algunos casos debido a las interferencias de los productos de degradación de antocianinas. En un intento por superar esta deficiencia, se ha utilizado el método sustractivo o diferencial para cuantificar las antocianinas separadas de sus productos de degradación<sup>102</sup>. El método diferencial mide la absorbancia a dos valores de pH diferentes (Figura 11) y se basa en las transformaciones estructurales del cromóforo de antocianina en función del pH.

Figura 11. Características espectrales de antocianinas en tampones de pH 1.0 y pH 4.5



Fuente: Recopilado de GIUSTI, Mónica y WROLSTAD, Ronald. E. (2001).

Las muestras se diluyen con tampones acuosos a pH 1.0 y 4.5 y las mediciones de absorbancia se toman a la longitud de onda máxima de la solución de pH 1.0. La diferencia en la absorbancia entre las dos soluciones tampón se debe únicamente a las antocianinas monoméricas y no a las poliméricas ya que estos no muestran

<sup>100</sup> CHAOVANALIKIT, Arusa; THOMPSON Maxine y WROLSTAD Ronald. *Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L.)*. In: Journal of agricultural and food chemistry. (2004). vol. 52. p. 848–852.

<sup>101</sup> GIUSTI, Mónica., and WROLSTAD, Ronald. E. *Anthocyanins. Characterization and measurement with UV-visible spectroscopy*. In: R.E.Wrolstad (Ed.), and Food Analytical Chemistry. New York: Wiley. (2001). UNIT F1.2 y F1.2.13.

<sup>102</sup> JACKMAN R.L, SMITH J.L. *Antocianinas y betalaínas*. Op. cit. p.244-309. (1996).

un comportamiento reversible con el pH y, por lo tanto, se excluyen del cálculo de absorbancia<sup>103</sup>. La determinación de la concentración de antocianinas totales se realiza calculando la absorbancia por medio de la siguiente ecuación:

$$A = (A_{\lambda_{\text{máx-vis}}} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{\lambda_{\text{máx-vis}}} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

En donde A es la absorbancia a la longitud de onda máxima y a 700 nm tanto a pH 1.0 como a pH 4.5. La concentración total de antocianinas monoméricas en la muestra original será:

$$\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \left(\frac{A * PM * FD * 1000}{\varepsilon * l}\right)$$

Donde A (absorbancia anteriormente calculada), PM es el peso molecular de la cianidina-3-glucósido (449,2 g/mol), FD es el factor de dilución, *l* es el espesor de la celda y  $\varepsilon$  es la absorptividad molar de la cianidina-3-glucósido (26900 L/mol\*cm). El PM y  $\varepsilon$  usadas en la ecuación corresponden a la antocianina predominante en la muestra, pero si es desconocida, los resultados se expresan como mg de cianidina-3-glucósido en 1 L de extracto. La concentración final de antocianinas monoméricas se calcula en base al volumen de extracto y peso utilizado de la muestra.

#### 2.1.10.2. Cuantificación de antocianinas poliméricas mediante el método de pH sustractivo

El color generado a partir de las antocianinas poliméricas se puede determinar por medio del método de pH sustractivo, el cual se basa en el uso de agentes blanqueadores como el metabisulfito de sodio usando espectroscopia UV-vis. Los pigmentos antociánicos se combinan con el metabisulfito para formar un aducto de ácido sulfónico incoloro ya que el anillo C de su estructura pierde su conjugación (Figura 12). Las antocianinas poliméricas son resistentes al blanqueo por metabisulfito, mientras que la reacción de blanqueo con los compuestos antociánicos monoméricos se completa rápidamente. Lo anterior indica que la absorbancia a la longitud de onda máxima, a 420 nm y a 700 nm dependerá únicamente de los compuestos antociánicos poliméricos. La proporción entre antocianinas monoméricas junto con sus índices de degradación son útiles en la evaluación de la calidad de alimentos en su forma natural y procesada<sup>104</sup>. Gracias a este método se pueden determinar los siguientes parámetros:

<sup>103</sup> LEE, Jumgmin., DURST, Robert., and WROLSTAD, Ronald. *Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study*. In: The Journal of the Association of Official Analytical Chemists International. (2005). vol. 88. p. 1269-1278.

<sup>104</sup> GIUSTI, Mónica and WROLSTAD, Ronald. E. Op. cit. (2001).

- *Densidad de color*: se define como la suma de las absorbancias en la longitud de onda máxima y a 420 nm. Expresa el color debido a la presencia de las antocianinas monoméricas o copolimerizadas. Este parámetro se determina para la muestra antes de ser tratada con metabisulfito de sodio.

$$\text{Densidad de color} = [(A_{\lambda 420nm} - A_{\lambda 700nm}) + (A_{\lambda Máx} - A_{\lambda 700})] * FD$$

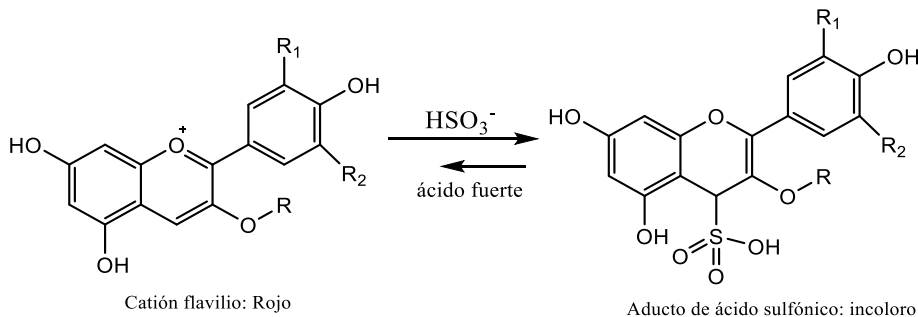
- *Color polimérico*: expresa el color debido a las antocianinas copolimerizadas y reacción de oscurecimiento (color resistente a la decoloración). Este parámetro se determina para la muestra tratada con metabisulfito de sodio.

$$\text{Color polimérico} = [(A_{\lambda 420nm} - A_{\lambda 700nm}) + (A_{\lambda Máx} - A_{\lambda 700})] * FD$$

La relación entre el color polimérico y la densidad del color se utiliza para determinar el porcentaje del color que contribuye el material polimerizado.

$$\% \text{ Color polimérico} = \left( \frac{\text{color polimérico}}{\text{densidad del color}} \right) * 100$$

Figura 12. *Reacción de las antocianinas con metasulfito de sodio*



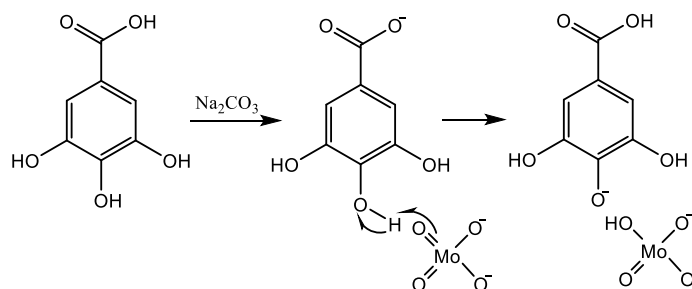
Fuente: Recopilado de GIUSTI, Mónica and WROLSTAD, Ronald. E. (2001).

### 2.1.10.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales

El contenido fenólico total (CFT) es un parámetro importante de la capacidad antioxidante total (CAT) y se usa ampliamente para la evaluación de extractos antioxidantes. La naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu no está definida claramente, pero se sabe que contiene complejos de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico de color amarillo. Este ensayo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino por parte de los compuestos fenólicos produciendo la reducción de las especies de molibdeno, formando complejos azules que pueden

ser detectados espectrofotométricamente a 750-765 nm<sup>105</sup>. Se realiza en condiciones alcalinas con la finalidad de que se genere el ion fenolato el cual reduce al reactivo de folin mediante una reacción de tipo óxido-reducción (Figura 13)<sup>106</sup>.

Figura 13. Reacción entre el ácido gálico y el reactivo de Folin Ciocalteu



Fuente: MUÑOZ, Óscar; *et al.* (2017).

El ensayo de Folin-Ciocalteu para la determinación del CFT tiene muchas ventajas, incluida su simplicidad, reproducibilidad y robustez. Sin embargo, tiene varios inconvenientes. Primero, la prueba es sensible al pH, la temperatura y el tiempo de reacción<sup>107</sup>, por lo que es necesario una selección adecuada de las condiciones de reacción para obtener resultados consistentes y confiables. En segundo lugar, existe una sobreestimación del CFT debido a la contribución de agentes reductores no fenólicos presentes en la muestra<sup>108,109</sup>. Algunos ejemplos de estos contaminantes incluyen a los azúcares reductores como fructosa glucosa y ciertos aminoácidos.

#### 2.1.11. MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE *IN-VITRO*

Existen tres mecanismos por los cuales los compuestos antioxidantes pueden detener la acción de un radical: transferencia de átomos de hidrógeno, transferencia

<sup>105</sup> MAGALHAES, Luis. M., SEGUNDO, Marcela. A., REIS, Salette., and LIMA, José. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. February (2008). In: *Analytica Chimica Acta*, 613, 1–19.

<sup>106</sup> MUÑOZ, Óscar, TORRES, Gaspar. A., NÚÑEZ José, DE LA ROSA, Laura, RODRIGO, Joaquín, AYALA Fernando., y ÁLVAREZ Emilio. *Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales*. En: *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Abril (2017). vol. 20(2). p. 23-28.

<sup>107</sup> KARADAG, Ayse., OZCELIK, Beraat and SANER, Samin. *Review of methods to determine antioxidant capacities*. In: *Food Analytical Methods*. January (2009). vol. 2, p. 41–60.

<sup>108</sup> BLASCO, Antonio. J., ROGERIO, M. C., GONZALEZ, María and ESCARPA, Alberto. *Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal*. In: *Analytica Chimica Acta*. May (2005). vol. 539. p. 237–244.

<sup>109</sup> ESCARPA, A, and GONZÁLEZ, M. C. *An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods*. *Critical Reviews*. In: *Analytical Chemistry*. June (2001). vol. 31. p. 57–139.

de electrones y una combinación de ambos<sup>110</sup>. Se han desarrollado una gran variedad de métodos para la medición de la actividad antioxidante a nivel *in-vitro* como los métodos TEAC Y DPPH los cuales combinan los dos mecanismos de acción frente a radicales libres. En cada método las condiciones de operación como pH, solubilidad, solventes y medida de la longitud de onda varían produciendo resultados diferentes<sup>111</sup>. Aunque estos métodos no pueden reproducir mecanismos antioxidante *in-vivo*, son útiles para clasificar la actividad antioxidante de sustancias y alimentos que las contienen<sup>112</sup>.

#### 2.1.11.1. Ensayo de capacidad antioxidante equivalente TROLOX (TEAC)

Este ensayo mide la capacidad que tienen los antioxidantes para eliminar el catión radical ABTS•+ (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico)), un cromóforo azul-verdoso que posee máximos de absorción a 414, 645, 734 y 815 nm y disminuye en su intensidad debido a la presencia de antioxidantes<sup>113</sup>. Se ha preferido la determinación a 734 nm debido a que la interferencia de otros componentes absorbentes y de turbidez de la muestra en esta longitud se reduce al mínimo<sup>114</sup>. El catión radical ABTS puede ser generado de diferentes maneras, por ejemplo por medio de una reacción química usando dióxido de manganeso o persulfato de potasio, por reacciones enzimáticas usando metmioglobina, peroxidasa o por alguna reacción electroquímica (Figura 14)<sup>115</sup>.

---

<sup>110</sup> RASCO, Bárbara, *et al.* Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. *In: Food Chemistry*. (2011). vol. 129(2). p. 637-644

<sup>111</sup> KAPOOR, Harish and KAUR, Charanjit. Review Antioxidants in fruits and vegetables the millennium's health. *In: International Journal of Food Science and Technology*. (2001). vol. 36(7). p. 703-725.

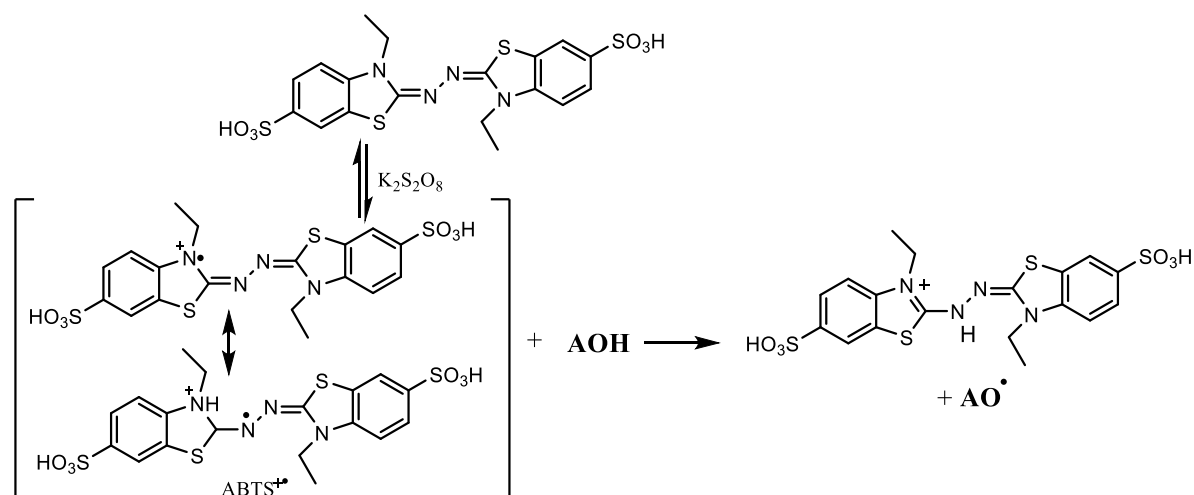
<sup>112</sup> GARCÍA PARRILLA, M.C., *et al.* Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *In: Talanta*. (2007). vol. 71(1). p. 230-235.

<sup>113</sup> SEGUNDO, Marcela, *et al.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *In: Analytica Chimica Acta*. (2008). vol. 63, p.1-19.

<sup>114</sup> ARNAO, Marino. Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case. *In: Trends in Food Science and Technology*. (2011). vol.11, p. 419-421.

<sup>115</sup> Chemistry nova. [Online]. Quoted on May 25, 2017] Available at:<<http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/images/v37n3a19-sch03.jpg>>

Figura 14. Estructura del catión radical ABTS•+ antes y después de la reacción con el antioxidante



Fuente: Image bank Quim. Nova.

Los antioxidantes pueden neutralizar el catión radical ABTS•+ ya sea por reducción directa mediante donación de electrones o mediante extinción radical a través de la donación de átomos de hidrógeno, y el equilibrio de estos dos mecanismos es generalmente determinado por la estructura antioxidante y el pH del medio<sup>116</sup>. Se ha adoptado un tiempo de reacción que va desde 1 a 30 minutos. La concentración restante de ABTS•+ se mide después de un tiempo de reacción fijo y los resultados se expresan como equivalentes de TROLOX por gramo de extracto (TEAC/g)<sup>117</sup>. Una de las ventajas de este método es que puede ser evaluada en un amplio rango de pH lo que implica un mayor análisis del efecto del pH sobre mecanismos antioxidantes. Finalmente la solubilidad del radical ABTS•+ en agua y disolventes orgánicos permite la determinación de la capacidad antioxidante tanto en muestras hidrofílicas como lipofílicas<sup>118</sup>.

<sup>116</sup> RONALD, Prior., XIANLI, Wu and SCHAICH, Karen. *Standardized Methods for the Determination of Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements Antioxidant Agric.* In: Food Chemistry. (2005). vol. 53. p. 4290-4302.

<sup>117</sup> ESTÉVES, Mario, et al. *Formation of Lysine-Derived Oxidation Products and Loss of Tryptophan during Processing of Porcine Patties with Added Avocado Byproducts.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2012). vol. 60(15). p.3917-3926.

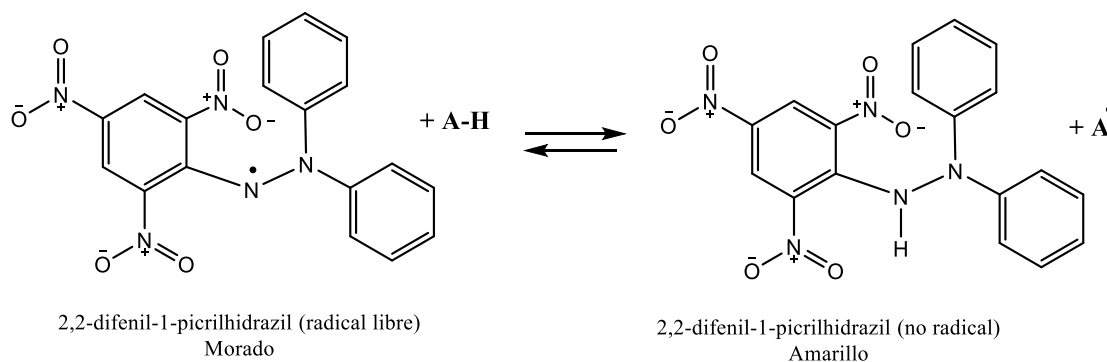
<sup>118</sup> SEGUNDO, Marcela, et al. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.* In: Analytica Chimica Acta. (2008). vol. 63. p.1-19.



### 2.1.11.2. Método DPPH

El DPPH• es un radical libre estable que reacciona con compuestos que pueden donar un átomo de hidrógeno. El mecanismo de reacción se basa en una transferencia de electrones (ET), por lo que la capacidad de eliminación de radicales DPPH• está fuertemente influenciada por el disolvente y el pH de la reacción. En este ensayo, el radical DPPH• se reduce por acción de un antioxidante a su correspondiente hidrazina de color amarillo pálido<sup>119</sup> (Figura 15). La capacidad de eliminación del radical se evalúa generalmente en medios orgánicos por medio de un seguimiento de la disminución de la absorbancia a 515-528 nm hasta que esta permanece constante<sup>120</sup>. Los resultados se interpretan como la concentración eficaz (EC<sub>50</sub>), es decir la cantidad de antioxidante necesario para disminuir en un 50% la concentración inicial de la concentración de DPPH•.

Figura 15. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante



Fuente: Recopilado de ALAM, BRISTI, and RAFIQUZZAMAN (2013).

El radical DPPH• es estable, disponible comercialmente, y no tiene que ser generado antes del ensayo como en el caso del radical ABTS•+. Por lo tanto, se considera un método espectrofotométrico fácil y útil con respecto a la detección/medición de la capacidad antioxidante tanto de compuestos puros como de muestras complejas.

<sup>119</sup> ALAM, Md.Nur; JAHAN, Nusrat and RAFIQUZZAMAN, Md. *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity.* In: Saudi Pharmaceutical Journal, 2013. Vol. 21, no.2, p.143-152.

<sup>120</sup> SEGUNDO, Marcela, et al. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.* In: Analytica Chimica Acta. (2008). vol. 63. p.1-19.

## 2.1.12. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

El color no es una propiedad intrínseca de un objeto; sino que su percepción involucra tres factores importantes. La primera es la fuente de luz, la cual puede ingresar al ojo directamente desde la fuente, por ejemplo, los semáforos o después de que los colorantes presentes en un material absorban o transmitan selectivamente parte de la luz que lo ilumina. Por lo tanto, el segundo factor importante es la reflexión o transmisión de la luz por parte del objeto, esta luz modificada entra en el ojo del observador y estimula la sensación, que se denomina color del material. El observador es, por lo tanto, el tercer factor clave que debe ser considerado. Para propósitos colorimétricos, las descripciones numéricas de cada uno de estos tres factores son necesarias. El objetivo de la colorimetría es la descripción numérica de los colores y es ampliamente utilizada en muchas industrias<sup>121</sup>.

Los fabricantes de productos de color, como textiles, pinturas, papel y cosméticos, permanentemente desean producir múltiples lotes del mismo producto y, a menudo, repetir los lotes. También muchos fabricantes requieren por contrato producir un producto de un color particular con coordenadas de color dentro de ciertas tolerancias. Por lo tanto, la colorimetría es una herramienta esencial para el control de calidad y la resolución de diferencias de observadores<sup>122</sup>.

### 2.1.12.1. El espacio de color CIELAB (1976)

El espacio de color CIELAB se desarrolló a partir de intentos anteriores para transformar los valores de triestímulo X, Y y Z en coordenadas que proporcionen un espacio de color más visualmente uniforme basado en el concepto LAB, como se describe en la teoría de la visión del color de Hering<sup>123</sup>.

Aunque las células cónicas en el ojo responden aproximadamente a la luz roja, verde y azul, los impulsos nerviosos enviados a la corteza visual son señales en términos de luminosidad ( $L^*$ ) y colores opuestos, rojo-verde ( $a^*$ ) y amarillo azul ( $b^*$ ). El valor de  $L^*$  para un color dado varía entre 100 (blanco perfecto) y 0 (negro perfecto), y da una medida de la claridad del color. El valor de  $a^*$  es una medida del carácter rojo-verde del color, con valores positivos para sombras rojas y valores

---

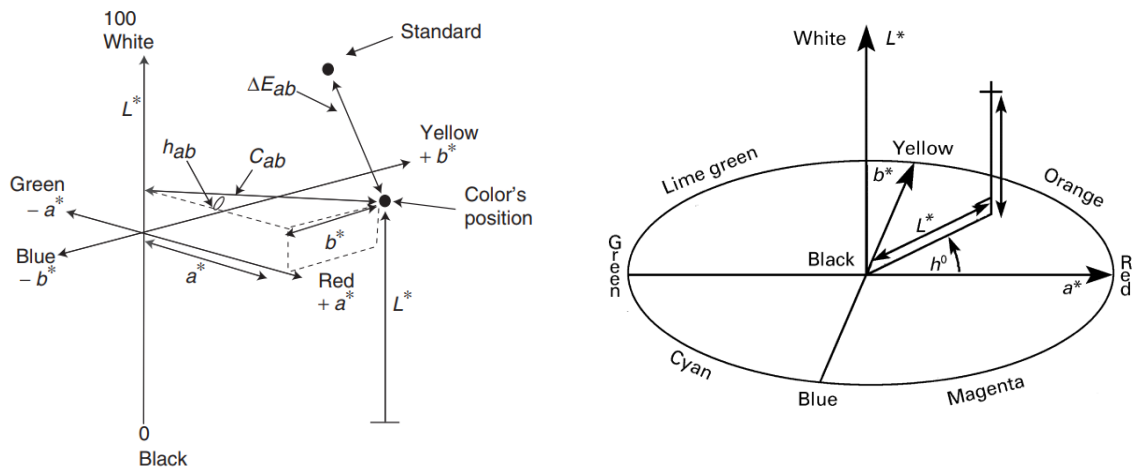
<sup>121</sup> BILLMEYER FW y SALTZMAN M. *Principles of Colour Technology*, 2nd edn. New York: Wiley. (1981).

<sup>122</sup> JUDD DB y WYSZECKI G. *Colour in Business, Science and Industry*, 3rd edn. New York: Wiley. (1975).

<sup>123</sup> SCHANDA J *Colorimetry: Understanding the CIE system*. New York, NY: Wiley. Wyszecki G and Stiles WS (1982) *Color Science*, (2007). 2nd edn. New York, NY: Wiley.

negativos para sombras verdes. El valor de  $b^*$  proporciona el carácter amarillo-azul con valores positivos para tonos amarillos y negativo para azules (Figura 16)<sup>124</sup>.

Figura 16. El espacio de color CIELAB que muestra los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}$  y  $h_{ab}$  de un color determinado y la diferencia de color  $\Delta E^*_{ab}$



Fuente: Recopilado de MCDONALD R (ed.) *Colour Physics for Industry*. (1997)

Las coordenadas de los puntos que representan el color de una muestra también se pueden expresar en coordenadas cilíndricas de luminosidad  $L^*$ , croma  $C_{ab}^*$  y tono o matiz  $h_{ab}^*$ , como se ilustra en la Figura 19. Este sistema corresponde más estrechamente a la descripción natural del color. El ángulo de tono siempre se mide en sentido contrario a las agujas del reloj desde el eje  $a^*$  positivo. Un observador humano caracteriza de manera invariable las diferencias de color en términos de diferencias de tono, croma o saturación y luminosidad. Estas coordenadas cilíndricas se corresponden así más estrechamente con la forma en que se describen los colores. Los valores de  $h^*_{ab}$  varían desde 0 (eje  $a^*$ , rojo) hasta 90 (eje  $b^*$ , amarillo), 180 (eje negativo  $a^*$ , verde), 270 (eje negativo  $b^*$ , azul), hasta 360 ( $a^*$  eje)<sup>125</sup>.

### 2.1.12.2. Diferencias cuantitativas de color usando CIELAB

Los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para dos colores diferentes permiten el cálculo de la diferencia de color entre ellos  $\Delta E^*_{ab}$  (la distancia entre los puntos para sus coordenadas respectivas en el espacio de color CIELAB) de acuerdo con la ley de Pitágoras.

<sup>124</sup> MCDONALD R (ed.) *Colour Physics for Industry*, 2nd edn. Bradford: Society of Dyers and Colourists (1997).

<sup>125</sup> BILLMEYER FW and SALTZMAN M. *Principles of Colour Technology*, 2nd edn. New York: Wiley (1981).

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde  $\Delta L^* = L^*(inicial) - L^*(final)$ ,  $\Delta a^{*2}$  y  $\Delta b^{*2}$  representan el cambio en las coordenadas de color en comparación con la muestra antes del tratamiento térmico.

Tal medida de la diferencia de color es útil para establecer si un color es aceptable en relación con un estándar, o para determinar el grado de metamerismo de una sola muestra bajo dos iluminantes diferentes. Al medir pequeñas diferencias de color, es esencial que los datos sean reproducibles y que las mediciones de color proporcionen verdaderas diferencias de color y no diferencias causadas por variaciones en la naturaleza y presentación de la muestra o en la operación del instrumento. El espacio de color CIELAB, aunque es considerablemente más uniforme visualmente que el espacio XYZ, no es perfecto y el valor de  $\Delta E^*_{ab}$  no siempre corresponde con la diferencia de color entre las muestras evaluadas mediante examen visual<sup>126</sup>.

---

<sup>126</sup> WYSZECKI G and STILES WS. Color Science Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2nd edn. New York: Wiley (1982).

## 2.2. ANTECEDENTES

Las antocianinas son colorantes naturales que tienen una amplia gama de colores, que van desde el naranja, rosa, rojo, violeta hasta tonos azules en las flores y frutos de las plantas vasculares. Se producen ampliamente en la naturaleza y gracias a estudios se ha comprobado que no causan daño o molestia alguna y son solubles en agua. Otra propiedad importante de las antocianinas es su actividad antioxidante, que se sabe que desempeña un papel vital en la prevención de las enfermedades neuronales y cardiovasculares, como el cáncer y la diabetes<sup>127</sup>. Gracias a estos beneficios es que las antocianinas pueden representar un papel muy importante en la industria, como en la farmacéutica, textil y cosmética<sup>128</sup>. Lo mencionado anteriormente es la razón por la que alrededor del mundo, se han encontrado numerosas publicaciones acerca de la extracción, purificación, identificación y estudio de la capacidad antioxidante de las antocianinas en diferentes fuentes vegetales.

A continuación, se hará una revisión general sobre las investigaciones de algunos extractos vegetales de especies del género *Tibouchina* teniendo en cuenta su extracción, caracterización, estabilidad y capacidad antioxidante.

Bobbio *et al*<sup>129</sup> en 1985 extrajeron e identificaron los pigmentos tipo antocianinas presentes en la flor *Tibouchina grandiflora*; sus resultados mostraron que el pigmento mayoritario fue la *peonidina-3-soporósido*. De igual forma pudieron identificar parcialmente la *malvidina-3,5-diglucósido*, *malvidina-3-(p-cumaroil)-sambubiosido-5-glucósido* y la *peonidina-3-sambubiosido*.

Terahara *et al*<sup>130</sup> en 1993 aislaron los pigmentos antociánicos de los pétalos de la flor *Tibouchina urvilleana* usando maceración química con ácido acético al 5%. Para la identificación de los compuestos mayoritarios, purificaron el extracto a través de una columna empacada con Sephadex LH-20 y una columna preparativa ODS-HPLC estos resultados les permitieron identificar al compuesto *malvidina-3-(p-cumaroilglucosido)-5-acetilxilosido*.

---

<sup>127</sup> PEÑA, Daniel., INOSTROZA Claudio., REYES Marjorie and RIBERA., Alejandra. *Anthocyanins in Berries and Their Potential Use in Human Health*. In: Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine. Chapter 8. [Online]. Available in:< <https://cdn.intechopen.com/pdfs/53823.pdf>>.

<sup>128</sup> CASTAÑEDA Araceli. *et al*. Op.cit. p. 859–871.

<sup>129</sup> BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A., and DEGTSPARI, C. H. *Anthocyanins from Tibouchina grandiflora*. In: Food Chemistry. February, (1985), vol. 18(2), p. 153–159.

<sup>130</sup> TERAHARA, Norihiko, *et al*. *A Diacylated Anthocyanin from Tibouchina-Urvilleana Flowers*. In: Journal of Natural Products. March (1993). vol. 56. p. 335–340.

Janna *et al*<sup>131</sup> en 2006 cuantificaron y evaluaron la estabilidad del extracto obtenido de las flores de *Tibouchina semidecandra* frente a factores como el pH (0,5-3), días de almacenamiento (16 días), temperatura (25°C y 31°C) y condiciones de luz y oscuridad. La extracción la realizaron en diferentes etapas de desarrollo de la flor (Figura 17). Sus estudios mostraron que la flor completamente formada pero sin abrir (S2) exhibió la cantidad más alta de antocianinas totales extraídas del peso fresco por gramo de los pétalos, lo anterior debido a que la flor en esta etapa se encuentra en su estado de madurez completa y acumula la mayor concentración de antocianinas.

Figura 17. *Etapas de desarrollo de la flor Tibouchina semidecandra*



Fuente: Recopilado de JANNA, O. A. et al (2007)

Los autores encontraron que los contenidos de antocianinas para todas las etapas de desarrollo fueron estables en un rango de pH ácido, lo que disminuyó a medida que se aumentaba la basicidad. De lo anterior concluyeron que la extracción a pH 0.5 favorece la cantidad total máxima de antocianinas. Los porcentajes de degradación de las antocianinas totales en los extractos mantenidos a 25°C fueron del 7% mientras que los extractos a 31°C del 20%. Los extractos almacenados en la oscuridad a 25°C mantuvieron su color púrpura durante todos los días (16 días), mientras que la exposición a la luz lo redujo a un promedio de 10 días. Janna *et al* sugieren que el extracto de *Tibouchina semidecandra* puede usarse como colorante potencial en las industrias alimentarias o textiles pues los pétalos de esta especie están abundantemente disponibles ya que es una planta de floración libre. Pero cabe resaltar que para cumplir en la categoría de colorante alimentario, es necesario llevar a cabo más estudios de estabilidad y así extender la duración del pigmento durante un período de almacenamiento más prolongado.

<sup>131</sup> JANNA, O. A. *et al* Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. *In*: Food Chemistry. April (2007). vol. 101. p. 1640–1646.

En 2009 Kuster *et al*<sup>132</sup> identificaron varios flavonoides en el extracto obtenido de *Tibouchina grandifolia*. Para la extracción de estos compuestos realizaron la maceración química del material vegetal con etanol al 70% a temperatura ambiente y durante 10 días. Posteriormente con la ayuda de una fase estacionaria (sephadex LH-20) lograron obtener el extracto purificado. Para la identificación de los compuestos los autores usaron la combinación de técnicas espectroscópicas como (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, ESI-MS) además de la comparación con datos de la literatura. Entre estos compuestos se encontraban: La quercetina y sus derivados 3-O-monoglúcidos, la quercetina-3-O-β-D-(6"-E-p-cumaroil) glucopiranosido y ácidos fenólicos como el ácido protocatecuico y ácido gálico.

En Colombia Mosquera *et al*<sup>133</sup> en 2009 estudiaron la capacidad antioxidante de cuarenta y seis extractos metanólicos de plantas de las familias botánicas *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Melastomataceae*, *Rubiaceae* y *Solanaceae*, recogidas en el Parque Natural Regional de Ucumarí (Risaralda, Colombia). Los autores usaron el ensayo de captación de radical libre de 1,1 difenil-2-picrilhidrazil o DPPH. Entre la familia Melastomataceae se encontraba la flor *Tibouchina grossa*. Para la obtención de los extractos, el material vegetal se sometió a maceración química durante 48 horas con metanol como solventes de extracción. Sus resultados arrojaron que la especie con mayor actividad antioxidante fue la *Phyllanthus sp* con un porcentaje de actividad antioxidante del 54%, entre estas especies se encontraba también la flor *Tibouchina grossa* con un porcentaje del 47%.

En el año 2010 Hasnah *et al*<sup>134</sup> llevaron a cabo estudios fitoquímicos y de bioactividad del extracto de *Tibouchina semidecandra L.* Para el proceso de extracción usaron el método soxhlet por 18 horas con acetato de etilo como solvente. En esta investigación también realizaron la evaluación de la actividad antioxidante tanto de los extractos crudos como de los compuestos aislados, para ello usaron la técnica de resonancia de spin electrónico (ESR) y el método DPPH. Las estructuras de los compuestos puros las elucidaron espectroscópicamente usando RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, técnicas de RMN en 2D, IR, UV, MS y la comparación con datos de literatura. Algunos de los polifenoles que lograron identificar fueron la quercetina, la quercetina 3-O-α-L-(2"-O-acetil)-arabinofuranosido, la avicularina, la quercitrina y el ácido 3,3'-O-dimetilelálico 4-O-α-R-ramnopiranosido.

---

<sup>132</sup> KUSTER, Ricardo, NORBERT Arnold, and LUDGER Wessjohann. *Anti-Fungal Flavonoids from Tibouchina Grandifolia*. In: *Biochemical Systematics and Ecology*. January, (2009), vol. 37(1). p. 63–65.

<sup>133</sup> MOSQUERA, Oscar *et al.* *Antioxidant Activity of Plant Extracts from Colombian Flora*. In: *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. March (2009). vol.19 (2 A). p. 382–87.

<sup>134</sup> HASNAH, Sirat *et al.* *Isolation and Identification of Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibition of Polyphenols from Tibouchina Semidecandra L.* In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. January, (2010). Vol. 58(19). p. 10404–9.

Teniendo en cuenta sus resultados, los autores demostraron que los polifenoles aislados puros y los extractos en EtOAc poseían fuertes capacidades antioxidantes, comprobaron que la quercetina fue el eliminador de radicales más activo en los dos métodos (DPPH y ESR) con valores de SC<sub>50</sub> de (0,7µM ± 1,4µM) y (0,7µM ± 0,6µM).

En 2012 dos Santos *et al*<sup>135</sup> realizaron un estudio fitoquímico y antimicrobiano del extracto obtenido de *Tibouchina candolleana*. Para la obtención del extracto crudo, los autores usaron 3 solventes diferentes (n-hexano, cloruro de metileno y etanol), con el fin de obtener extractos en diferentes condiciones. Realizaron la identificación de los compuestos aislados por medio de la combinación de varias técnicas, entre las que se encuentran la cromatografía de gases de alta resolución, espectrometría de masas con interface electrospray, RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y comparación con datos registrados en la literatura. El extracto que se obtuvo con n-hexano, fue analizado por cromatografía de gases de alta eficiencia, lo que permitió la identificación de los compuestos: β-sitosterol, β-amirina y α-amirina. Los datos de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del extracto de cloruro de metileno, revelaron la presencia de una mezcla de ácidos, ursólico y oleanólico que luego de un análisis cromatográfico adicional mediante HPLC, permitió su aislamiento. Los autores revelan que a pesar de que estos ácidos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se han aislado con frecuencia de otras especies pertenecientes a la familia Melastomataceae como mezclas mutuamente isoméricas, esta es la primera vez que se ha informado del ácido ursólico y el ácido oleanólico en este género. Finalmente a partir del extracto en etanol se identificaron flavonoides como la luteolina y genisteína.

Más adelante en el año 2015 Tracanna *et al*<sup>136</sup> evaluaron la actividad anti-Leishmanial y antiinflamatoria de los compuestos fenólicos presentes en *Tibouchina paratropica*. Colectaron 1,5 kg de *Tibouchina paratropica* y por maceración química con 8,7 L de acetona: agua (70:30 v/v) durante 7 días obtuvieron el extracto crudo. Posteriormente realizaron la determinación de los compuestos fenólicos por medio de espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS), con la cual pudieron aislar e identificar un nuevo compuesto fenólico: la 2,8-dihidroxi-7H-furo[2,3-f]cromeno-7-ona junto con la isoquercitrina. Aunque ambos compuestos muestran una débil actividad antibacteriana sus resultados mostraron que el compuesto 1 poseía una potente actividad antileishmaniana y antiinflamatoria. El compuesto 2 no exhibió actividad citotóxica, demostrando así aplicaciones prometedoras de este compuesto para desarrollarse como un tratamiento potencial contra las infecciones asociadas a la enfermedad Leishmania donovani.

---

<sup>135</sup> DOS SANTOS, Fernanda M. *et al.* 2012. *Evaluation of Antimicrobial Activity of Extracts of Tibouchina Candolleana (Melastomataceae), Isolated Compounds and Semi-Synthetic Derivatives against Endodontic Bacteria.* *Brazilian Journal of Microbiology* 43(2): 793–99.

<sup>136</sup> TRACANNA, María *et al.* *Anti-Leishmanial, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Phenolic Derivatives from Tibouchina Paratropica.* *Phytotherapy Research*. November, (2015). vol. 29(3). p. 393–97.



Jiménez *et al*<sup>137</sup> determinaron los perfiles de capacidad antioxidante de 11 especies colombianas entre las que se encontraba la flor *Tibouchina kingii*. Los autores realizaron un estudio etnobotánico con el cual obtuvieron las especies de 5 municipios del oriente antioqueño (Marinilla, Guarne, Santuario, La Ceja, Rionegro) como una alternativa terapéutica para el tratamiento de síntomas relacionados con procesos inflamatorios (tipos de dolor agudo y crónico, fiebre y asfixia o asfixia). Se sabe que en Colombia, el uso de plantas medicinales para el tratamiento y prevención de enfermedades es una práctica común sobre todo en las áreas rurales<sup>138</sup>. El perfil de capacidad antioxidante la investigaron mediante el uso de diferentes metodologías que consideran los mecanismos de transferencia de electrones (ET), como son la estabilización del radical DPPH y la capacidad antioxidante equivalente de TROLOX (TEAC). Además, determinaron el contenido total de los polifenoles presentes por el método de Folin-Ciocalteu y estimaron la correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de polifenoles. Las mejores cantidades de fenoles totales, valores máximos encontrados en DPPH y TEAC para todas las especies fueron para los extractos de *Tibouchina kingii* (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido fenólico total y capacidad antioxidante de *Tibouchina kingii*

<b>Especie</b>	<b>DPPH-TEAC</b> μmol equiv TROLOX /g muestra seca	<b>TEAC</b> μmol equiv TROLOX/g muestra seca	<b>CONTENIDO FENÓLICO TOTAL</b> mg ácido gálico/ g muestra seca
<i>T. kingii</i>	2290 ± 17.0	3590 ± 48.0	383 ± 0.7
<i>A. conyzoides</i>	180 ± 3.1	620 ± 18.0	70 ± 6.1
<i>C. calophylla</i>	1060 ± 1.2	1590 ± 29.0	248 ± 3.3

Los resultados se expresan como la media ± DE.

Fuente: Recopilado de Jiménez, Nora *et al.* (2015)

Posteriormente Goldson *et al*<sup>139</sup> en 2016 evaluaron la actividad antioxidante y el contenido fenólico total de varios extractos obtenidos de 5 especies de flores, entre las que se encontraba la *Tibouchina granulosa*. Las actividades antioxidantes las determinaron mediante DPPH y el contenido de fenoles totales mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu. Las especies *C. fistula* y *S. siamea* mostraron la mayor actividad

<sup>137</sup> JIMÉNEZ, Nora *et al.* *Op.cit.* p. 272–79. (2015)

<sup>138</sup> CARO, Sandra. *Ethnobotanical Studies in the Central Andes (Colombia): Knowledge Distribution of Plant Use According to Informant's characteristics.* In: Journal of ecology and application. December, (2004), vol. 7(2). p. 89–104.

<sup>139</sup> GOLDSON, Andrea. *et al.* *Antioxidant Activity , Total Phenolics and Fatty Acid Profile of Delonix Regia , Cassia Fistula , Spathodea Campanulata , Senna Siamea and Tibouchina Granulosa.* In: Journal of Analytical and Pharmaceutical Research. October, (2016). vol. 3. p. 1–7.

antioxidante y *T. granulosa* exhibió el contenido fenólico total más alto ( $90.35 \pm 2.88$  mg ac.gálico /g extracto seco).

Finalmente en el año 2017 Sobrino *et al*<sup>140</sup> investigaron los efectos biológicos de *Tibouchina granulosa* en modelos de inflamación aguda, para ello realizaron experimentación *in vivo* utilizando ratones. En su estudio, los datos obtenidos del análisis químico (usando LQC FLEET acoplada a un sistema HPLC) mostraron la presencia de proantocianidinas y flavonoides. Administraron oralmente a los ratones el extracto de *T. granulosa* (1, 3, 10, 30 ó 100 mg / kg). Los resultados de Sobrino *et al* indicaron que el extracto acuoso de *T. granulosa* indujo un efecto antiinflamatorio. En conclusión, los extractos de *T. granulosa* pueden ser útiles en la preparación de nuevos fitomedicamentos.

En el grupo de Investigación GIPIB (Grupo de Investigación en Productos de Importancia Biológica) de la Universidad de Nariño se han desarrollado estudios en la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro* y contenido fenólico de pigmentos tipo antocianinas en frutas como Motilón (*Hyeronima macrocarpa*)<sup>141</sup>, Mortiño (*Vaccinium floribundum H.B.K*)<sup>142</sup> e Ivilan (*Monima obtusifolia*)<sup>143</sup>, de tal manera que las especies de flores (*Tibouchina urvilleana* y *Tibouchina mollis*) del presente estudio es el primer trabajo en donde se utiliza una matriz vegetal diferente, contribuyendo al desarrollo científico e industrial de nuestra región nariñense.

---

<sup>140</sup> SOBRINHO, Andrea *et al*. Characterization of Anti-Inflammatory Effect and Possible Mechanism of Action of *Tibouchina Granulosa*. In: Journal of Pharmacy and Pharmacology. January, (2017).

<sup>141</sup> JIMENEZ, Juan; Villareal, John. Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (*Hyeronima macrocarpa*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 103p.

<sup>142</sup> PORTILLO, Dairo; Villacrez, José. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum H.B.K*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 128p.

<sup>143</sup> CHARFUELÁN, Claudia. Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Ivilan (*Monima obtusifolia*). Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2012; 112p.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección se realizó en forma de un muestreo aleatorio simple. La flor *Tibouchina mollis* se recolectó en el corregimiento de San Fernando localizado a 4 Km al oriente de la ciudad de San Juan Pasto a 2800 m.s.n.m. y la flor *Tibouchina urvilleana* se recolectó en el municipio de Nariño ubicado al Noroccidente de la ciudad de Pasto a 2474 m.s.n.m. Se colectó aproximadamente 300 g de pétalos de cada especie, teniendo en cuenta su buen estado y que estuvieran en las mejores condiciones con respecto a su color (uniformidad del color) (Figura 18). Un ejemplar de las especies se clasificó taxonómicamente en el herbario de la Universidad de Nariño –PSO- con código de inclusión N° 45801 para la especie *T.mollis* y 45802 para la especie *T.urvilleana* (anexo A).

Figura 18. Selección del material vegetal



\*En (a) *Tibouchina mollis* y (b) *Tibouchina urvilleana*

Fuente: Esta investigación.

#### 3.2. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS

##### 3.2.1. Obtención de los extractos crudos ECM y ECU

Una vez seleccionada la muestra, se realizó una extracción con solventes según la metodología descrita por Jordheim *et al*<sup>144</sup>, las flores fueron sometidas a maceración química (extracción sólido-líquido) con una mezcla de solventes, metanol: ácido acético (19:1) durante 24 h. Este proceso se repitió varias veces con el fin de lograr la decoloración completa de las muestras. Los extractos obtenidos se filtraron, rotaevaporaron y finalmente se secaron a 40°C (Figura 19). De esta manera se obtuvo los extractos crudos ECM (de *T. mollis*) y ECU (de *T. urvilleana*).

<sup>144</sup> JORHEIM, M. *Isolation, Identification and properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms*. Thesis Post-Doctor. Bergen: University of Bergen. Department of Chemistry, 2007. P. 85.

Figura 19. Proceso para la obtención de los extractos crudos de *T.mollis* (ECM) y *T. urvilleana* (ECU)



Maceración

Filtración

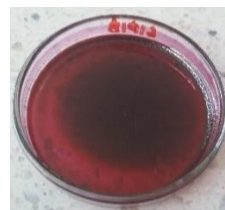
Rotaevaporación



Secado



ECM



ECU

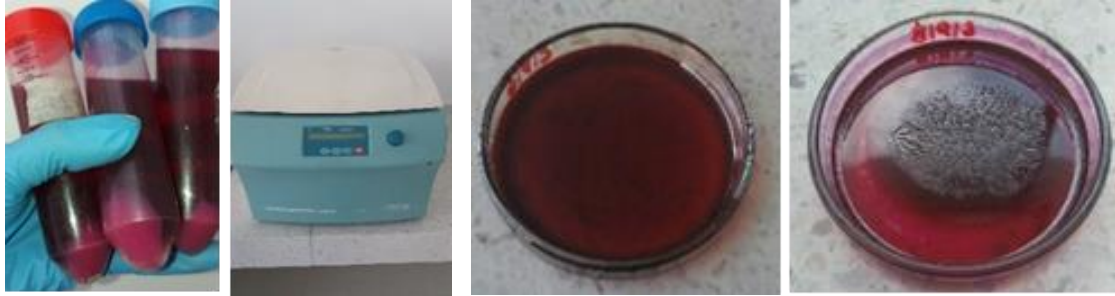
Fuente: Esta investigación

### 3.2.2. Eliminación de mucílagos

Para simplificar el extracto crudo, se realizó la separación de mucílagos y proteínas siguiendo la metodología de Stintzing *et al*<sup>145</sup> con algunas modificaciones, así: el extracto crudo obtenido anteriormente se disolvió en agua en proporción 1:10 (gramo de muestra/mililitro de agua) y luego, por cada mililitro de extracto crudo se adicionaron 2 mL de etanol al 96%. Al cabo de 20-30 minutos se observó una suspensión (Figura 20) que se centrifugó a 6000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante traslucido se rotaevaporó a 35°C y posteriormente se sometió a secado.

<sup>145</sup> STINTZING, SCHIEBER y CARLE, 2002b. Op. cit., p. 2303.

Figura 20. Purificación parcial de los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana*



Precipitación de mucílagos  
y centrifugación

ECM

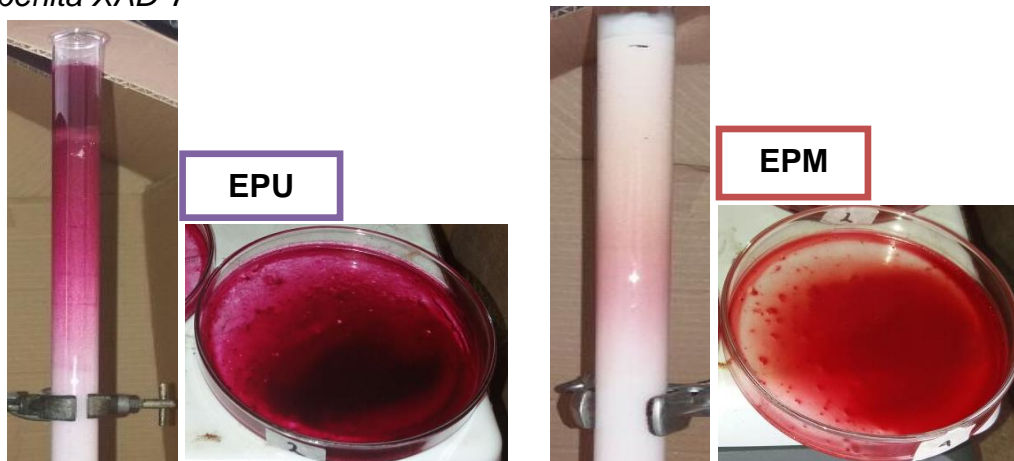
ECU

Fuente: Esta investigación

### 3.2.3. Obtención de extractos purificados EPM y EPU

Los extractos crudos parcialmente purificados se sometieron a retención selectiva mediante una resina polimérica no iónica (Amberlita XAD-7) empacada en una columna cromatográfica de dimensiones: largo 30 cm y diámetro interno 3 cm. Este proceso se realizó con el fin de eliminar compuestos co-extraídos durante la maceración como azúcares, aminoácidos, proteínas entre otros. Como paso preliminar fue necesario activar la resina con 500 mL de H<sub>2</sub>O: HCl (0,01%). Posteriormente se cargaron independientemente 4,20 g de ECM y 4,27 g de ECU realizando lavados con agua tipo II hasta completar un volumen de 4 litros. Para verificar la eliminación de estos compuestos se llevó a cabo el control de pH del efluente, de igual manera se midió los grados brix para verificar la eliminación de azúcares presentes en el extracto, la medición se hizo con un refractómetro master Átago. Finalmente se eluyeron los compuestos retenidos con una mezcla de metanol/ácido acético (19:1) v/v. Por consiguiente se obtuvieron los extractos purificados de *T.mollis* (EPM) y *T.urvilleana* (EPU). Finalmente los extractos se concentraron por rotaevaporación y se secaron (Figura 21). Este procedimiento se repitió varias veces con el fin de obtener la cantidad necesaria de extracto purificado.

Figura 21. Purificación de extractos crudos ECM y ECU sobre columna con Amberlita XAD-7



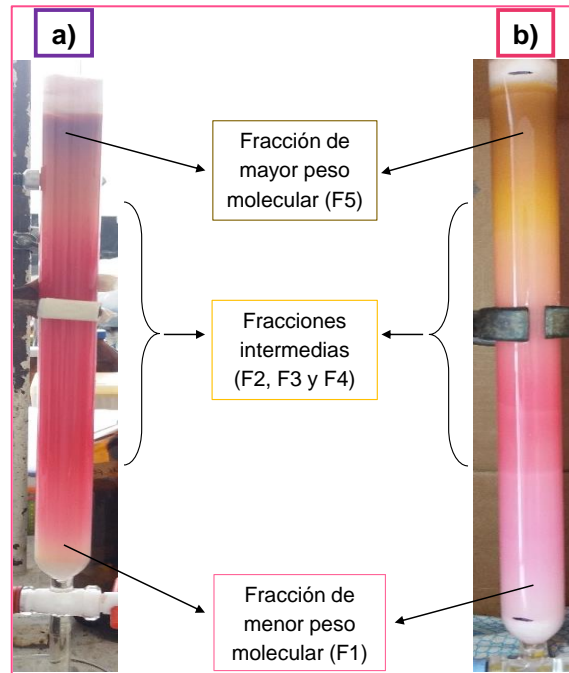
Fuente: Esta investigación

#### 3.2.4. Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas

Mediante cromatografía de exclusión por tamaño, se realizó la separación de las antocianinas monoméricas y poliméricas<sup>146</sup>. Para ello se preparó una columna cromatográfica con fase estacionaria Sephadex LH-20, la cual fue activada inicialmente con 500 mL de H<sub>2</sub>O: HCl (0,01%) y acondicionada con 1 litro de agua tipo II. Una vez activada la resina, se disolvieron independientemente 1 g de los extractos EPM y EPU en la mínima cantidad de la fase móvil inicial y se cargaron en las columnas de dimensiones: largo 30 cm y diámetro interno 2 cm. La fracción de antocianinas monoméricas (bajo peso molecular) e intermedias se eluyeron con una mezcla de metanol: ácido fórmico 1% en relación 2:1 y las antocianinas poliméricas (mayor peso molecular) se eluyeron con una mezcla de acetona: ácido fórmico 1% en relación 2:1 (Figura 22). En total se obtuvieron 5 fracciones para cada especie denominadas F1, F2, F3, F4 y F5 (Figura 23). Se realizó un seguimiento por espectroscopía UV-Vis a cada una de las fracciones obtenidas con el fin de determinar la forma de elución de los compuestos y de esta forma también iniciar el cambio de fase móvil.

<sup>146</sup> JORDHEIM, Mónica. Op. cit. p. 90

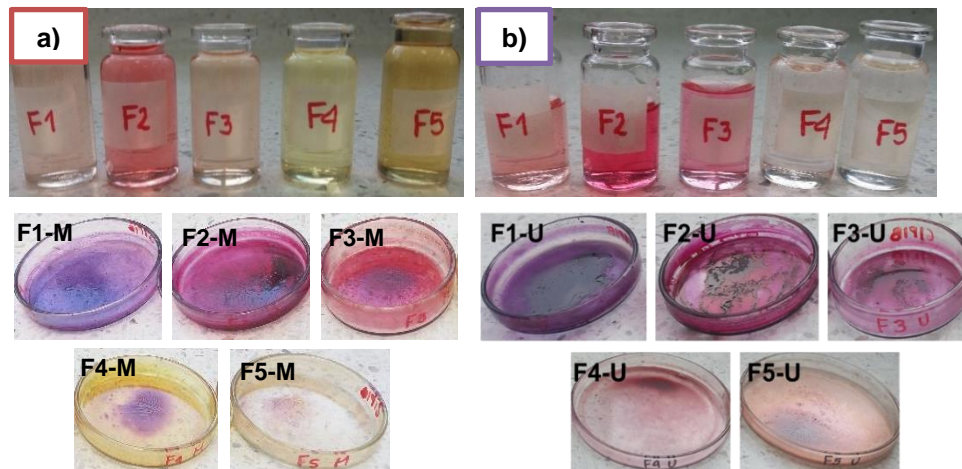
Figura 22. Separación de antocianinas monoméricas y poliméricas



\*Fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex LH-20). En (a) fraccionamiento del EPU y (b) fraccionamiento del EPM.

Fuente: Esta investigación.

Figura 23. Fracciones obtenidas de *T.mollis* y *T.urvilleana*



\*En (a) se muestran las fracciones extraídas de EPM y en (b) las fracciones de *T.urvilleana*.

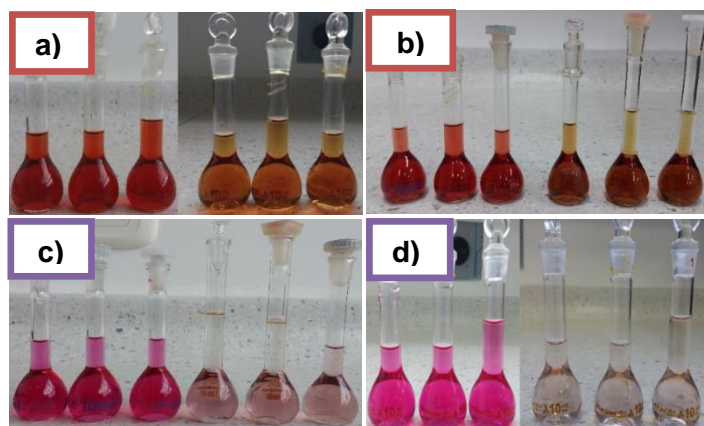
Fuente: Esta investigación

### 3.3. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS<sup>147</sup>

#### 3.3.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas

La cuantificación de antocianinas monoméricas se realizó por medio del método de pH diferencial. Inicialmente se prepararon soluciones madre en agua de los extractos crudos y purificados, posteriormente se tomó una alícuota de estas soluciones y se aforó ajustando el pH 1.0 y pH 4.5 con soluciones de KCl/HCl (0.025 M) y CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa (0.4 M). La cantidad de muestra se tomó hasta obtener una absorbancia a la longitud de onda de máxima de 1,2 (Figura 24). Para el cálculo del contenido de antocianinas se utilizó el peso molecular y la absorbancia molar del pigmento antociano presente en mayor proporción, en este caso la cianidina-3-glucósido (PM 449.2 g/mol y  $\epsilon=26.900 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$ ). Los resultados se expresaron en mg de cianidina 3-glu/ 100g de extracto seco para los extractos crudos y en mg de cianidina 3-glu/ g de extracto para los extractos purificados. La metodología se realizó por triplicado.

Figura 24. Cuantificación de antocianinas monoméricas para extractos crudos y purificados de *T.mollis* de *T.urvilleana*



\*Las imágenes a) y c) corresponden a los extractos crudos ECM y ECU a pH: 1.0 y 4.5 y las imágenes b) y d) a los extractos purificados EPM y EPU a pH: 1.0 y 4.5.

Fuente: Esta investigación

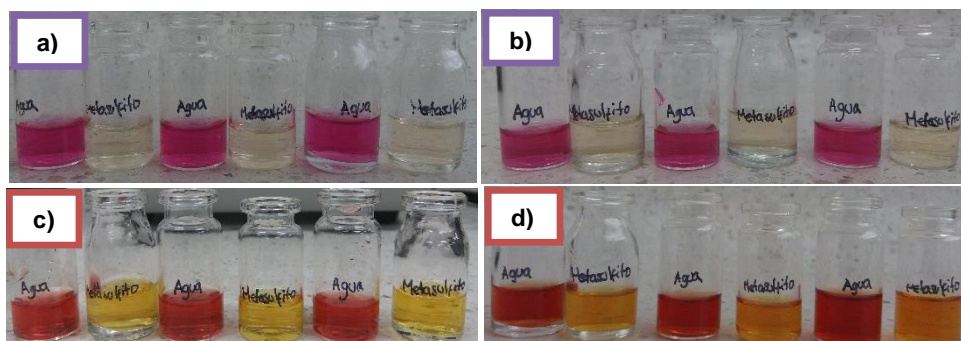
<sup>147</sup> GIUSTI, Mónica and WROLSTAD, Ronald. E. Op. cit. Unit F1.2.1-13.



### 3.3.2. Cuantificación de antocianinas poliméricas

El contenido de antocianinas poliméricas en los extractos crudos y purificados de las dos especies, se determinó por medio del método de pH sustractivo. Se prepararon soluciones de los extractos utilizando como solvente KCl/HCl (0.025 M) a pH 1.0. Posteriormente 2,8 mL de la muestra se transfirieron en dos tubos de ensayo; al primer tubo se le adicionó 0.2 mL de metabisulfito de sodio al 40% y al segundo tubo se le agregó 0,2 mL de agua destilada (Figura 25). Transcurridos 15 minutos se midieron las absorbancias a 420 nm, a la longitud de onda de máxima absorbancia y a 700 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Pharo Merck<sup>148</sup>.

Figura 25. Cuantificación de antocianinas poliméricas para extractos crudos y purificados de *T.mollis* de *T.urvilleana*



\*Las imágenes a) y c) corresponden a los extractos crudos ECU y ECM en agua y metasulfito de sodio luego de 15min y las imágenes b) y d) corresponden a los extractos purificados EPU y EPM.

Fuente: Esta investigación

## 3.4. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS

### 3.4.1. ANÁLISIS POR HPLC-PAD

Los extractos purificados (EPM y EPU) y las fracciones (F1-M, F1-U, F3-M y F3-U) fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de fotodiodos (HPLC-PAD). El equipo HPLC utilizado para los análisis fue un Waters 1525 consistente de una bomba HPLC binaria y un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2998. Se empleó una columna analítica C<sub>18</sub> de dimensiones 150mm x 4,6mm x 3 μm. La separación se llevó a cabo de acuerdo al sistema empleado por

<sup>148</sup> GIUSTI, Mónica., and WROLSTAD, Ronald. E. Op. cit. Unit F1.2.1-13.

Kosińska *et al*<sup>149</sup> utilizando como fases móviles para la elución las siguientes: Fase A: agua/ácido acético (98:2, v/v) y fase B: agua/acetonitrilo/ácido acético (78:10:2, v/v). Las muestras se disolvieron en 300 µL de fase móvil A y posteriormente se filtraron en un papel con diámetro de poro de 0,45 µm. El análisis se llevó a cabo en modo gradiente como se muestra a continuación: 0-80% B (15 min), 80-100% B (30 min), 100-0% B (5min). La velocidad de flujo fue de 0,5 mL/min y el volumen inyectado fue de 20 µL.

### 3.4.2. ANÁLISIS POR UHPLC-ESI-MS

El análisis por cromatografía líquida (UHPLC-ESI-MS) se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad de Sevilla – España, en el equipo de UHPLC dionex ultimate 3000 RS acoplado a un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-orbitrap QExactive con fuente de ionización HESI. El cromatógrafo estaba equipado con una columna Xbridge BEH C<sub>18</sub> (100mm x 2.1 mm, 2.5 µm), para el análisis, las fases móviles empleadas fueron; fase móvil A: *agua: ácido trifluoroacético* (95:5) y fase móvil B: *acetonitrilo: ácido trifluoroacético* (95:5), a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min, con perfil de gradiente de 5% B (1min), 5-100% B (10min), 100% B(2 min), 5% B (3min). El volumen de inyección para todas las muestras fue de 20 µL, el instrumento se operó en modo positivo y negativo en un rango de exploración de m/z 50 a 1000. Se utilizó nitrógeno como gas a un caudal de 4,5 ml/min, la temperatura se ajustó a 250°C y la energía de colisión (celda HCD) fue operado a 30 kv. La detección se basó en la masa exacta calculada y en el tiempo de retención de los compuestos.

### 3.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)

Se mezclaron 100 µL de las muestras obtenidas incluyendo los extractos crudos, purificados y fracciones de las dos especies (previamente diluidos en etanol 96%) con 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 1500 µL de carbonato de sodio Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% (p/v), se llevaron a un volumen final de 10 mL con agua tipo II<sup>150</sup>. La mezcla se agitó y se dejó reposar durante dos horas a temperatura ambiente, dando como resultado la coloración azul característica de este método (ver anexo B). Se tomó lectura de la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro Pharo UV-Vis (Merck). Como blanco se usó 0,1 mL de etanol al 96% en lugar de la muestra. El contenido fenólico se calculó a partir de una curva estándar preparando soluciones de 10, 30, 60, 100, 150 y 180 ppm de ácido gálico (AG) y expresando los resultados como mg

<sup>149</sup> KOSIŃSKA, Agnieszka, *et al.* *Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of Persea Americana Mill. Peels and Seeds of Two Varieties*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2012). vol 60(18). p. 4615-4616.

<sup>150</sup> CHUN, OCK, *et al.* *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods*. In: Journal of Food Composition and Analysis. (2011). vol. 24(7). p.1043-1045

de ácido gálico por g de extracto o fracción seca. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### 3.6. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para la medida de la capacidad antioxidante de extractos crudos, purificados y fracciones de las dos especies se utilizaron dos métodos espectrofotométricos: TEAC y DPPH. Las lecturas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Pharo UV-Vis (Merck) y todos los análisis se realizaron por triplicado.

#### 3.6.1. Método TEAC

Para medir la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) se preparó una solución trabajo que contenía ABTS en concentración 7 mM y persulfato de potasio 2,45 mM, posteriormente esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente en un cuarto oscuro durante 16 horas. Luego, esta solución se diluyó con tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 hasta obtener una absorbancia medida a 734 nm de  $0,7 \pm 0,02$ . A continuación una alícuota de 30  $\mu$ L de cada extracto y fracción diluido de las dos especies se adicionó a 3000  $\mu$ L de solución del catión radical ABTS<sup>•+</sup> y se agitó en vortex durante un minuto. Se dejó reposar a temperatura ambiente por seis minutos y luego se midió la absorbancia a 734 nm. La coloración azul-verdosa que distingue a este radical se observa en el anexo C. La actividad antioxidante de las muestras se calculó por interpolación a partir de una curva estándar construida a partir de soluciones de 0, 0,4, 0,9, 1,4, 1,9, 2,4 y 3 mM de TROLOX. Los valores TEAC se expresaron en mmol TROLOX por g de extracto seco<sup>151</sup>.

#### 3.6.2. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Se siguió la metodología de Cai<sup>152</sup> con algunas modificaciones. Tanto el radical DPPH<sup>•</sup> como los extractos crudos y purificados de las dos especies se prepararon en etanol al 80%. Se añadió una solución del radical DPPH<sup>•</sup> (120 $\mu$ M, 3,9 mL) a 0,1 mL de los extractos crudos y purificados a diferentes concentraciones. Se usó etanol al 80% como blanco. La reacción para eliminar radicales DPPH<sup>•</sup> se realizó a temperatura ambiente y la disminución de la absorbancia se midió a 515 nm luego de transcurridos 30 minutos de reacción. La actividad antioxidante de los extractos se expresó usando el parámetro de actividad de eliminación de radicales EC<sub>50</sub> (concentración de antioxidante requerida para una disminución del 50% en la absorbancia de los radicales libres DPPH<sup>•</sup>). Para cada muestra se construyó una

<sup>151</sup> RE, R, et al. *Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*. In: Free Radical Biology and Medicine. (1999). vol. 26(9). p. 1231-1237.

<sup>152</sup> CAI, Yizhong. Z., SUN, Mei., and CORKE, Harold. *Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003). vol. 51(8). p. 2288–2294.

curva estándar (dosis-respuesta) graficando (%) de inhibición de DPPH frente a la concentración de antioxidante, con el fin de obtener por interpolación el parámetro EC<sub>50</sub>. Se usó como control positivo al ácido ascórbico.

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{test}} * 100}{A_{\text{control}}}$$

Donde la absorbancia control ( $A_{\text{control}}$ ) es la solución de DPPH + 0,1 mL de etanol 80% y la absorbancia test ( $A_{\text{test}}$ ) es la absorbancia de la muestra prueba (solución de DPPH + 0,1 mL de muestra). La funcionalidad del método se evaluó con un estándar de ácido ascórbico en el rango de concentraciones: 2,64; 3,52; 4,40; 5,28; 6,16 mg Ácido ascórbico/ L. Por su parte, las concentraciones de las muestras (extractos crudos y fracciones) se prepararon de acuerdo a ensayos preliminares, que permitieron establecer que los siguientes rangos de concentración: ECU (13,75 -25mg/L), EPU (3,75-7,5mg/L), ECM (7,5-11,25mg/L) y EPM (2,5-6,25mg/L), fueron adecuados para obtener el término EC<sub>50</sub> en un t=30 min y bajo las condiciones anteriormente descritas. El procedimiento se realizó por triplicado (ver anexo D).

### 3.7. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

Los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana* se sometieron a varias condiciones de almacenamiento para determinar la estabilidad del color frente al pH (1,2 y 3) y la temperatura (0°C, 80°C y temperatura ambiente) haciendo uso de la colorimetría triestímulo. El pH de los extractos se ajustó con soluciones de HCl 1% y NaOH 5%. El seguimiento a 0°C y temperatura ambiente se realizó a diario hasta completar 57 días de almacenamiento y a 80°C de 1-30 min de calentamiento. La evaluación del color se basó en la medición espectrofotométrica del espectro de transmisión en la región visible (380–770 nm) utilizando un espectrofotómetro Hewlett-Packard UV-vis HP8453 (Palo Alto, CA). Los parámetros de color se obtuvieron mediante el método de ordenadas ponderadas ( $\Delta\lambda = 2 \text{ nm}$ ) usando el software CromaLab®, el cual permitió determinar los parámetros CIELAB siguiendo las recomendaciones de la comisión internacional de educación<sup>153</sup> (CIE, 2004): el CIE 1964 10° correspondiente al observador estándar y el iluminante estándar D65, correspondiente a la luz natural y se realizaron mediciones de referencia en blanco con agua destilada. Se calcularon los parámetros de CIELAB: L\* (que va desde 0, negro a 100, blanco) y dos coordenadas de color, a\* (que toma valores positivos para colores rojizos y valores negativos para los verdosos) y b\* (positivo para colores amarillentos y negativo para los azulados). A partir de estas coordenadas, se definieron otros parámetros de color: el ángulo de tono ( $h_{ab}$ ) y el croma ( $C^*_{ab}$ ),

<sup>153</sup> HEREDIA, F. J., ÁLVAREZ, C., GONZÁLEZ-MIRET, M. L y RAMÍREZ, A. CromaLab®, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04. (2004). Sevilla, España.

como atributos cualitativos y cuantitativos del color, respectivamente. La distancia euclidiana entre dos puntos en el espacio tridimensional definido por L\*, a\* y b\* se usó para calcular las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ )<sup>154</sup> (ecuación 1).

---

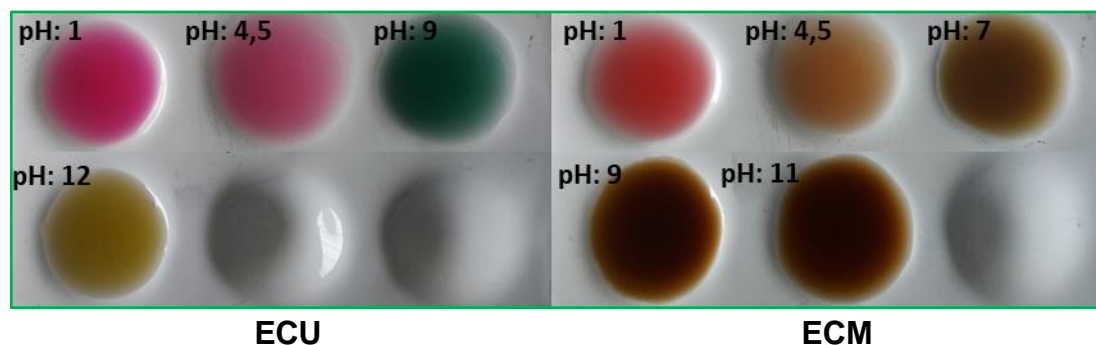
<sup>154</sup> CEJUDO-BASTANTE, María, HURTADO, Nelson., MOSQUERA, Natalia., and HEREDIA, Francisco. *Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (Ullucus tuberosus) extracts under different pH and thermal conditions.* In: Food Research International. July (2014). vol. 64. p. 465–471

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. PRUEBAS PRELIMINARES

La variación de color de las antocianinas por los cambios de pH se tuvo en cuenta como una primera aproximación de la presencia de este tipo de pigmentos en las dos especies de flores, esto consistió en determinar los cambios de color de los extractos crudos a diferentes valores de pH, por lo cual se utilizó soluciones de NaOH 1 M y HCl 0,1 M. En la figura 26 se indican los cambios de color que presentaron los extractos.

Figura 26. Variación del color con respecto al pH de extractos crudos



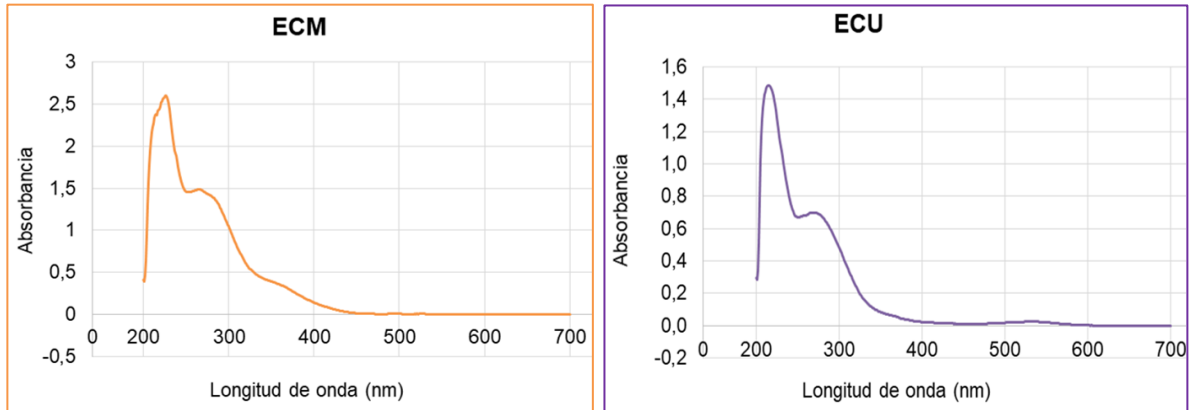
Fuente: Esta investigación

De acuerdo con la percepción visual, a pH 1 los dos extractos se tornaron de color rosa (catión flavilio), el color del extracto crudo de *T. urvilleana* un poco más intenso que el del extracto crudo de *T. mollis*. También se puede evidenciar que a medida que se incrementa el pH los extractos tomaron un color amarillento, en el caso de *T. mollis* se tornó hasta un color café intenso, lo que indica la presencia de pigmentos antocianos en las dos especies de flores.

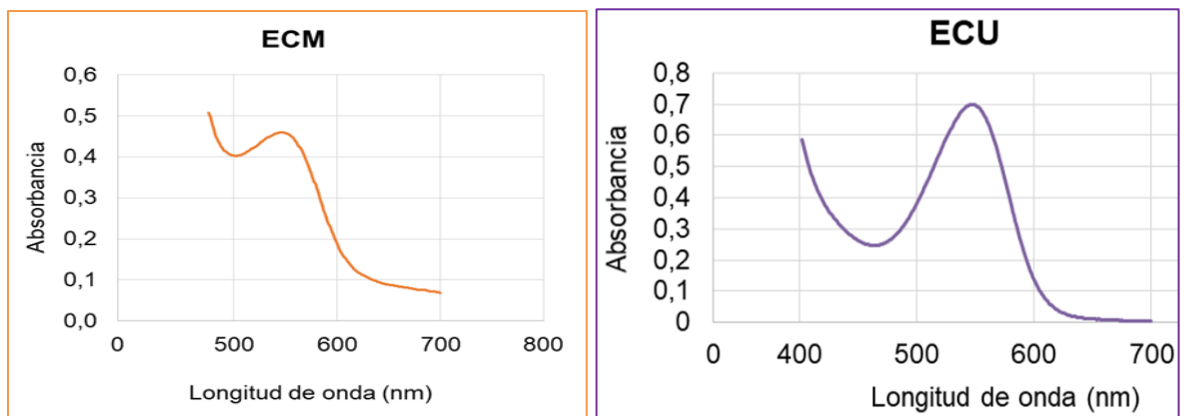
Otro aspecto importante para confirmar la presencia de antocianinas es su espectro de absorción UV-Vis. Los pigmentos extraídos de las dos especies de flores presentaron una banda en la región UV (260 a 280 nm) determinada por la conjugación del anillo A (Figura 27a) y otra en la región visible (490 a 550 nm) determinada por la conjugación del anillo B (Figura 27b).<sup>155</sup>

<sup>155</sup> GIUSTI, Mónica., y WROLSTAD, Ronald. E. Op. cit. Unit F1.2.1-13.

Figura 27. Espectros UV-vis de extractos de crudos *T.mollis* y *T.urvilleana*



(27a)



(27b)

Las imágenes (27a) corresponden a los espectros de absorción de los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana* en la región ultravioleta del espectro electromagnético y las imágenes (27b) corresponden a la región visible. \*Cada espectro se tomó en el rango UV-Vis (200-700 nm) en buffer pH 1.

Fuente: Esta investigación

#### 4.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS DOS ESPECIES DE FLORES

A partir de una revisión de las características morfológicas de las muestras y una comparación con los ejemplares presentes en el Herbario de Investigaciones - Herbario PSO- de la Universidad de Nariño, el ejemplar recolectado en el municipio de Nariño fue clasificado taxonómicamente como especie *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn, con código de inclusión N° 45802 perteneciente a la familia

Melastomáceae y el ejemplar recolectado en el corregimiento de San Fernando fue clasificado como especie *Tibouchina mollis* (Bonpl.) Cogn perteneciente también a la familia Melastomaceae con código de inclusión N° 45801.

#### 4.3. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS PIGMENTOS

Se recolectó un total de 300 g de pétalos de flores de las dos especies, posteriormente luego de la maceración (proceso descrito en la sección 3.2.1) se determinó que el % de extracto crudo en *T.urvilleana* (ECU) es de 18,29% y en *T.mollis* (ECM) de 13,43%. En general, los métodos de extracción de los pigmentos no son selectivos ya que también son capaces de co-extraer una gran cantidad de compuestos polares, entre estos los más comunes son polímeros de carbohidratos de alto peso molecular conocidos como mucílagos, de consistencia gomosa y/o viscosa que posteriormente podrían dificultar las técnicas cromatográficas de separación e identificación de los compuestos de interés<sup>156</sup>. En consecuencia, fue necesario aislarlos aplicando una metodología de purificación con etanol, solvente en el cual los mucílagos son insolubles. Al añadir etanol a los extractos crudos, previamente disuelto en agua, se disminuye la polaridad del medio y por lo tanto también disminuye el grado de hidratación de los grupos iónicos de las moléculas de carbohidratos que conforman los mucílagos, provocando su precipitación y/o coagulación, de manera que posteriormente se pueden retirar por centrifugación<sup>157</sup>.

Además de extraer mucílagos en el proceso de maceración química, también pueden coeluir algunos fitocomponentes como azúcares, proteínas o aminoácidos que pueden ser afines a la polaridad del solvente<sup>158</sup>. Por lo anterior, los extractos crudos se purificaron mediante retención selectiva sobre amberlita XAD-7 con el fin de eliminar gran parte de estos componentes y así obtener extractos de menor masa, pero con una composición menos compleja, logrando un enriquecimiento de los compuestos de interés. Este proceso de aislamiento fue relevante puesto que permitió eliminar posibles interferentes de los extractos iniciales, facilitando la identificación y una determinación más precisa de las propiedades antioxidantes de los analitos. En este proceso se aislaron 1,28 g de EPU y 1,98 g de EPM que corresponden al 30% y 30,5% de los extractos crudos.

---

<sup>156</sup> BRAGA, M.E.M., et al. *Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products*. En: ROSTAGNO, Mauricio A. y PRADO, Juliana M. (Eds.). *Natural Product Extraction: Principles and Applications*. Cambridge, UK: RSC Publishing. (2013). p. 231.

<sup>157</sup> CAPITANI, M. I. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica* L.) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Exactas. 2013. p. 90.

<sup>158</sup> BASANTE VALENCIA, Jessica Saray. Estudio De La Composición Y Actividad Antioxidante *In Vitro* De La Fracción Polifenólica De Subproductos De Aguacate (*Persea Americana Mill*), Semilla Y Epicarpio. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Departamento de Química, (2016).



#### 4.4. SEPARACIÓN DE ANTOCIANINAS MONOMÉRICAS Y POLIMÉRICAS

El fraccionamiento de los extractos purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana* se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño molecular, usando como fase estacionaria resina Sephadex LH-20. Durante el proceso se recogió un total de 5 fracciones, 1 fracción de antocianinas monoméricas (menor peso molecular) (F1), 3 fracciones intermedias (F2-F3 y F4) y 1 fracción de antocianinas poliméricas (F5) cada una con un color característico. En la tabla 4 se indica el peso seco de cada una de ellas al igual que su porcentaje de recuperación. Los porcentajes altos de recuperación de F5-M y F5-U (fracciones más pesadas) muestran que este tipo de compuestos son los que están en mayor proporción.

Tabla 4. Fracciones de antocianinas monoméricas y poliméricas en los extractos EPU y EPM

<b>Mezcla de solventes</b>	<b>Fracción</b>	<b>Peso obtenido (mg)</b>	<b>% de recuperación</b>
<b>metanol: ácido fórmico 1% (2:1)</b>	F1-U	50,4	5,04
	F2-U	38,0	3,80
	F3-U	31,6	3,16
	F4-U	39,4	3,94
	F1-M	59,8	5,44
	F2-M	31,3	2,85
	F3-M	87,6	7,96
	F4-M	83,2	7,56
<b>Acetona: ácido fórmico 1% (2:1)</b>	F5-U	500,3	50,03
	F5-M	499,5	45,4

Los valores en esta tabla son a partir de 1 g de EPU y 1,1 g de EPM.

Fuente: Esta investigación

#### 4.5. CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS

##### 4.5.1. Cuantificación de antocianinas monoméricas

Para conocer la concentración de antocianinas monoméricas en los extractos crudos y purificados de las dos especies se aplicó el método de pH diferencial mediante la metodología descrita en la sección 3.3.1. El método se basa en las transformaciones estructurales reversibles con el cambio del pH y lo que se ve reflejado en el cambio en la absorbancia. La formación del catión flavilio u oxonio coloreado predomina a pH 1.0 de manera que la acidez genera una capa protectora sobre la molécula y la formación hemicetal y chalcona incolora se forma a pH 4.5

debido a una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2 de la molécula. El método del pH diferencial se basa en estos principios y permite de manera segura y rápida medir el total de antocianinas monoméricas<sup>159</sup>. La cantidad de antocianinas monoméricas en los extractos crudos (ECU y ECM) y purificados (EPU y EPM) se expresó en mg de cianidina-3-glucósido/ 100 g de muestra. Estos datos registrados en la tabla 5 indican que la especie *T.urvilleana* tiene un mayor contenido de antocianinas monoméricas (4,44 mg cy-3-glu /100 g de pétalos frescos y 24,3 mg cy-3-glu /100 g de ECU seco).

Tabla 5. Contenido de antocianinas monoméricas en extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana*

<b>Muestra</b>	<b>Contenido de antocianinas monoméricas*</b>
<b>ECU</b>	4,44 ± 0,015 <sup>a</sup>
	24,3 ± 0,08 <sup>b</sup>
<b>ECM</b>	1,19 ± 0,069 <sup>a</sup>
	7,0 ± 0,012 <sup>b</sup>
<b>EPU</b>	26,63 ± 0,1 <sup>b</sup>
<b>EPM</b>	13,89 ± 0,24 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>mg cy-3-glu /100 g de pétalos frescos

<sup>b</sup>mg cy-3-glu / 100 g extracto seco (ECU, EPU, ECM y EPM)

\*Datos con ± DE de tres réplicas.

Fuente: Esta investigación

El tratamiento estadístico de los datos de esta investigación se realizaron usando el programa estadístico STATGRAPHICS 18. Así, mediante la prueba de múltiples rangos (Tabla 6), que aplica un procedimiento de comparación para mostrar las diferencias estimadas entre cada par de medias, se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% cuando se comparan los valores del contenido de antocianinas monoméricas de los extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana*. El análisis de los datos también permite establecer la eficiencia del proceso de purificación logrado mediante la retención selectiva de los polifenoles (antocianinas) en las dos variedades de *Tibouchina* sobre una resina tipo XAD-7, se evidencia que para el caso de la *T. mollis* el EPM se consiguió enriquecer en casi 7 veces el contenido de antocianinas.

<sup>159</sup>QUIÑONES, Ximena., RODRÍGUEZ C, Karen., Evaluación Del Extracto De Flavonoles Y Antocianinas Contenidos En El Agraz (*Vaccinium Meridionale Swartz*) Obtenidos A Nivel Laboratorio Por Medio De Los Métodos De Extracción Por Solventes Y Extracción Asistida Por Microondas. Proyecto integral de grado para optar el título de: INGENIERO QUÍMICO. Fundación Universidad De América Facultad De Ingenierías. Bogotá. (2016)

Tabla 6. Prueba de Múltiple Rangos para los valores del contenido de antocianinas monoméricas para los extractos crudos y purificados de *T.urvilleana* y *T.mollis*

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media*</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>ECM</b>	3	1,19	X
<b>EPM</b>	3	13,89	X
<b>ECU</b>	3	24,3	X
<b>EPU</b>	3	26,63	X

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
<b>ECM - EPM</b>	*	-12,7	0,298662
<b>ECM - ECU</b>	*	-23,11	0,298662
<b>ECM - EPU</b>	*	-25,44	0,298662
<b>EPM - ECU</b>	*	-10,41	0,298662
<b>EPM - EPU</b>	*	-12,74	0,298662
<b>ECU - EPU</b>	*	-2,33	0,298662

\* indica una diferencia significativa.

\* El contenido de antocianinas monoméricas de los extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana* se registra en mg cy-3-glu / 100 g extracto seco

Fuente: Esta investigación

Realizando una comparación del contenido de compuestos antociánicos (datos expresados en la tabla 5), con otras variedades de *Tibouchina* se encontró que *T.mollis* y *T.urvilleana* presentan menor contenido de antocianinas monoméricas con respecto a *T. semidecandra* L, estudiada por Janna *et al*<sup>160</sup>, quienes encontraron una concentración de 2598 mg cy-3-glu/ 100 g pétalos frescos. Al comparar su contenido con otras flores silvestres se encontró que *T. mollis* presenta un contenido similar a los extractos de los pétalos de las flores *Borago officinalis*, *Calendula officinalis* y *Tagetes erecta* con valores de  $1,43 \pm 0,1$  mg cy-3-glu /100 g pétalos frescos,  $0,47 \pm 0,1$  mg cy-3-glu /100 g pétalos frescos y  $0,75 \pm 0,1$  mg cy-3-glu /100 g pétalos frescos (reportados por Benvenuti<sup>161</sup>), respectivamente. Por otro lado el extracto crudo de *T. urvilleana* presenta un contenido similar al contenido del extracto de *Ageratum houstonianum* con  $2.99 \pm 0,2$  mg cy-3-glu /100 g pétalos frescos.

<sup>160</sup> JANNA, O. A. *et al.* Op. cit. p. 1640–1646.

<sup>161</sup> BENVENUTI, Stefano., BORTOLOTTI, Elisa., and MAGGINI, Rita. *Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers.* In: Scientia Horticulturae. January (2016). vol. 199. p. 170–177.

#### 4.5.2. Cuantificación de antocianinas poliméricas

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de pH sustractivo, el cual se basa en la resistencia de las antocianinas poliméricas a la decoloración por el uso de agentes blanqueadores. El metasulfito de sodio, decolora completamente las antocianinas monoméricas, las cuales al reaccionar forman un compuesto derivado de ácido sulfónico, que no presenta coloración debido a la pérdida de la conjugación del anillo C. De tal manera que la absorbancia a 420 nm, a la longitud de máxima absorbancia y a 700 nm dependerá únicamente de los pigmentos poliméricos contenidos en la muestra. En la tabla 7 se muestran los datos de densidad de color, color polimérico y % color polimérico, determinados según la sección 2.1.10.2 para los extractos crudos ECU y ECM y purificados EPU y EPM.

Tabla 7. Contenido de antocianinas poliméricas de los extractos crudos y purificados de *T.urvilleana* y *T.mollis*

<b>Muestra</b>	<b>Densidad del color*</b>	<b>Color polimérico*</b>	<b>% de color polimérico*</b>
<b>ECU</b>	30,96 ± 0,031	5,82 ± 0,005	18,79 ± 0,024
<b>EPU</b>	30,21 ± 0,18	5,97 ± 0,20	19,76 ± 0,60
<b>ECM</b>	32,12 ± 0,11	27,46 ± 0,18	76,67 ± 0,52
<b>EPM</b>	35,82 ± 0,027	28,35 ± 0,078	88,24 ± 0,12

\* Datos con DE de tres réplicas

Fuente: Esta investigación

Los valores obtenidos para el % de color polimérico indican que existe una contribución importante de la fracción polimérica al color de los extractos crudos de *T.mollis*, alrededor de 88,24% (Tabla 7). Estos resultados están en concordancia con el contenido de antocianinas monoméricas discutido anteriormente, es decir las flores de *T. mollis* contienen menos antocianinas monoméricas y más antocianinas de tipo polimérico. Lo contrario ocurre para *T. Urvilleana*, en este caso las flores están más enriquecidas en antocianinas monoméricas.

La literatura muestra que extractos enriquecidos en antocianinas poliméricas pueden aumentar la estabilidad del color del extracto, ya que este tipo de moléculas no permiten un cambio pronunciado y reversible del color cuando se varía el pH<sup>162</sup>. En la tabla 8 se muestra la prueba de múltiples rangos y se puede establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%) cuando se comparan los valores del porcentaje de color polimérico de los extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T urvilleana*.

<sup>162</sup> QUIÑONES, Ximena., RODRÍGUEZ C, Karen., Op. cit. (2016)

Tabla 8. Prueba de múltiple rangos para los valores del contenido de antocianinas poliméricas de los extractos crudos y purificados de *T.urvilleana* y *T.mollis*

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>ECU</b>	3	18,79	X
<b>EPU</b>	3	19,76	X
<b>ECM</b>	3	76,67	X
<b>EPM</b>	3	88,24	X

Fuente: Esta investigación

#### 4.5.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS

##### 4.5.3.1. Análisis por HPLC analítica (HPLC-PAD)

Con el fin de tener un perfil cromatográfico de los compuestos aislados en las diferentes muestras, inicialmente se realizó un análisis por HPLC-PAD del extracto purificado de *T.mollis* y *T.urvilleana* (EPM y EPU) y de las fracciones de menor, peso molecular (F1-M, F1-U, F3-M, y F3-U). La separación se realizó en modo fase reversa, siguiendo la metodología descrita en la sección 3.4.1. La columna XTerra-C<sub>18</sub> utilizada, presenta una estructura donde uno de cada tres silanoles está sustituido por un grupo metilo y por tanto, actúa como adsorbente apolar<sup>163</sup>, de manera que los compuestos polares tendrán una menor fuerza de absorción y por consiguiente, el orden de elución será de mayor a menor polaridad. El orden de elución en columna C<sub>18</sub> es normalmente una función del número de grupos hidroxilo y de su grado de metoxilación de las antocianinas. Teniendo en cuenta lo anterior, a continuación se presenta el orden de elución en el tiempo, tentativo: ((**delfinidina** (Dp) <**cianidina** (Cy) <**petunidina** (Pt) <**pelargonidina** (Pg) <**peonidina** (Pn) <**malvidina** (Mv)), junto con el número de glucósidos y su patrón de acilación (**diglucósidos** (digluc) <**monoglucósidos** (gluc) <**acetil-glucósidos** (ac-gluc) <**cafeín-glucósidos** (cff-gluc) <**cumaroil-glucósidos** (cum-gluc)). Por otra lado, en este análisis, los medios ácidos como el ácido fórmico (fases móviles A y B), permitieron el desplazamiento completo de los equilibrios al catión de flavilio, lo que resulta en una mejor resolución y una gran absorbancia característica entre 515 y 540 nm<sup>164</sup>. Se debe destacar que el análisis on-line de los espectros UV-Vis de cada componente servirá como aportes para la caracterización de la estructura y la identificación parcial de cada compuesto. Este estudio permitió tener una idea del

<sup>163</sup> WATERS CORPORATION U.S.A. The most succesful Column in Over 30 Years of Stationary Phase Technology. In: XTerra Columns. Disponible en <<http://waters.com/xterra>>

<sup>164</sup> GARY, Takeoka and LAN. Dao. Op cita. 2008, p. 247.

tipo de antocianinas y flavonoles presentes en los extractos y fracciones de *T.urvilleana* y *T.mollis*, un análisis más riguroso se realizará con mayor detalle en la caracterización realizada por UHPLC-ESI-MS.

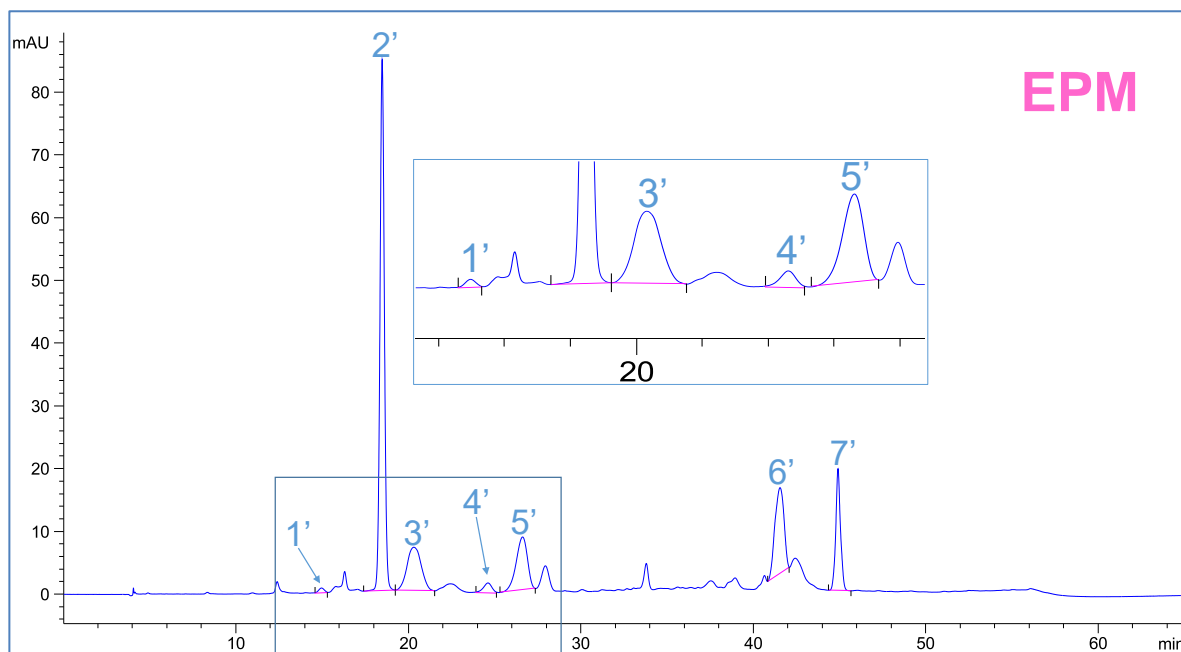
#### 4.5.3.2. Análisis por UHPLC-ESI-MS

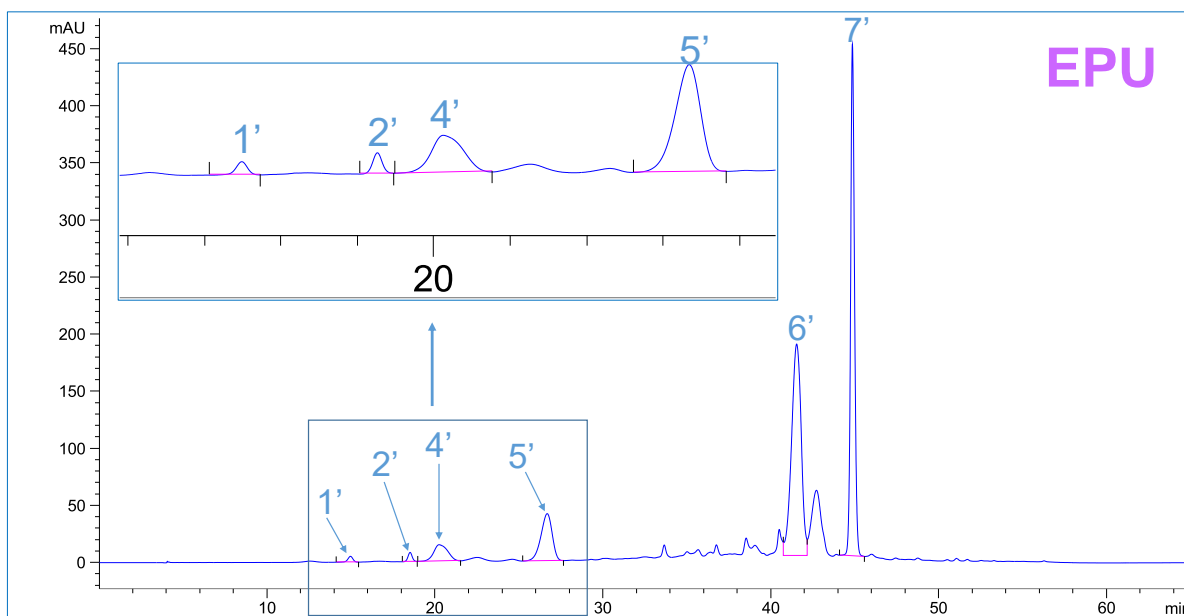
El análisis de los compuestos antociánicos se realizó por UHPLC-ESI-MS en modo positivo y el análisis de los flavonoles en modo negativo. Mediante el uso de una mezcla de estándares de compuestos fenólicos adquiridos en una casa comercial y con la ayuda de información reportada en la literatura, fue posible identificar parcialmente algunos compuestos presentes en el extracto purificado de *T.mollis* y de *T.urvilleana* (EPM y EPU) y también en sus respectivas fracciones F1, F2, F3, F4 y F5.

##### 4.5.3.2.1. Identificación parcial de compuestos antociánicos en los extractos y fracciones aisladas de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

En las figura 28 se muestran los perfiles cromatográficos registrados a 520 nm de los extractos purificados (EPM y EPU) y de las fracciones de menor e intermedio peso molecular en el anexo E.

Figura 28. *Perfiles cromatográficos registrados a 520 nm de los extractos purificados (EPM y EPU)*

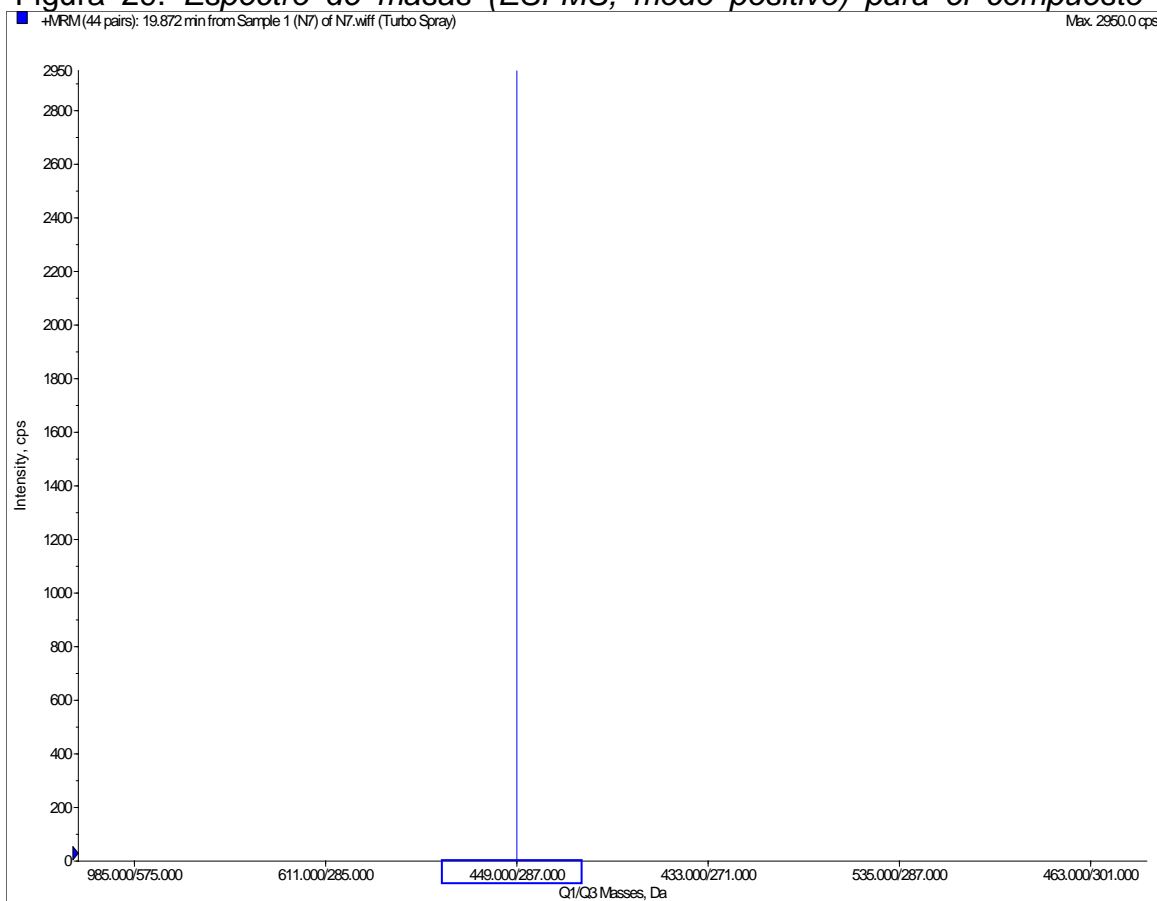




Fuente: Esta investigación

La identificación parcial de los picos mayoritarios de los cromatogramas de EPM y EPU de la figura 28 se realizó por UHPLC-ESI-MS en modo positivo. Los datos muestran que la composición de antocianinas es muy similar en las dos especies de *Tibouchina* (*T.mollis*, *T.urvilleana*). En el extracto enriquecido de *T.mollis* (EPM) se identificaron parcialmente 7 compuestos, de los cuales el pico 2' es el mayoritario (% área: 46,4., tabla 9). Este pico con tiempo de retención ( $t_r$ : 17.841 min) presentó en su espectro de masas (Figura 29) un ion pseudomolecular en  $m/z$  449 y un ion fragmento en  $m/z$  287 debido a la pérdida de 162 unidades correspondiente a una hexosa. El ion  $[M+H-162]^+$  sugiere que la aglicona es la cianidina. De esta forma, se plantea que la estructura más probable es la **cianidina 3-O-glucósido** (Figura 30). En la tabla 9 se presentan las características de todos los compuestos identificados.

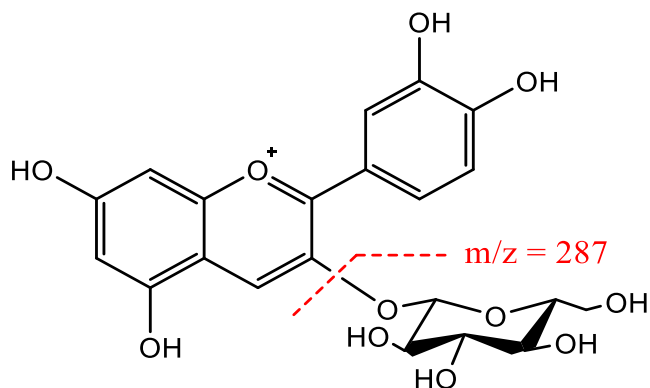
Figura 29. Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) para el compuesto 2'



Fuente: Esta investigación



Figura 30. Estructura propuesta para el compuesto 2'

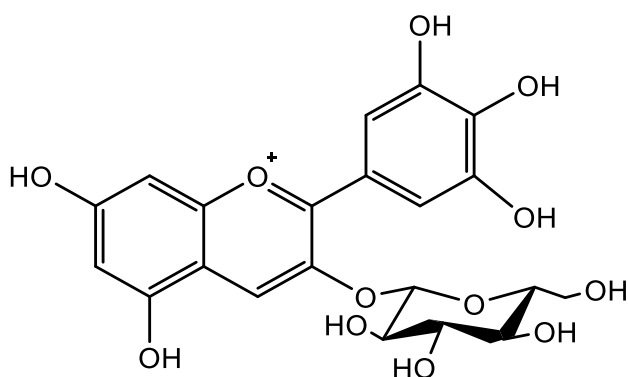


**Cianidina-3-O-glucósido**

Fuente: Sun-Waterhouse D., Zhou J. and Wadhwa S., 2013.

En el EPM también se identificó la antocianina **Delfinidina-glucósido** (pico 1', % área: 0,63), la cual no está presente en ninguna de las fracciones obtenidas a partir de este extracto. Este compuesto con tiempo de retención ( $t_R$ : 14.956 min) presentó un ion pseudomolecular  $[M+H]^+$  en  $m/z = 465$  y un ion fragmento en  $m/z = 303$   $[M+H-162]^+$  que corresponde a la pérdida de 162 unidades de una molécula de hexosa, originando la aglicona delfinidina de fórmula  $C_{15}H_{11}O_7$  (Figura 31).

Figura 31. Estructura química del compuesto 1'



**Delfinidina-3-O-glucósido**

Fuente: Sun-Waterhouse D., Zhou J and Wadhwa S., 2013.

Tabla 9. Antocianinas identificadas parcialmente en los extractos purificados EPM y EPU

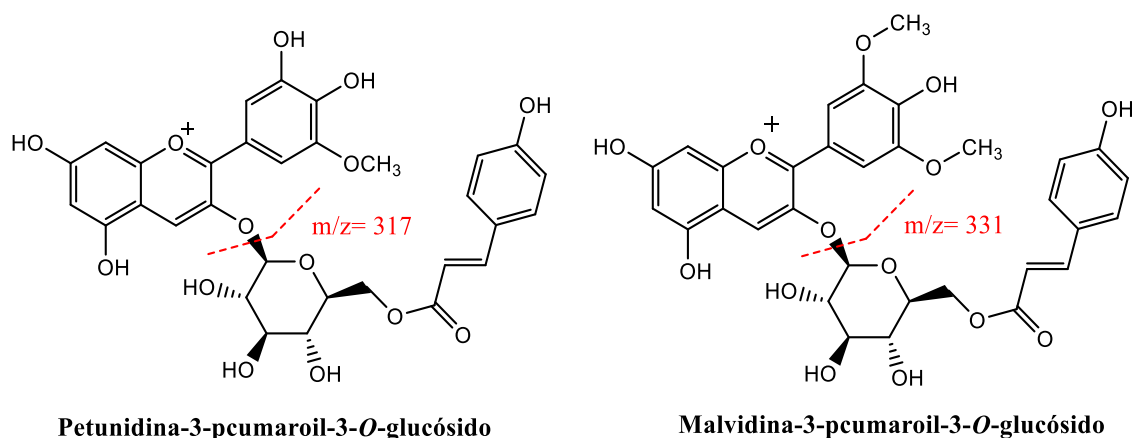
$\lambda$ (nm)	No de Pico	% Área EPM	% Área F1-M	% Área F2-M	% Área F3-M	% Área EPU	% Área F1-U	% Área F2-U	% Área F3-U	% Área F4-U	Tiempo de retención (min)	[M+H] <sup>+</sup>	Frag	Identificación parcial
520	1'	0,63	-	-	-	0,61	0,53	0,50	0,56	0,85	14.956	465	303	Delfinidina-glucósido
	2'	46,4	19,3	63,2	44,37	0,79	1,43	0,78	0,80	1,0	17.841	449	287	Cianidina-3-O-glucósido
	3'	12,3	42,0	5,11	-	-	21,9	1,32	0,65	5,40	19.723	479	317	Petunidina-3-O-glucósido
	4'	1,75	1,92	1,33	-	4,73	1,28	0,13	0,08	-	23.665	463	301	Peonidina-3-O-glucósido
	5'	11,9	27,3	5,96	-	10,87	24,8	3,64	1,46	-	25.491	493	331	Malvidina-3-O-glucósido
	6'	15,5	9,26	24,39	-	41,99	39,9	71,2	43,0	42,4	41.527	625	317	Petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
	7'	11,6	0,27	-	52,7	41,0	10,2	22,4	53,5	53,5	44.850	639	331	Malvidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
	8'	-	-	-	2,93	-	-	-	-	-	-	32.591	-	-

\*[M+H]<sup>+</sup>: ion molecular, Frag: ion fragmento

Fuente: Esta investigación

Con respecto a los compuestos antociánicos, en el extracto enriquecido de *T.urvilleana* (EPU) se lograron identificar parcialmente 6 compuestos, de los cuales los picos **6'** y **7'** fueron los mayoritarios (% área: 41,99 y 41% respectivamente). El pico **6'** (**tr: 41.527 min**) se identificó como **Petunidina-3-*p*-cumaroil-3-*O*-glucósido**, esta señal mostró un ion pseudomolecular en  $m/z$  625  $[M+H]^+$  y un ion fragmento en  $m/z$  317  $[M+H-308]^+$ , debido a la pérdida de una unidad de *p*-cumaroilglucósido, este ion fragmento corresponde a la aglicona petunidina. Para el pico **7'** con un tiempo de retención (**tr: 44,847 min**), mostró un ion pseudomolecular  $[M+H]^+$  en  $m/z$  639 y un ion fragmento en  $m/z$  331 correspondiente a la aglicona malvidina. La pérdida de 308 unidades  $[M+H-308]^+$  corresponde a una unidad de glucosa (162 u) y a la pérdida del ácido *p*-cumárico (146 u). A partir de estas señales, este último pico se identificó parcialmente como **Malvidina-3-*p*-cumaroil-3-*O*-glucósido**. La estructura de estos compuestos se muestra en la figura 32<sup>165</sup>.

Figura 32. Estructura química del compuesto **6'** y **7'**

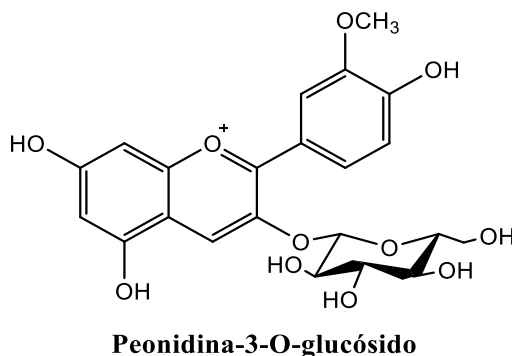


Fuente: OLIVEIRA Joana *et al*, 2015.

El compuesto **4'** (**tr: 23.665 min y % área: 4,73**) también fue identificado en el EPU de *T.urvilleana* como **Peonidina-3-*O*-glucósido**, esta señal mostró un ion pseudomolecular en  $m/z$  463  $[M+H]^+$  y un ion fragmento en  $m/z$  301  $[M+H-162]^+$ , debido a la pérdida de una unidad de hexosa, este ion fragmento corresponde a la aglicona peonidina (Figura 33).

<sup>165</sup> OLIVEIRA Joana, DA SILVA Mara Alinho, TEIXEIRA Natercia, DE FREITAS Victor and SALAS Erika. *Screening of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments in red wine grape pomace using LC/DAD-MS and MALDI-TOF techniques*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. April, (2015).

Figura 33. Estructura química del compuesto 4'



Fuente: Sun-Waterhouse D., Zhou J. y Wadhwa S., 2013.

En la tabla 10 se presentan algunos parámetros espectroscópicos de importancia para los compuestos mayoritarios presentes en los extractos purificados EPM y EPU (figura 34). De acuerdo con literatura las relaciones de absorbancia  $Abs_{\lambda 440} / Abs_{\lambda máx-(vis)}$  mayores a 0,3 sugieren que las antocianinas son monoglucósidos sustituidos en la posición 3 y la acilación se puede determinar de la relación  $A_{máx-acil} / A_{máx-vis}$  (la  $A_{máx-acil}$  se encuentra entre los 310 y 360 nm). Si esta relación es menor a 0,4 no hay acilación, si se encuentra 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<sup>166,167</sup>.

Tabla 10. Parámetros espectroscópicos (UV-Vis) para las antocianinas mayoritarias presentes en EPM y EPU

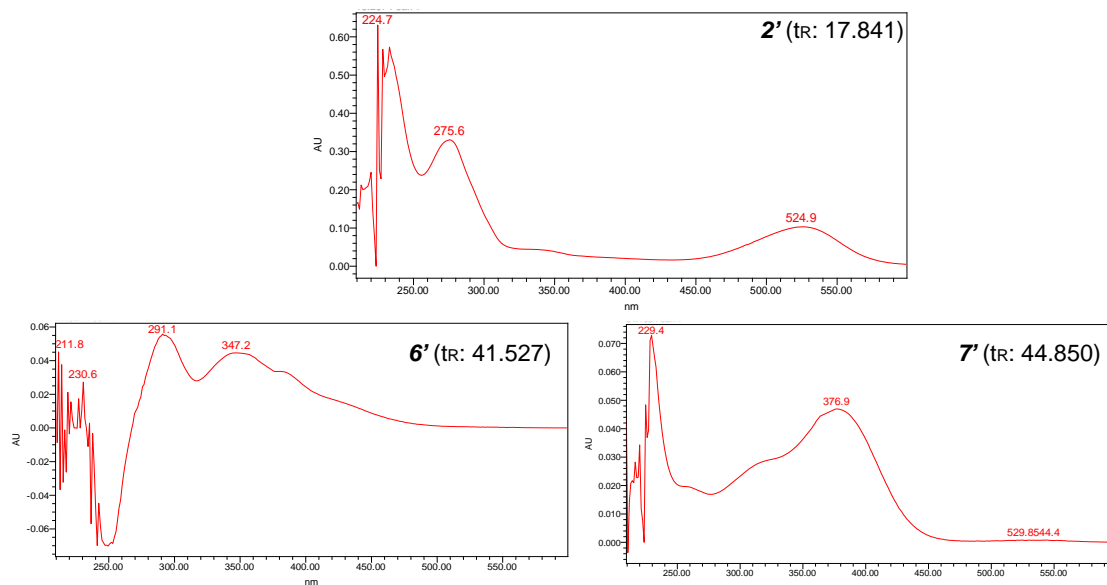
N° de Pico	Tiempo de retención (min)	$\frac{A_{440}}{A_{\lambda Vis-máx}}$	$\frac{A_{Máx-acil}}{A_{\lambda Vis-máx}}$
2'	17.841	0,301	-
6'	41.527	0,356	0,52
7'	44.850	0,318	0,64

Fuente: Esta investigación

<sup>166</sup> VILLACREZ YEPEZ, Jose L. *Desarrollo de microencapsulados por SPRAY DRYING a partir de frutos de mora de castilla (Rubus glaucus Benth)*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 2013.

<sup>167</sup> GIUSTI, Mónica and WROLSTAD, Ronald. *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. *In*: Biochemical Engineering Journal. June, (2003), vol. 14(3). p. 217–225.

Figura 34. Espectros UV-Vis de las antocianinas **2'** (tr: 17.841 min), **6'** (tr: 41.527 min) y **7'** (tr: 44.850 min)



Fuente: Esta investigación

Los datos anteriores permiten confirmar que el compuesto **2'**, **6'** y **7'** están glicosiladas en la posición 3 además estos dos últimos picos poseen en su estructura un grupo acilo. Estos resultados confirman los fragmentos observados por espectrometría de masas.

En términos generales, los compuestos presentes en los extractos purificados EPM y EPU se encuentran también en las fracciones obtenidas mediante exclusión por tamaño, sin embargo en los extractos están en diferentes proporciones, por ejemplo en la F1-M los compuestos mayoritarios son el pico **3'** y **5'** (% área: 42,01 y 27,27 respectivamente), en la F2-M los compuestos **2'** y **6'** (% área: 63,21 y 24,39 respectivamente) y en la fracción F3-M el pico **7'** (% área: 52,71). Por otro lado en las fracciones de *T.uvilleana*, en F1-U las antocianinas mayoritarias son el pico **5'** y **6'** y en F2-U, F3-U y F4-U los compuestos representados por los picos **6'** y **7'**. El % de área en estos picos fue de: (% área: 71,21 y 22,43); (% área: 42,96 y 53,50) y (% área: 42,38 y 50,38) respectivamente.

Los perfiles cromatográficos de las dos especies presentan el mismo orden de elución, el cual es corroborado con reportes de la literatura, el orden que se observó en los perfiles cromatográficos es el siguiente: **Delfinidina < Cianidina < Petunidina < Peonidina < Malvidina < Petunidina-3-pcumaroil-3-o-glu < Malvidina-3-pcumaroil-3-o-glu.**

En la tabla que se presenta a continuación se muestra un resumen de los compuestos identificados y cuales están presentes en cada muestra (extracto o fracción).

Tabla 11. *Compuestos tipo antocianina presentes en los extractos purificados EPM EPU y las fracciones obtenidas de T.mollis T.urvilleana*

$\lambda$ (nm)	Nº de Pico	Identificación parcial	<i>T.mollis</i>				<i>T.urvilleana</i>				
			EPM	F1	F2	F3	EPU	F1	F2	F3	F4
520	1'	Delfinidina glucósido	X				X	X	X	X	X
	2'	Cianidina-3-O-glucósido	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	3'	Petunidina-3-O-glucósido	X	X	X			X	X	X	X
	4'	Peonidina-3-O-glucósido	X	X	X		X	X	X	X	
	5'	Malvidina-3-O-glucósido	X	X	X		X	X	X	X	
	6'	Petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido	X	X	X		X	X	X	X	X
	7'	Malvidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido	X	X		X	X	X	X	X	X
	8'	Desconocido				X					

X: indica la presencia de los compuestos en las muestras de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

Fuente: Esta investigación

Como se puede apreciar en la tabla 11, los compuestos identificados parcialmente son derivados de las antocianinas más comunes que se encuentran en la naturaleza, como la delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina<sup>168</sup>. Estos se identificaron en los extractos purificados y las fracciones de menor e intermedio peso molecular, no se evidenció la presencia de estos compuestos en las fracciones de mayor peso molecular (F4-M, F5-M y F5-U). Se observa además que en extracto purificado de *T.urvilleana* (EPU) no se detectó Petunidina-3-O-glucósido, además en F3 (fracción intermedia) de EPM se identificó algún remanente de Cianidina-3-O-glucósido y Malvidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido., como se mencionó anteriormente el EPM esta más enriquecido en antocianinas u otros polifenoles de tipo polimérico que pueden quedar retenidos en la columna.

Gracias a estudios e investigaciones hay evidencia científica de que los extractos ricos en estos compuestos pueden mejorar la agudeza visual, mostrar actividad antioxidante, atrapar radicales y actuar como agentes quimioprotectores. Las antocianinas también juegan un papel en las propiedades antidiabéticas tales como

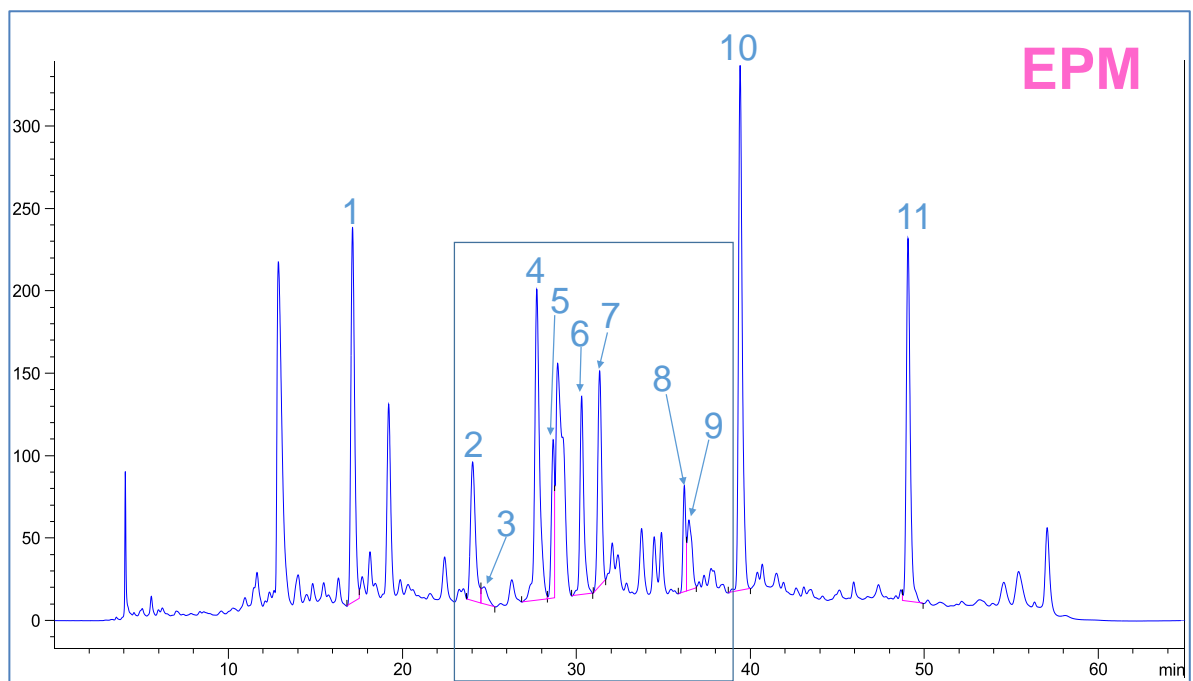
<sup>168</sup> CASTAÑEDA-OVANDO Araceli, *et al.* *Chemical studies of anthocyanins: A review.* In: Food Chemistry. September, (2009), vol. 113(4). p. 859–871.

control de lípidos, secreción de insulina y efectos vasoprotectores<sup>169</sup>. En este sentido las propiedades funcionales de las antocianinas abren una nueva perspectiva para la obtención de productos coloreados con valor agregado para el consumo humano.

#### 4.5.3.2.2. Identificación parcial de flavonoles en los extractos purificados y fracciones aisladas de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

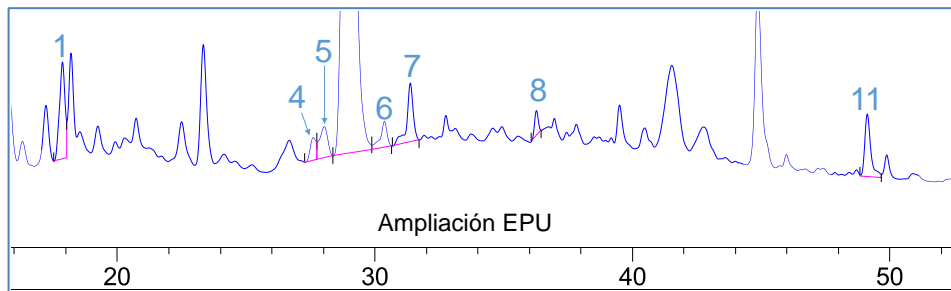
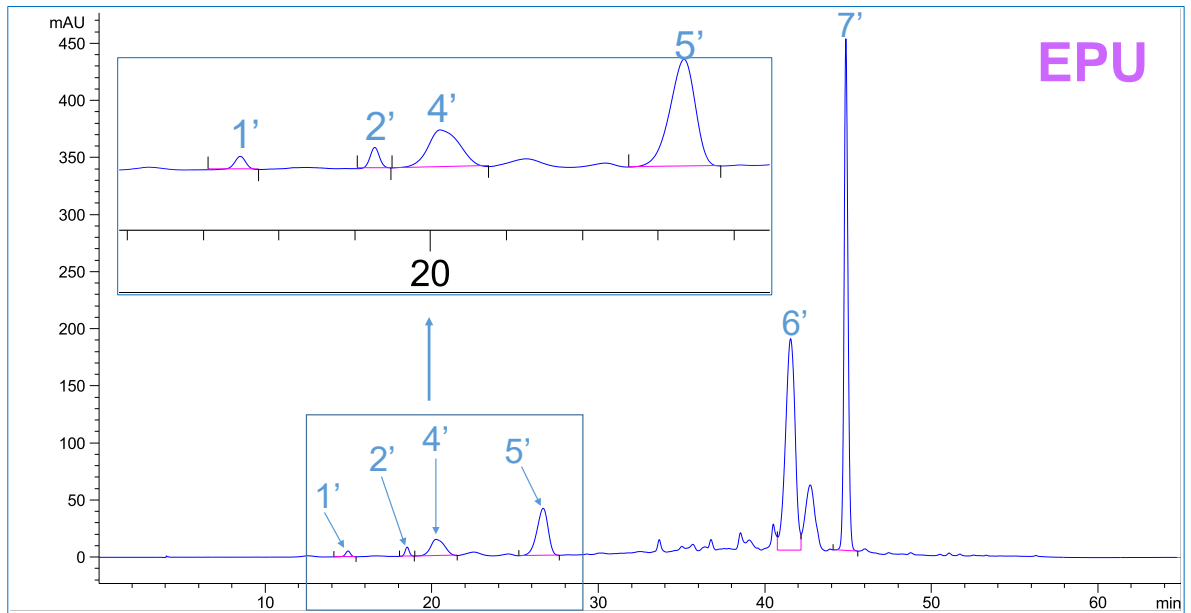
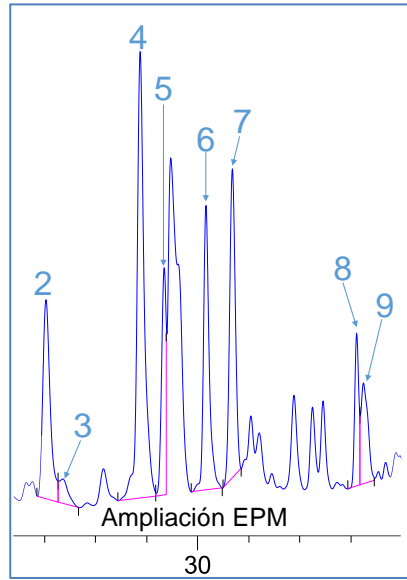
En la figura 35 se presentan los perfiles cromatográficos de los extractos purificados de las dos especies, registrados a una longitud de onda de 360 nm, la cual es característica de diferentes tipos de compuestos fenólicos<sup>170</sup> y los perfiles de las fracciones aisladas se presentan en el anexo F. Posteriormente en las tabla 12 se registran las masas y los tiempos de retención ( $t_R$ ) de los diferentes compuestos identificados.

Figura 35. *Perfiles cromatográficos registrados a 360 nm de los extractos purificados (EPM y EPU)*



<sup>169</sup> SHIPP Jaclyn. and ABDEL-AAL Sayed. M. *Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients*. In: The Open Food Science Journal. (2010). vol. 4. p. 7-22.

<sup>170</sup> ABAD-GARCÍA B. et al. *A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry*. In: Journal of Chromatography A, 2009. vol. 1216, p. 5398–5415.



Fuente: Esta investigación



Como se observa en la figura 35 y en el anexo F, los principales flavonoles detectados en el EPM y EPU fueron separados en diferentes fracciones mediante cromatografía de exclusión por tamaño, lo cual se realizó con el fin de facilitar su identificación y realizar un estudio más preciso de sus propiedades antioxidantes, lo anterior se explica con mayor detalle en la siguiente sección. De igual manera se puede evidenciar la falta de picos identificados, pues la poca información en la literatura de este tipo de matriz (flores) hizo complicada la identificación de varios de los compuestos mayoritarios.

En el extracto purificado de *T.mollis* se identificaron parcialmente 11 compuestos de tipo flavonoide con ayuda de patrones y reportes en la literatura. En este extracto los principales flavonoles se identificaron como derivados de la Quercetina y la Miricetina. Por otro lado el extracto purificado de *T.urvilleana*, se identificó parcialmente 8 flavonoles, donde la mayoría son derivados de la Quercetina. Como se observa en los perfiles cromatográficos de estos extractos, algunos compuestos como el pico **2**, ( $t_R$ : **24.02 min**), pico **3** ( $t_R$ : **24.68 min**), pico **9**, ( $t_R$ : **36.45 min**) y pico **10** ( $t_R$ : **39.39 min**) no se encuentran identificados en el extracto purificado de *T.urvilleana*.

Los picos **2** y **3** con un porcentaje de área relativo (% área: 7,13 y 1,01 respectivamente) se identificaron como **Miricetina-3-O-glucósido** y **Miricetina-3-O-glucorónido**. Sus espectros de masas mostraron un ion pseudomolecular en  $m/z= 479$   $[M-H]^- (C_{21}H_{18}O_{14})$  y en  $m/z= 493$   $[M-H]^- (C_{21}H_{18}O_{14})$  para el compuesto **2** y **3** respectivamente. En ambos compuestos se observó un ion fragmento en  $m/z=317$   $[M-H-176]^- (C_{15}H_9O_7)$  correspondiente a la aglicona Miricetina (Figura 36).

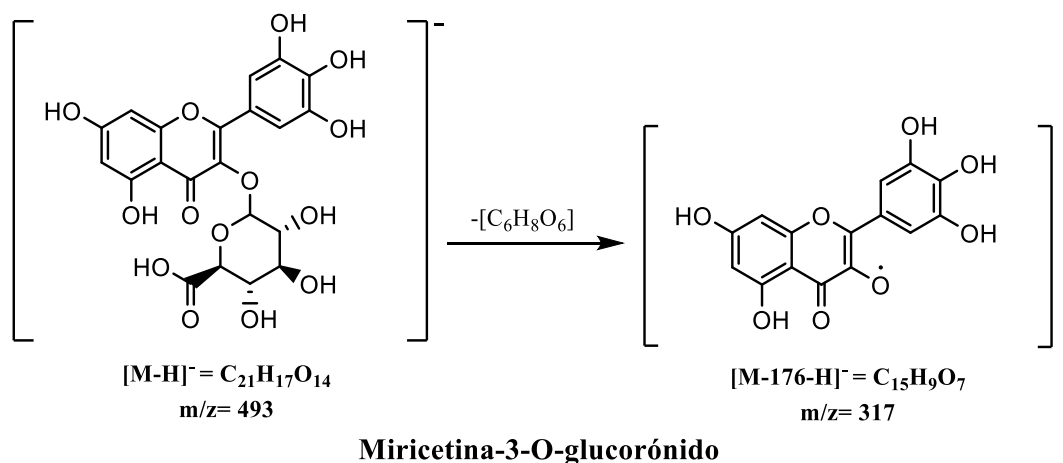
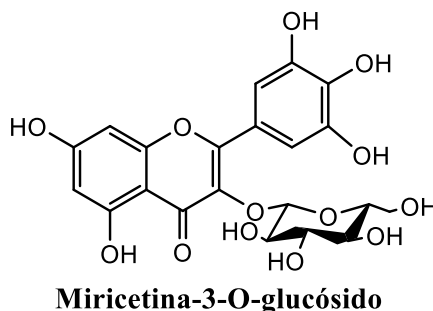
Tabla 12. Flavonoles identificados parcialmente en los extractos purificados EPM y EPU

$\lambda$ (nm)	No de Pico	% Área EPM	% Área F3-M	% Área F4-M	% Área F5-M	% Área EPU	% Área F3-U	% Área F4-U	% Área F5-U	Tiempo de retención (min)	[M-H] <sup>-</sup>	Frag	Identificación parcial
360	1	14,4	-	-	-	5,76	-	-	-	17.12	463	301	Quercetina-3-O-hexosido
	2	7,13	-	2,63	-	-	-	-	-	24.02	479	317	Miricetina-3-O-glucósido
	3	1,01	-	11,9	-	-	-	-	-	24.68	493	317	Miricetina-3-O-glucorónido
	4	15,2	15,6	35,7	-	1,52	-	-	-	27.70	447	285	Kaempferol-3-O-hexosido
	5	5,02	-	-	-	2,74	-	-	-	28.65	491	315	Isorhamnetina-3-O-glucurónido
	12	-	49,6	7,29	-	79,0	-	-	-	28.90	463	301	Quercetin-3-O-hexosido
	6	7,83	34,8	37,5	-	1,91	100	24,9	-	30.29	463	301	Quercetin-3-O-glucósido
	7	8,47	-	4,93	-	4,05	-	47,0	-	31.32	477	301	Quercetin-3-O-glucurónido
	8	3,07	-	-	-	1,01	-	-	-	36.19	477	285	Kaempferol-3-O-glucósido
	9	3,34	-	-	-	-	-	-	-	36.45	461	285	Kaempferol-3-O-glucorónido
	10	20,2	-	-	58,0	-	-	-	-	39.39	317	317	Miricetina
11	14,3	-	-	42,0	4,06	-	28,1	100	49.04	301	301	Quercetina	

[M-H]<sup>-</sup>: ion pseudomolecular, \*Frag: Ion fragmento

Fuente: esta investigación

Figura 36. Estructura química de los compuestos **2** y **3**

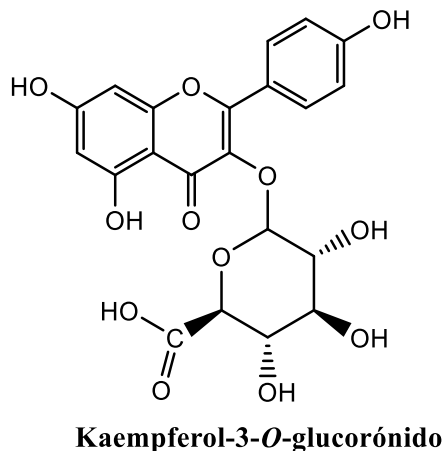


Fuente: Adaptado de XIAO, *et al.* 2012

El pico **9** con un porcentaje de área relativo (% área: 3,34) y tiempo de retención ( $t_R$ : **36.45 min**) se identificó como **Kaempferol-3-O-glucorónido** (Figura 37), su espectro de masas mostró un ion pseudomolecular en  $m/z = 461$   $[M-H]^-$ , y un ion fragmento en  $m/z = 285$   $[M-H-176]^-$  correspondiente a la aglicona Miricetina.

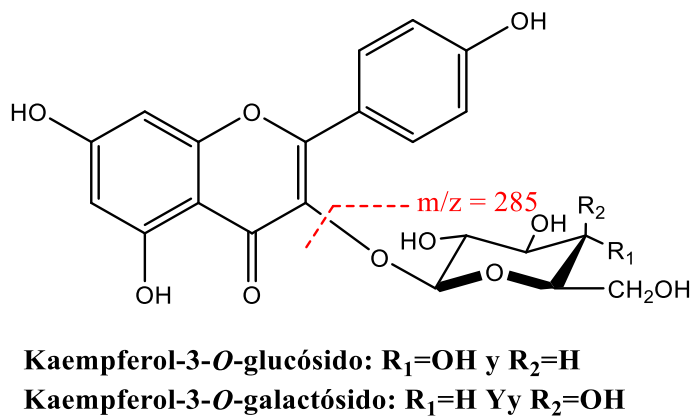
Los picos **4** ( $t_R$ : **27.70 min** y % área: **15,24**), **10** ( $t_R$ : **39.39 min** y % área: **20,16**) y **11** ( $t_R$ : **49.04 min** y % área: **14,32**) fueron los compuestos mayoritarios en EPM. El pico **4** fue identificado como **Kaempferol-3-O-hexósido** por presentar un ion pseudomolecular en  $m/z = 447$   $[M-H]^-$ , que corresponde a una molécula de Kaempferol unida a una hexosa (glucosa o galactosa). De igual forma presentó un ion fragmento en  $m/z = 285$   $[M-H-162]^-$  debido a la pérdida de una hexosa de 162 unidades, que da origen al flavonol Kaempferol (aglicona), de fórmula  $C_{15}H_{10}O_6$ . De este análisis se concluye que el kaempferol está unido a una hexosa y la estructura propuesta para este compuesto es la mostrada en la figura 38.

Figura 37. Estructura química del compuesto **9**



Fuente: Adaptado de XIAO, *et al.* 2012

Figura 38. Estructura propuesta para el compuesto **4**

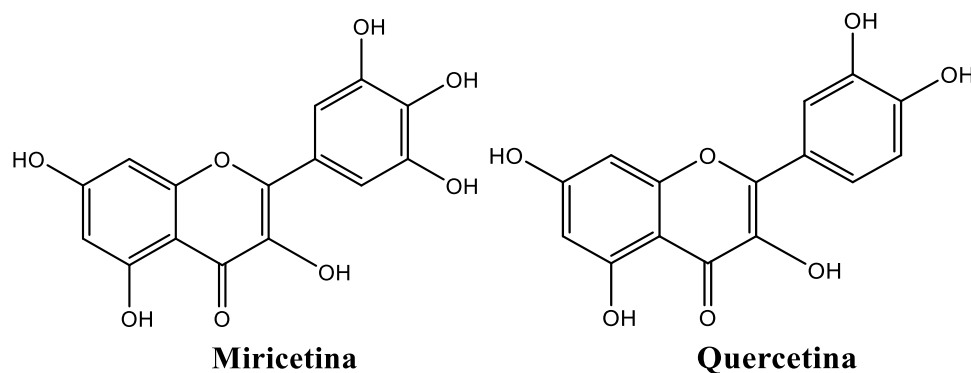


Fuente: Adaptado de VALLS *et al* (2009)

El pico **10** ( $t_R$ : **39.398 min % área: 20,2**) se identificó como el flavonoide **Miricetina**, el cual presentó un ion pseudomolecular en  $m/z = 317$ . El pico **11** ( $t_R$ : **49.048 min % área: 14,3**) mostró un ion pseudomolecular en  $m/z = 301$  que corresponde a la aglicona quercetina, de fórmula  $C_{15}H_{10}O_7$ <sup>171</sup>. La estructura de estos compuestos se observa en la figura 39.

<sup>171</sup> XIAO Jun-Song, XIE Bi-Jun, CAO Yan-Ping, WU Hua, SUN Zhi-Da and XIAO Di. *Characterization of Oligomeric Procyanidins and Identification of Quercetin Glucuronide from Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) Seedpod*. *In: Journal of Agricultural and Food Chemistry*. February (2012). vol. 60. p. 2825–2829.

Figura 39. Estructura química para los compuestos **10** y **11**



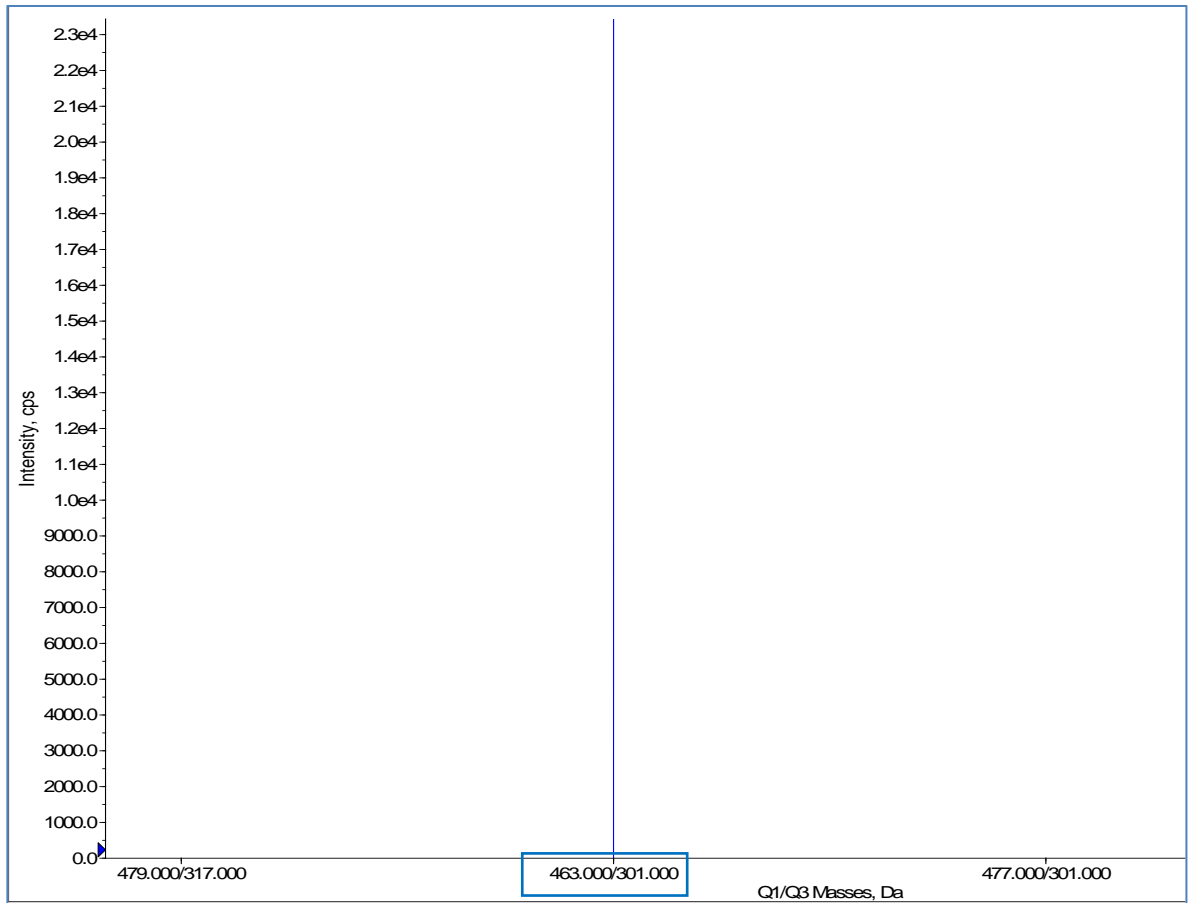
Fuente: Adaptado de VALLS *et al* (2009)

Los compuestos más representativos y mayoritarios en el extracto EPU (pico **1** y **12**) con tiempos de retención (**tr: 17.12 y 28.9 min**) respectivamente, se identificaron como como **quercetina-3-O-hexósido**, los cuales presentaron el mismo ion pseudomolecular en  $m/z$  463  $[M-H]^-C_{21}H_{20}O_{12}$  que corresponde a una molécula de quercetina enlazada a un hexosa, en la figura 40 se muestra el espectro de masas del compuesto **1**. En ambos espectros se observa la relación entre el ion pseudomolecular y el ion fragmento en  $m/z$  301  $[M-H-162]^-$ , debido a la pérdida de una hexosa que puede ser glucosa o galactosa, generando al final la respectiva aglicona del flavonol (quercetina)<sup>172</sup>. De esta manera, se sugiere que los compuestos detectados pueden corresponder a la **quercetina-3-O-glucósido** y **quercetina-3-O-galactósido** (Figura 41)<sup>173</sup>. Sin embargo, con la información analítica disponible no es posible discriminar entre estas estructuras isoméricas.

<sup>172</sup> JERZ, Gerold; GUTZEIT, Derek and WINTERHALTER, Peter. *Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols*. In: Journal of Chromatography A, 2007. vol. 1172, no.1, p.40–46.

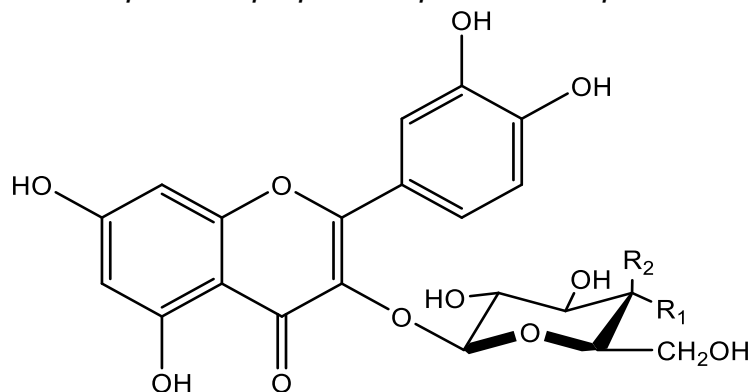
<sup>173</sup> KHALLOUKI F. *et al*. *Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits*. In: Food Chemistry, 2015. vol. 179, p. 191–198.

Figura 40. Espectro de masas (ESI-MS, modo negativo) para el compuesto 1



Fuente: Esta investigación

Figura 41. Estructuras químicas propuestas para los compuestos **1** y **12**



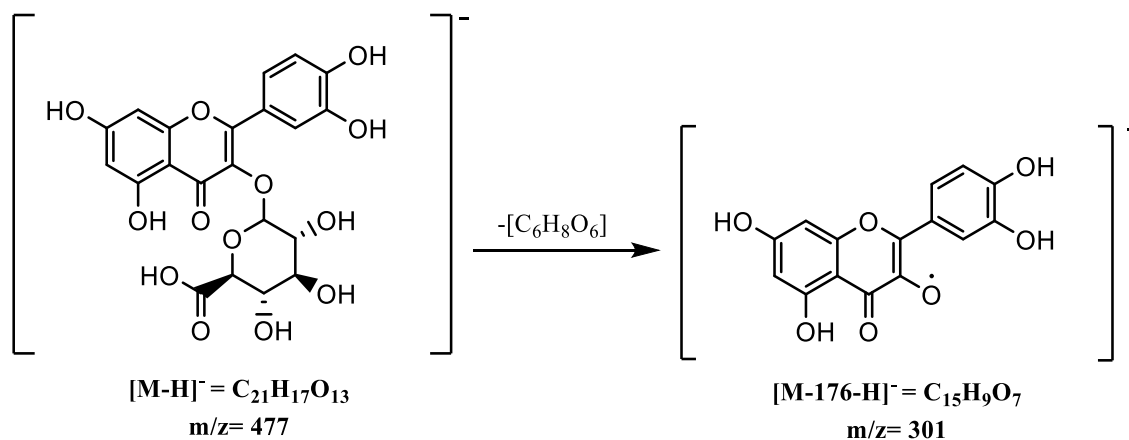
**Quercetina-3-O-glucósido:**  $R_1=OH$  y  $R_2=H$

**Quercetina-3-O-galactósido:**  $R_1=H$  y  $R_2=OH$

Fuente: KHALLOUKI F. *et al.*, 2015 y CASTILLO-MUÑOZ N. *et al.*, 2010.

El pico **7** ( $t_R$ : **31.32 min** y % **área: 4,05**) también presente en EPU se identificó parcialmente como **quercetina-3-O-glucurónido**, su espectro de masas muestra un ion pseudomolecular  $[M-H]^-$  ( $C_{21}H_{17}O_{13}$ ) en  $m/z$  477 correspondiente a la quercetina y un ion fragmento en  $m/z$  301  $[M-H-176]^-$  ( $C_{15}H_9O_7$ ) debido a la pérdida de ácido glucurónico (Figura 42).

Figura 42. Estructura química del compuesto **7**



Fuente: Adaptado de XIAO, *et al.* 2012

En la fracción F3-M se identificaron principalmente 3 compuestos de tipo flavonol, los picos **4** y **12** mencionados anteriormente y el compuesto **6** ( $t_R$ : **30.29 min** y **% área: 100**). Este último pico también se encontró en F3-U y mostró un ion pseudomolecular molecular  $[M-H]^-$  ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ ) con  $m/z$  463 y un fragmento de aglicona en  $m/z$  301 debido a la pérdida de una unidad de glucosa, el ion  $m/z$  corresponde a una molécula de quercetina. De esta forma el compuesto **6** se identificó parcialmente como **quercetina-3-O-glucósido**. Los picos mayoritarios en F4-M fueron los picos **4** (% área: 35,74) y **6** (% área: 37,48) y en la fracción de mayor peso molecular F5-M el pico mayoritario fue el compuesto **10** (% área: 57,98). Por otro lado, en las fracciones F4-U y F5-U se identificaron parcialmente 3 compuestos fenólicos derivados de los flavonoles, entre los que se encuentran los picos **6**, **7** y **11**. En la tabla 13 se resume la identificación parcial de los principales compuestos de tipo flavonol aislados de los pétalos de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

Tabla 13. Principales flavonoles detectados en EPM, EPU y las fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular F3, F4 y F5 aisladas de los pétalos de *T.mollis* y *T.urvilleana*

$\lambda$ (nm)	No de Pico	Identificación parcial	<i>T.mollis</i>				<i>T.urvilleana</i>			
			EPM	F3	F4	F5	EPU	F3	F4	F5
360	1	Quercetina-3-O-hexosido	X				X			
	2	Miricetina-3-O-glucósido	X		X					
	3	Miricetina-3-O-glucorónido	X		X					
	4	Kaempferol-3-O-hexosido	X	X	X		X			
	5	Isorhamnetina-3-O-glucurónido	X				X			
	12	Quercetin-3-O-hexosido	X	X	X		X			
	6	Quercetin-3-O-glucósido	X	X	X		X	X	X	
	7	Quercetin-3-O-glucurónido	X		X		X		X	
	8	Kaempferol-3-O-glucósido	X				X			
	9	Kaempferol-3-O-glucorónido	X							
	10	Miricetina	X			X				
11	Quercetina	X			X	X		X	X	

X: indica la presencia de los compuestos en las muestras de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

Fuente: Esta investigación

Como se observa en la tabla anterior, la mayoría de los flavonoles identificados son derivados de los flavonoides como la Quercetina, Miricetina y Kaempferol, sustituidos en general por una hexosa. Los resultados muestran que algunos de los compuestos identificados en el EPM también se encuentran en el EPU (**Quercetina-3-O-hexósido**, **Kaempferol-3-O-hexósido**, **Isorhamnetina-3-O-glucurónido**,







**Quercetin-3-O-glucósido, Quercetin-3-O-glucurónido, Kaempferol-3-O-glucósido y Quercetina;** compuestos **1, 4-8, 11 y 12**). Se destaca que solo en *Tibouchina mollis* se identificó **Miricetina-3-O-glucósido, Miricetina-3-O-glucurónido y Miricetina**. De acuerdo con lo publicado en literatura se reporta que flavonoles como la Quercetina y Kaempferol presentan efectos antivirales, antibacteriales y antiinflamatorios; además se ha encontrado que ejerce efectos antiproliferativos en varios tipos de cáncer, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, estudios a nivel *in vitro* han demostraron efectos antiproliferativos en la leucemia, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de ovario y cáncer de hígado<sup>174</sup>.

La similitud de los compuestos presentes (antocianinas y flavonoles) entre las dos especies es evidente, cada una posee los mismos compuestos y estos se repiten en los extractos purificados como en las fracciones. Así, es notable que los compuestos antociánicos se encontraron en las fracciones de menor e intermedio peso molecular, lo que no ocurrió en la identificación de los flavonoles, donde estos se evidenciaban en las fracciones de mayor peso molecular. La similitud entre las especies es evidente, cada una posee los mismos compuestos y estos se repiten en los extractos purificados como en las fracciones. Como se mencionó anteriormente, la investigación de este tipo de compuestos en flores del género *Tibouchina* es escaso, sin embargo se presenta a continuación una lista (Tabla 14) de los flavonoles y antocianinas identificados previamente a este estudio.

---

<sup>174</sup> CRUZ G. José A. Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (*In vitro* por difusión de glucosa) en extractos de *colubrina elliptica*. Tesis Para Obtener El Título De: Ingeniero En Alimentos. Huajuapán de León, Oaxaca, México. Universidad Tecnológica De La Mixteca. 2012. p.13

Tabla 14. Flavonoles y antocianinas reportados en especies *Tibouchina*

Especie	Compuesto	Referencia
<b><i>Tibouchina lepidota</i></b> (Bonpl.) Baill.	 Quercetina Quercetina-3-O-glucosido	[175]
<b><i>Tibouchina pulchra</i></b> (Cham.) Cogn.	 Quercetina, Miricetina, Kaempferol Miricetina-3-O-glucoside Quercetina-3-O-glucuronide Quercetina-3-O-hexoside Malvidina, Petunidina	[176,177,178]
<b><i>Tibouchina granulosa</i></b> (Desr.) Cogn.	 Isorhamnetina-3-O-glucurónido	[179,180]
<b><i>Tibouchina pereirae</i></b> Brade & Markgr.	 Kaempferol 3-O-glucoside	[181]

Fuente: Adaptado de REZENDE *et al* (2019).

<sup>175</sup> HENDRA, Rudi and KELLER, Paul. *Flowers in Australia: Phytochemical Studies on the Illawarra Flame Tree and Alstonville*. In: Australian Journal of Chemistry. (2016). vol. 69. p. 925–927.

<sup>176</sup> FURLAN, Claudia.; SALATINO, Antonio and DOMINGOS, Marisa. *Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on Tibouchina pulchra leaves in Cubatão (Brazil)*. In: Biochemical Systematics and Ecology, March (2004). vol. 32. p. 253–263.

<sup>177</sup> MOTTA, Lucimar.; KRAUS, Jane.; SALATINO, Antonio and SALATINO, María. *Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of Tibouchina pulchra*. In: Biochemical Systematics and Ecology. October (2005). vol. 33. p. 971–981.

<sup>178</sup> REZENDE Fernanda, FERREIRA Marcelo, CLAUSEN Mads Hartvig, ROSSI Magdalena and FURLAN Claudia Maria. *Acyated Flavonoid Glycosides are the Main Pigments that Determine the Flower Colour of the Brazilian Native Tree Tibouchina pulchra (Cham.) Cogn.* In: Moléculas. February (2019). vol. 24(4). p. 718.

<sup>179</sup> OKUMURA, F.; SOARES, M.; BARBOSA, H.F and CABALLERO, E.T.G. *Identificación de pigmentos naturales de especies vegetales utilizando cromatografía en papel*. Quim. Nuevo. 2002, 25, p. 680-683.

<sup>180</sup> SOBRINHO, Andrea et al. Op.cit. (2017).

<sup>181</sup> DÍAS, E.R. *Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad biológica de Tibouchina pereirae Aubl. (Melastomataceae)*. Tesis de maestría, Satate University de Feira de Santana, Bahía, Brasil, 30 de octubre de 2013.

#### 4.6. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO FENOLICO TOTAL (CFT)

El uso de técnicas para determinar el contenido fenólico de matrices de origen natural es ampliamente utilizado dado el interés de determinar su correlación con la actividad antioxidante<sup>182</sup>. Para cuantificar los fenoles presentes tanto en los extractos crudos, purificados y fracciones de las dos especies se implementó el método de Folin-Ciocalteu (descrito en el apartado 3.5) que utiliza como patrón de referencia el ácido gálico (AG). En la tabla 15 se presentan los datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado. Mediante el método de los mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de correlación:  $A = 0,0752013 + 0,00325055*[C]$  ( $r=0,9909$ ), donde A es la absorbancia medida a 765 nm y C la concentración de ácido gálico en mg/L. Todos los análisis se realizaron por triplicado, la representación gráfica de la recta de calibrado se muestra en la figura 43.

Tabla 15. *Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación del CFT*

<b>Concentración de ácido gálico (mg/ L)</b>	<b>Absorbancia* ± DE<sup>a</sup></b>
<b>10</b>	0,107 ± 0,046
<b>30</b>	0,157 ± 0,047
<b>60</b>	0,268 ± 0,068
<b>100</b>	0,427 ± 0,136
<b>150</b>	0,583 ± 0,029
<b>180</b>	0,632 ± 0,028

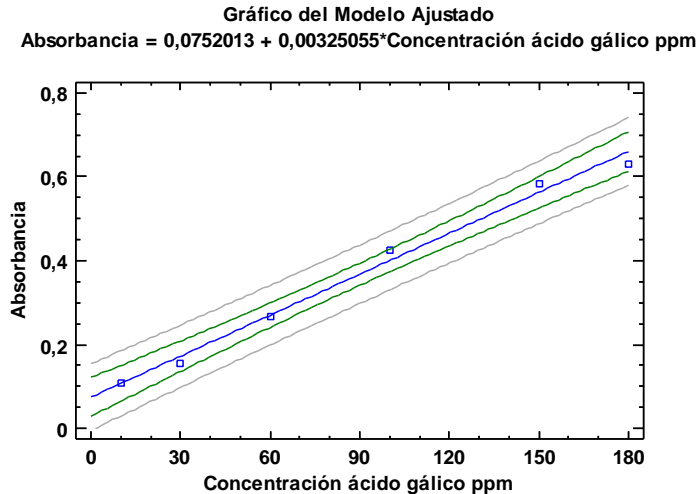
\*Promedio de 3 mediciones

<sup>a</sup>Desviación estándar de tres réplicas (n = 3).

Fuente: Esta investigación

<sup>182</sup> DINI, A., *et al. Minor components in food plants-Note I. Flavonol glycosides from Ullucus tuberosus*. In: Bollettino.della Società italiana di biologia sperimentale, 1991. vol. 67, no. 12, p. 1053-1058.

Figura 43. Recta de calibrado para determinar el CFT



Fuente: Esta investigación

En el rango de concentraciones evaluado (10-180 ppm) existe un alto grado de linealidad, esto lo podemos corroborar con los valores cercanos a 1 del coeficiente de correlación ( $r$ ) y determinación ( $r^2$ ) los cuales se indican en la tabla 16. La magnitud del  $r$  indica que existe una correlación directa y relativamente fuerte entre las variables; lo cual se considera estadísticamente significativo a un nivel de confianza del 95,0% ( $p < 0,05$ ). Los parámetros estadísticos, registrados permiten inferir que el modelo lineal establecido para la curva de calibración es confiable y puede ser utilizado para estimar la concentración fenólica de las muestras de ensayo por interpolación. En la tabla 17 se muestran el contenido fenólico total de todas las muestras evaluadas.

Tabla 16. *Parámetros estadísticos del modelo de regresión lineal del método Folin-Ciocalteu*

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Intercepto (a)</b>	0,0752013 ± 0,0166724 <sup>a</sup>
<b>Pendiente (b)</b>	0,00325055 ± 1,55E-4 <sup>b</sup>
<b>Coeficiente de correlación (r)</b>	0,9955
<b>Coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0,9909

<sup>a,b</sup> Desviación estándar

Fuente: Esta investigación

Tabla 17. Contenido de fenoles totales en los extractos y fracciones obtenidos de *T.mollis* y *T.urvilleana*

<b>Extractos y Fracciones de <i>T.mollis</i></b>	<b>Fenoles totales<sup>a</sup> mg AG*/ g muestra seca*</b>
<b>ECM</b>	22,40 ± 0,805
<b>EPM</b>	216,09 ± 1,91
<b>F1-M</b>	17,14 ± 0,46
<b>F2-M</b>	61,90 ± 1,17
<b>F3-M</b>	100,82 ± 4,52
<b>F4-M</b>	103,71 ± 2,82
<b>F5-M</b>	199,33 ± 8,93
<b>Extractos y Fracciones de <i>T.urvilleana</i></b>	<b>Fenoles totales<sup>a</sup> mg AG*/ g muestra seca</b>
<b>ECU</b>	22,39 ± 0,801
<b>EPU</b>	194,79 ± 1,16
<b>F1-U</b>	16,80 ± 0,45
<b>F2-U</b>	69,65 ± 3,072
<b>F3-U</b>	101,35 ± 1,71
<b>F4-U</b>	126,60 ± 7,20
<b>F5-U</b>	174,89 ± 12,13

\*AG = ácido gálico

<sup>a</sup>Datos con ± DE de tres réplicas.

Fuente: Esta investigación.

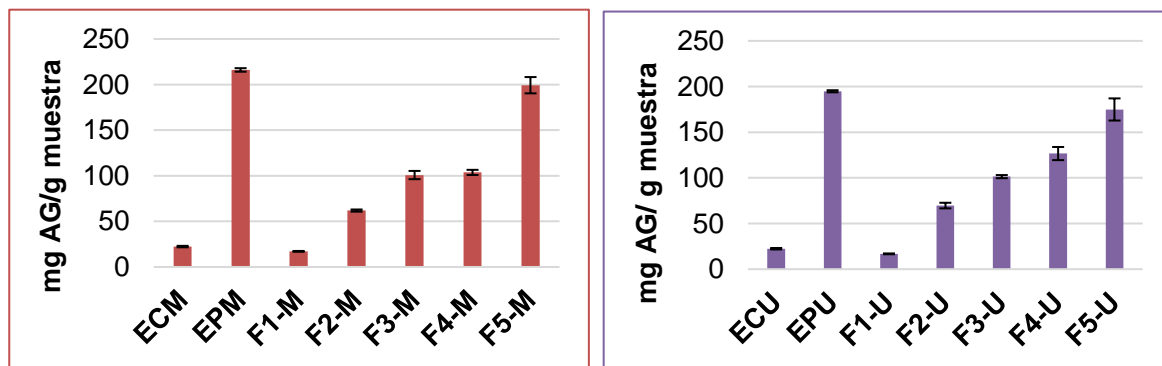
El análisis estadístico, con la prueba de múltiples rangos y la gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para el contenido fenólico de los extractos y fracciones de *T.mollis* (ver anexo G) indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la mayoría de las muestras, a excepción de ECM-F1-M y F3-M-F4-M, con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Por el contrario en las muestras de *T.urvilleana* no existen diferencias estadísticamente significativas entre el ECU-F1-U (ver anexo H).

Se puede observar que en ambos casos los extractos purificados (EPM y EPU) tienen mayor CFT que los respectivos extractos crudos (ECM y ECU), siendo el extracto purificado de *T. mollis* (EPM) quien tiene la mayor concentración de fenoles (CFT: 216,09 mg AG/g muestra seca). Estos resultados demuestran la eficiencia del proceso de purificación de este tipo de compuestos con amberlita XAD-7. De igual manera se destaca que entre las fracciones de *T. mollis* y *T. urvilleana*, las mas pesadas (F5-M y F5-U) son las que tienen el mayor CFT (199,33 mg AG/g muestra

seca y 174,89 mg AG/g muestra, seca respectivamente). Estos resultados están en correspondencia con el % de color polimérico encontrado en el EPM y los compuestos de mayor peso molecular retenidos en la fracción F5-M. Cabe destacar, que pesar de que el % de color polimérico de EPU fue 4 veces menor que el % de EPM, la cantidad de fenoles totales es similar en los dos extractos, lo anterior debido a que en el extracto purificado se encuentra gran variedad de compuestos fenólicos, tanto flavonoles como antocianinas, tanninos, proantocianidinas y compuestos de bajo y mayor peso molecular que pueden aportar a la cantidad de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos.

Se observa que el contenido de la primera fracción en eluir de la columna (F1-M) tiene el valor más bajo, las fracciones intermedias un poco más elevadas (F2-M, F3-M, F4-M) y la fracción más retenida F5-M el CFT más alto. Los resultados se representan mejor en el diagrama de barras de la figura 44, evidenciándose el siguiente orden decreciente para *T. mollis*: **EPM>F5-M>F4-M>F3-M>F2-M>ECM>F1-M (a)** y para *T. urvilleana*: **EPU>F5-U>F4-U>F3-U>F2-U>ECU>F1-U (b)**.

Figura 44. Diagrama de barras del contenido fenólico (mg AG/g muestra) de extractos y fracciones obtenidos a partir de *T.mollis* y *T.urvilleana*.



\*En (a) se muestran las muestras de *T. mollis*, en (b) las muestras de *T. urvilleana*

Fuente: Esta investigación

En las tablas 18 y 19 se muestra la prueba de múltiples rangos, en donde se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%) cuando se compara el contenido fenólico total entre los extractos purificados y las fracciones de mayor peso molecular (muestras con mayor CFT). Lo anterior se corrobora con la gráfica de medias para los valores de las diferentes muestras de *T. urvilleana*.

Tabla 18. Prueba de múltiple rangos para el CFT de extractos purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana*

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>EPU</b>	3	194,79	X
<b>EPM</b>	3	216,09	X

Fuente: Esta investigación

Tabla 19. Prueba de múltiple rangos para el CFT de las fracciones de mayor peso molecular de *T.mollis* y *T.urvilleana*

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>F5-U</b>	3	174,89	X
<b>F5-M</b>	3	199,33	X

Fuente: Esta investigación










Adicionalmente, al relacionar estos resultados con la composición fenólica de cada una de las fracciones de las dos especies (Anexo I), se evidencia que los compuestos antociánicos mayoritarios identificados en las primeras fracciones F1-M y F1-U, como la **petunidina-3-O-glucósido** y **malvidina-3-O-glucósido** no aportan significativamente al contenido fenólico total; mientras que si lo hacen los compuestos de tipo flavonol identificados en las fracciones más retenidas (F4-M, F4-U, F5-M y F5-U), como: la **quercetina** y sus derivados (**quercetina-3-O-glucósido**, **quercetina-3-O-glucorónido**), la **miricetina** y el flavonol **kaempferol-3-O-hexósido** (anexo J).

Por otra parte, con el propósito de facilitar la comparación de los resultados de esta investigación con datos publicados en la literatura, en la tabla 20 se observa que el contenido fenólico total presente en los extractos crudos de *T. mollis* y *T. urvilleana* es similar al reportado por Zhebg *et al*<sup>183</sup> en los extractos crudos de especies silvestres, *Bombax ceiba*, *Camellia japónica*, *Crocus sativus L.*, *Cymbidium sinense*, *Jasminum sambac* y *Plumeria rubra Acutifolia*. Estos extractos al igual que en esta investigación se obtuvieron por maceración química con acetona: agua: ácido acético en proporción 70:29.5:0.5. De igual forma se puede evidenciar que el

<sup>183</sup> Zheng, Jingyun., Yu, Xiaoming., Maninder, Meenu., and Xu, Baojun. *Total phenolics and antioxidants profiles of commonly consumed edible flowers in China*. In: International Journal of Food Properties. July (2018). vol. 21(1). p. 1524–1540.

contenido fenólico de los extractos ECM y ECU es mucho menor que el contenido del extracto crudo de la especie *Tibouchina kingii* y de otras especies colombianas reportadas por Jiménez<sup>184</sup> al igual que el contenido reportado por Goldson *et al*<sup>185</sup> en el extracto crudo de *T. granulosa*. Los extractos crudos de las especies colombianas se obtuvieron mediante maceración química usando como solvente agua.

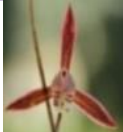


Tabla 20. Contenido fenólico reportado en algunas especies de flores silvestres

<b>Especie</b>		<b>Contenido fenólico total* (mg AG/ g extracto seco)</b>
<b><i>Ageratum conyzoides</i></b>		70 ± 6,1
<b><i>Phyllis paniculata</i></b>		132 ± 3,4
<b><i>Corymbia calophylla</i></b>		248 ± 3,3
<b><i>Clibadium surinamense</i></b>		297 ± 5,0
<b><i>Tibouchina kingii</i></b>		383 ± 0,7
<b><i>Tibouchina granulosa</i></b>		96,35 ± 2,88
<b><i>Bombax ceiba</i></b>		21,63 ± 0,81
<b><i>Camellia japónica</i></b>		21,95 ± 1,51
<b><i>Crocus sativus L.</i></b>		21,42 ± 1,4

<sup>184</sup> JIMÉNEZ, Nora *et al.* Op. cit. p. 272–79. (2015).

<sup>185</sup> GOLDSOON, Andrea *et al.* Op. cit. p. 1–7. (2016).



<b><i>Cymbidium sinense</i></b>		23,29 ± 1,52
<b><i>Jasminum sambac</i></b>		20,64 ± 0,71
<b><i>Plumeria rubra Acutifolia</i></b>		20,4 ± 1,19

\*Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (n = 3).

#### 4.7. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En esta investigación se utilizaron dos de los ensayos más comunes: ABTS y DPPH. En términos generales, la capacidad antioxidante de los extractos y fracciones de las dos especies de flores *T.mollis* y *T.urvilleana* fue evaluada en relación con su capacidad para reducir a los radicales ABTS•+ y DPPH•.

##### 4.7.1. Método TEAC (capacidad antioxidante equivalente al TROLOX)

El método TEAC se llevó a cabo de acuerdo al protocolo descrito en la sección 3.6.1. Este consiste, básicamente, en medir la decoloración del catión radical ABTS•+ ocasionada por la capacidad reductora de un antioxidante. El seguimiento espectrofotométrico de la decoloración se realiza teniendo en cuenta que el radical ABTS•+ presenta una absorbancia máxima, en la región visible, a una  $\lambda$  de 734 nm. Para medir la actividad antioxidante mediante el método TEAC de las diferentes muestras se construyó una recta de calibrado empleando TROLOX como patrón de referencia. En la tabla 21 se registran estos resultados. La ecuación de regresión hallada mediante el método de los mínimos cuadrados fue  $A = 0,858992 - 0,248794 * [C]$  ( $r = -0,9986$ ), donde A es la absorbancia medida a 734 nm y C es la concentración del TROLOX en mmol/L. Los parámetros estadísticos se resumen en la tabla 22. Todos los análisis se realizaron por triplicado y la representación gráfica de la recta se muestra en la figura 45.

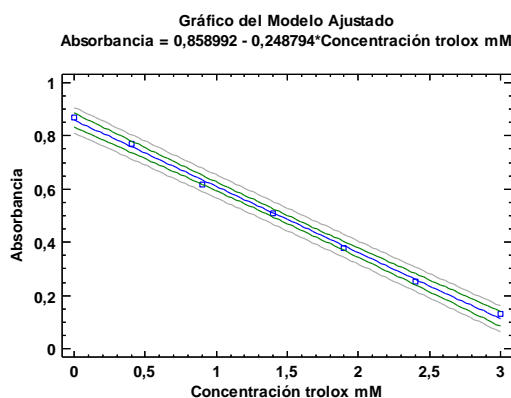
Tabla 21. Datos obtenidos para la construcción de la recta de calibrado para la determinación de la actividad antioxidante (TEAC)

<b>TROLOX mM</b>	<b>Absorbancia* ± DE<sup>a</sup></b>
<b>0</b>	0,869 ± 0,010
<b>0,4</b>	0,772 ± 0,009
<b>0,9</b>	0,615 ± 0,012
<b>1,4</b>	0,507 ± 0,015
<b>1,9</b>	0,379 ± 0,028
<b>2,4</b>	0,251 ± 0,054
<b>3</b>	0,132 ± 0,027

<sup>a</sup> Desviación estándar de tres mediciones (n = 3).

Fuente: Esta investigación

Figura 45. Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC)



Fuente: Esta investigación

Tabla 22. Estadísticas de la regresión lineal del método TEAC

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
<b>Intercepto (a)</b>	0,858992 ± 0,0102935 <sup>a</sup>
<b>Pendiente (b)</b>	-0,248794 ± 5,90E-3 <sup>b</sup>
<b>Coefficiente de correlación (r)</b>	-0,9986
<b>Coefficiente de determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0,9972

<sup>a,b</sup> Desviación estándar

Fuente: Esta investigación

El coeficiente *r* cercano a 1 y con signo negativo indica que existe una correlación relativamente fuerte e inversa entre las variables, es decir que a medida que la

concentración de antioxidante (TROLOX) aumenta, la absorbancia del catión radical  $ABTS^{\bullet+}$  decrece, el  $r^2$  indica que el poder explicativo o bondad de ajuste del modelo lineal es bueno, la pendiente ( $b=-0,248794$ ) muestra una buena sensibilidad del método y su desviación estándar la precisión adecuada de la curva de calibración. De esta manera se puede decir que el modelo es aplicable dentro del rango de concentraciones evaluado (0-3 mM) y por tanto, se puede utilizar para hacer estimaciones, de una manera análoga a lo explicado en la determinación de fenoles. Con el propósito de verificar la funcionalidad del método se determinó la eficiencia antiradical de un antioxidante de referencia (ácido ascórbico), este presentó un valor TEAC de  $1,001 \pm 0,207$ , cercano al reportado por Re<sup>186</sup> ( $1,05 \pm 0,02$ ) con un porcentaje de error de 4,7%.

En la tabla 23 se presentan los valores TEAC (promedio de tres réplicas) para los extractos crudos, purificados y fracciones de las dos especies, los cuales se obtuvieron utilizando la ecuación de la recta de regresión y se expresaron en mmoles de TROLOX por cada gramo de extracto o fracción (*mmol TROLOX / g muestra*).

---

<sup>186</sup> RE, R, *et al.* *Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay.* In: Free Radical Biology and Medicine. 1999. vol. 26, no. 9. p. 1231-1237.

Tabla 23. Capacidad Antioxidante Equivalente al Trolox en los extractos y fracciones obtenidos de *T.mollis* y *T.urvilleana*

<b>Extractos y Fracciones de <i>T.mollis</i></b>	<b>TEAC<sup>a</sup> mmol TROLOX / g muestra seca</b>
<b>ECM</b>	1,70 ± 0,043
<b>EPM</b>	14,83 ± 0,263
<b>F1-M</b>	1,24 ± 0,050
<b>F2-M</b>	3,85 ± 0,202
<b>F3-M</b>	6,85 ± 0,328
<b>F4-M</b>	7,80 ± 0,278
<b>F5-M</b>	13,97 ± 0,402
<b>Extractos y Fracciones de <i>T.urvilleana</i></b>	<b>TEAC<sup>a</sup> mmol TROLOX/ g muestra seca</b>
<b>ECU</b>	1,43 ± 0,084
<b>EPU</b>	13,07 ± 0,023
<b>F1-U</b>	1,02 ± 0,050
<b>F2-U</b>	6,75 ± 0,513
<b>F3-U</b>	6,98 ± 0,023
<b>F4-U</b>	8,29 ± 0,122
<b>F5-U</b>	12,38 ± 0,567
<b>Ácido ascórbico (Reportado)</b>	1,05 ± 0,02

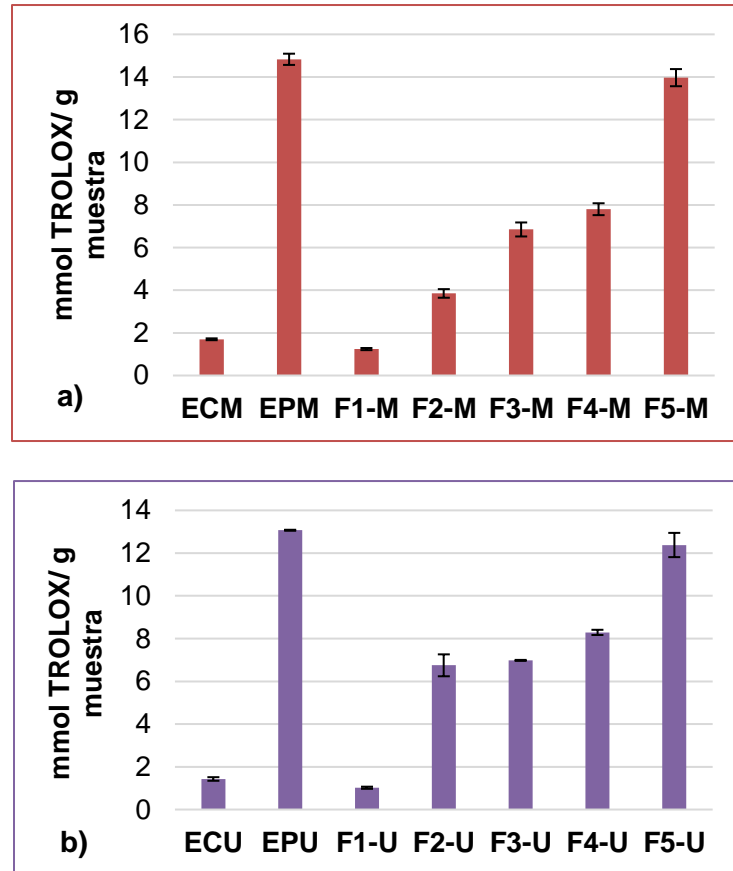
<sup>a</sup>Datos con ± DE de tres réplicas.

Fuente: Esta investigación.

El análisis estadístico mostró que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza al 95%, valor- P <0,05) entre todas las muestras de *T.mollis* (Anexo K), sin embargo, en el análisis estadístico realizado para las muestras de *T.urvilleana* (Anexo L), se observó que existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad antioxidante entre las fracciones F4-U-F5-U y el extracto purificado EPU. De esta forma se concluye que la actividad antioxidante tiene un comportamiento similar al hallado para el contenido fenólico total (CFT), es decir, los extractos purificados (EPM y EPU) y las fracciones más pesadas de ambos extractos (F5-M, F5-U) son las muestras más antioxidantes (Figura 46). En ambas especies de flores se evidenció también que existe una fuerte correlación entre el CFT y la actividad antirradical de los extractos de *T. mollis* ( $r^2=0,9982$ ) y *T. urvilleana* ( $r^2= 0,985$ ) (Figura 47 y Figura 48). Se destaca entonces que la capacidad para capturar el catión-radical ABTS•+ está acorde y sigue la misma

tendencia observada para el contenido fenólico total, para *T.mollis* **EPM>F5-M>F4-M>F3-M>F2-M>ECM>F1-M** y para *T.urvilleana* **EPU>F5-U>F4-U>F3-U>F2-U>ECU>F1-U**.

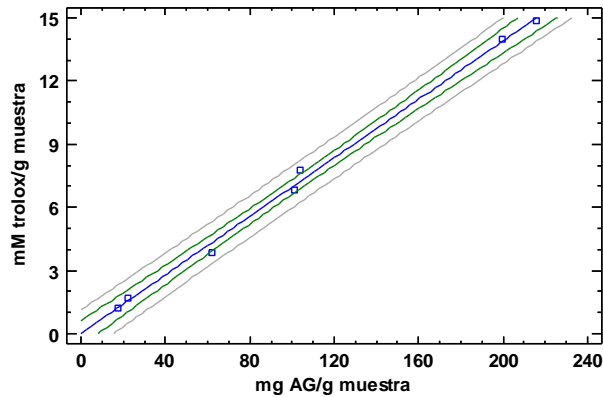
Figura 46. Diagrama de barras de valores de TEAC (mmol TROLOX / g muestra) de extractos y fracciones obtenidas a partir de *T.mollis* y *T.urvilleana*



\*En (a) se muestran las muestras de *T.mollis*, en (b) las muestras de *T.urvilleana*

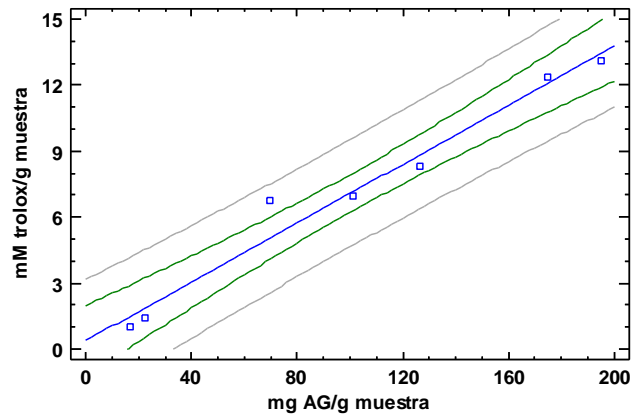
Fuente: Esta investigación

Figura 47. Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las muestras de *T.mollis*



Fuente: Esta investigación

Figura 48. Gráfica de correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante de las muestras de *T.urvilleana*



Fuente: Esta investigación

En las tablas 24 y 25 se muestra la prueba de múltiples rangos, en donde se pudo establecer que existen diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%, valor-P <0,05) cuando se compara la actividad antioxidante de los extractos purificados de las dos especies y la fracción de mayor peso molecular. Lo anterior se corrobora con la gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher (Anexo M).

Tabla 24. Prueba de múltiple rangos para la capacidad antioxidante (TEAC) de extractos purificados aislados de *T.mollis* y *T.urvilleana*

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>EPU</b>	3	13,07	X
<b>EPM</b>	3	14,83	X

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
<b>EPU - EPM</b>	*	-1,76	0,423194

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación

Tabla 25. Prueba de múltiple rangos para la capacidad antioxidante (TEAC) de las fracciones de mayor peso molecular aisladas de *T.mollis* y *T.urvilleana*

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>F5-U</b>	3	12,38	X
<b>F5-M</b>	3	13,97	X

<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>
<b>F5-U - F5-M</b>	*	-1,59	1,11415

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación

Realizando una comparación de la actividad antioxidante con la composición de las fracciones de las muestras de *T.mollis* y *T.urvilleana* se observa que las primeras fracciones en eluir (F1-M y F1-U), no contribuyen significativamente a la actividad antioxidante frente al radical ABTS•+, en estos extractos se encontró mayoritariamente **malvidina-3-O-glucósido** y derivados de la petunidina (**petunidina-3-O-glucósido** y **petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido**), mientras que si lo hacen los compuestos mayoritarios de tipo flavonol identificados parcialmente en las fracciones de mayor peso molecular (F4-M, F4-U, F5-M y F5-U) como: la **quercetina** y sus derivados (**quercetina-3-O-glucósido**, **quercetina-**

**3-O-glucoronido**), la miricetina y el flavonol **kaempferol-3-O-hexósido**, es decir estos últimos compuestos aportan más a la capacidad antiradical en la muestra.

#### 4.7.2. Método DPPH

La metodología utilizada para calcular la actividad antioxidante usando el radical DPPH• se describe la sección 3.6.2. Este método se evaluó para los extractos crudos y purificados de las dos especies. Este radical presenta una absorbancia característica a 515 nm y en presencia de un compuesto antioxidante su color cambia de púrpura a amarillo y su absorbancia disminuye<sup>187</sup>. Los resultados generalmente se expresan en términos de EC<sub>50</sub>, definido como la concentración de antioxidante necesario para disminuir la concentración del radical DPPH• en un 50%. Este parámetro se calculó a partir de una curva estándar (dosis-respuesta) que relaciona el % de inhibición de DPPH Vs la concentración de antioxidante (Anexo N). Las ecuaciones de correlación encontradas para los extractos crudos y purificados de las dos especies se muestran en la tabla 26. Inicialmente se estudió el método usando como control positivo ácido ascórbico (Anexo O), antioxidante catalogado con una buena eficiencia anti-radical.

Tabla 26. Ecuaciones de correlación y parámetro EC<sub>50</sub> calculado para los extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana* mediante el método DPPH

Muestra	Ecuación de correlación	r <sup>2</sup>	EC <sub>50</sub> * ± DE μg/mL
<b>ECU</b>	y = 2,0842x + 19,509	0,9957	14,62 ± 0,173
<b>EPU</b>	y = 8,9155x + 6,0315	0,9965	4,93 ± 0,02
<b>ECM</b>	y = 4,6887x + 8,5564	0,9986	8,82 ± 0,148
<b>EPM</b>	y = 9,6648x + 6,0702	0,9974	4,54 ± 0,161
<b>Control positivo Ácido ascórbico</b>	y = 1954,5x - 5,1782	0,9962	4,88 ± 0,00577
<b>Ácido ascórbico</b>			2,45 <sup>188</sup>

\* Datos con ± DE de tres réplicas.

Fuente: Esta investigación

El análisis estadístico (Tabla 27) indicó que entre todas las muestras obtenidas existen diferencias estadísticamente significativas (**valor -P <0,05**), evidenciándose el mismo orden decreciente de la capacidad antioxidante encontrada para el método

<sup>187</sup> CAI, Yizhong. Z., SUN, Mei., and CORKE, Harold. Op. cit. p. 2288–2294. (2003).

<sup>188</sup> CAI, Yizhong. Z., SUN, Mei., and CORKE, Harold. Op. cit. p. 2288–2294. (2003).



TEAC (**EPM>EPU>ECM>ECU**). Entre menor sea el valor de EC<sub>50</sub>, mayor es su capacidad antioxidante frente al radical DPPH•, por tanto el extracto purificado de *T.mollis* (EPM) fue la muestra que presentó la mayor capacidad de reducir al 50% la concentración inicial de DPPH, de igual forma se puede observar en la tabla anterior, que los extractos purificados de ambas especies tienen una capacidad antiradical comparable con el antioxidante comercial (ácido ascórbico).

Tabla 27. Prueba de múltiple rangos para la actividad antioxidante de extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana* mediante el método DPPH

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
<b>EPM</b>	3	4,54	X
<b>EPU</b>	3	4,93	X
<b>ECM</b>	3	8,82	X
<b>ECU</b>	3	14,62	X

Fuente: Esta investigación

En el siguiente apartado se indica un consolidado de los resultados obtenidos para las metodologías CFT, TEAC y DPPH desarrolladas en las diferentes muestras de *T.mollis* y *T.urvilleana*, los datos se muestran en la tabla 28 y 29 respectivamente.

Tabla 28. Contenido de fenoles totales, TEAC y DPPH para extractos crudos, purificados y fracciones aisladas de *T.mollis*

<b>Muestras <i>T.mollis</i></b>	<b>CFT<sup>a</sup> (mg AG*/g muestra seca)</b>	<b>TEAC<sup>b</sup> (mmol TROLOX/g muestra seca)</b>	<b>DPPH EC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>ECM</b>	22,40 ± 0,805	1,70 ± 0,043	8,84
<b>EPM</b>	216,09 ± 1,91	14,83 ± 0,263	4,55
<b>F1-M</b>	17,14 ± 0,46	1,24 ± 0,050	-
<b>F2-M</b>	61,90 ± 1,17	3,85 ± 0,202	-
<b>F3-M</b>	100,82 ± 4,52	6,85 ± 0,328	-
<b>F4-M</b>	103,71 ± 2,82	7,80 ± 0,278	-
<b>F5-M</b>	199,33 ± 8,93	13,97 ± 0,402	-

<sup>a,b</sup> Promedio de 3 réplicas. \*Ácido gálico.

Fuente: Esta investigación

Tabla 29. Contenido de fenoles totales, TEAC y DPPH para extractos crudos, purificados y fracciones aisladas de *T.urvilleana*

<b>Muestras <i>T.urvilleana</i></b>	<b>CFT<sup>a</sup> (mg AG*/g muestra seca)</b>	<b>TEAC<sup>b</sup> (mmol TROLOX/g muestra seca)</b>	<b>DPPH EC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>ECU</b>	22,39 ± 0,801	1,43 ± 0,084	14,63
<b>EPU</b>	194,79 ± 1,16	13,07 ± 0,023	4,93
<b>F1-U</b>	16,80 ± 0,45	1,02 ± 0,050	-
<b>F2-U</b>	69,65 ± 3,072	6,75 ± 0,513	-
<b>F3-U</b>	101,35 ± 1,71	6,98 ± 0,023	-
<b>F4-U</b>	126,60 ± 7,20	8,29 ± 0,122	-
<b>F5-U</b>	174,89 ± 12,13	12,38 ± 0,567	-

<sup>a,b</sup> Promedio de 3 réplicas, \*Ácido gálico

Fuente: Esta investigación

Como se observó en el estudio de la composición de los diferentes extractos, el aporte al CFT y la actividad antioxidante (TEAC y DPPH) se debe principalmente a la presencia de compuestos de tipo polimérico, flavonoles y antocianinas. Se concluye que las fracciones mas pesadas aisladas de ambas especies de flores, son las que aportan al CFT y a la actividad antiradical. Los mayores valores se encontraron para el extracto purificado de *T. mollis*, EPM (TEAC 14,83 mmol de TROLOX/ g muestra., EC<sub>50</sub> 4,54 mg/ml). Estos resultados estan en correspondencia con el mayor color polimérico encontrado para *T. mollis*.

Comparando la actividad antioxidante de los extractos crudos de *T. mollis* y *T. urvilleana* (ECM y ECU) con datos publicados en la literatura científica para otras especies de flores, entre las que se encuentran algunas especies del género *Tibouchina*, se encuentra que estos extractos tienen menor capacidad antioxidante que la encontrada para de la especie *T.kingii* reportada por Jiménez *et al*<sup>189</sup>, sin embargo, es mayor al compararla con otras especies colombianas reportadas por este mismo autor. Con respecto a la capacidad antioxidante con el método DPPH, se puede observar que los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana* tienen un EC<sub>50</sub> menor a las especies *Calendula arvensis* y *Rosa chinensis* reportados por Abudunia *et al*<sup>190</sup> y Cai *et al*<sup>191</sup>, lo que indica la buena capacidad antioxidante de los extractos crudos. De otro lado, este parámetro resultó ser mucho mayor en los extractos de

<sup>189</sup> JIMÉNEZ, Nora *et al.* *Op.cit.* p. 272–79. (2015)

<sup>190</sup> ABUDUNIA A. M. *et al.* *Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of Calendula arvensis flowers.* In: *Journal of Mycologie Médicale* (2016). vol. 665. p. 1-8.

<sup>191</sup> CAI, Yi Zhong *et al.* *Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from Rosa chinensis Flowers* In: *Journal Agricultural and Food Chemistry.* (2005). vol. 53. p. 9940–9948.

estudio que en la especie *Dimocarpus longan* Lour reportado por Hsieh<sup>192</sup> (tabla 30) y algunas fuentes comunes como el tomate, brócoli y la cebolla primavera reportados también por el investigador Cai.

Tabla 30. Comparación de la capacidad antioxidante (ABTS y DPPH) de los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana* con otros extractos de especies de flores

<b>Especie</b>	<b>Actividad antioxidante</b>
	<b>TEAC<sup>a</sup> (mmol TROLOX/g muestra seca)</b>
<b><i>T.kingii</i></b>	3,59 ± 48,0
<b><i>Ageratum conyzoides</i></b>	0,62 ± 18,0
<b><i>Acmella brachyglossa</i> Cass.</b>	0,56 ± 35,0
<b><i>Iresine diffusa</i></b>	0,68 ± 68,0
<b><i>Polygala paniculata</i> L.</b>	0,58 ± 22,0
	<b>DPPH<sup>b</sup> EC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b><i>Calendula arvensis</i></b>	20,9
<b><i>Dimocarpus longan</i> Lour. (Flores)</b>	3,81
<b><i>Rosa chinensis</i></b>	21,3
<b>Tomate</b>	0,46
<b>Brócoli</b>	0,38
<b>Cebolla primavera</b>	0,26

<sup>a</sup>Todas las medidas se realizaron por triplicado, <sup>b</sup>Concentración requerida para una reducción del 50% de los radicales DPPH 60 µM.

Fuente: Adaptado de JIMENES *et al* (2015), CAI *et al* (2005), ABUDUNIA *et al* (2016) and HSIEH Meng Chieh *et al* (2008).

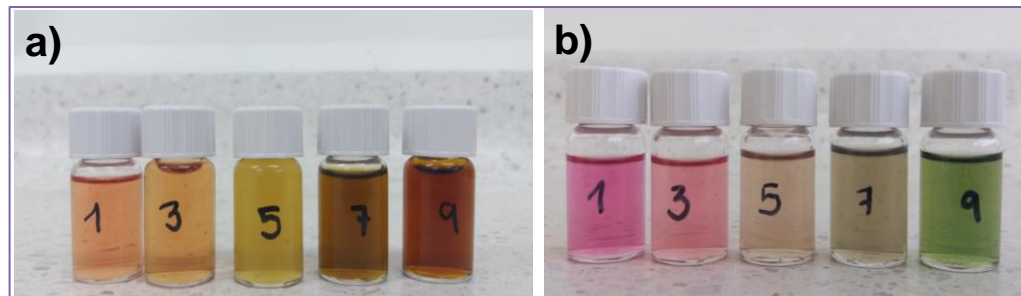
<sup>192</sup> HSIEH Meng Chieh *et al*. Antioxidative Activity and Active Components of Longan (*Dimocarpus longan* Lour.) Flower Extracts. *In*: Journal Agricultural and Food Chemistry. (2008). vol. 56. p. 7010–7016.

#### 4.8. DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL COLOR EN FUNCIÓN DEL pH POR MEDIO DE COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

##### 4.8.1. Estudio preliminar

Teniendo en cuenta que uno de los factores que afectan la estabilidad del color, en este trabajo se evaluaron mediante colorimetría triestímulo los cambios de color de los extractos crudos de *T.mollis* y *T. urvilleana* con respecto al pH (Figura 49).

Figura 49. Variación del color del extracto crudo ECM y ECU a diferentes valores de pH



\*En (a) ECM y en (b) ECU

Fuente: Esta investigación

En la figura anterior se muestra los cambios de color a diferentes valores de pH. Esto se debe al hecho de que la naturaleza iónica de las antocianinas permite cambios en la estructura molecular en función del pH, lo que resulta en diferentes colores y tonos.

Se llevó a cabo un seguimiento de la estabilidad de los extractos de *T.mollis* y *T.urvilleana* en diferentes condiciones, con el fin de reproducir las posibles situaciones que podrían encontrarse cuando esta materia prima se utilice como colorante natural. Se realizó inicialmente el estudio colorimétrico de los extractos crudos en tres condiciones de pH (pH 3, pH 5 y pH 8) y temperaturas (0°C, t. ambiente y 80 °C). Las temperaturas se seleccionaron con el fin de cubrir y reflejar las posibles y reales condiciones que puede sufrir un producto durante y luego de su procesamiento, como por ejemplo productos de la industria farmacéutica o cosmética. Teniendo en cuenta lo anterior se realizó un ensayo preliminar bajo las siguientes condiciones (Tabla 31).

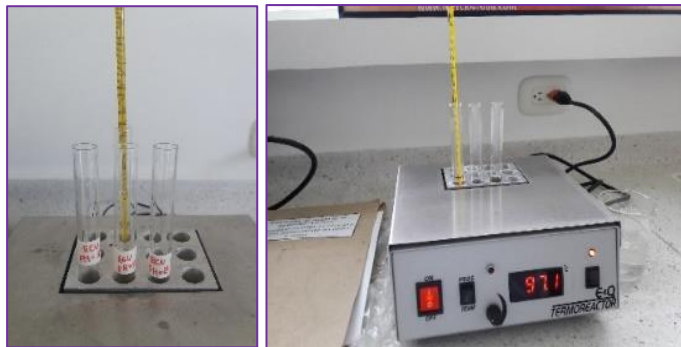
Tabla 31. Condiciones preliminares evaluadas en la estabilidad de ECM y ECU

pH	Temperatura °C
3	0
5	20-22
8	80

Fuente: Esta investigación

Durante 5 días se realizó el seguimiento del perfil UV-Vis de los extractos crudos sometidos a pH (3, 5 y 8) y a temperatura ambiente y de 0°C, observando el cambio en la absorbancia dentro del rango de 360 a 830 nm. Los extractos sometidos a 80°C y en los mismos valores de pH se analizaron durante 1 día, observando el cambio cada minuto. Para controlar la temperatura se usó un termostato (Figura 50).

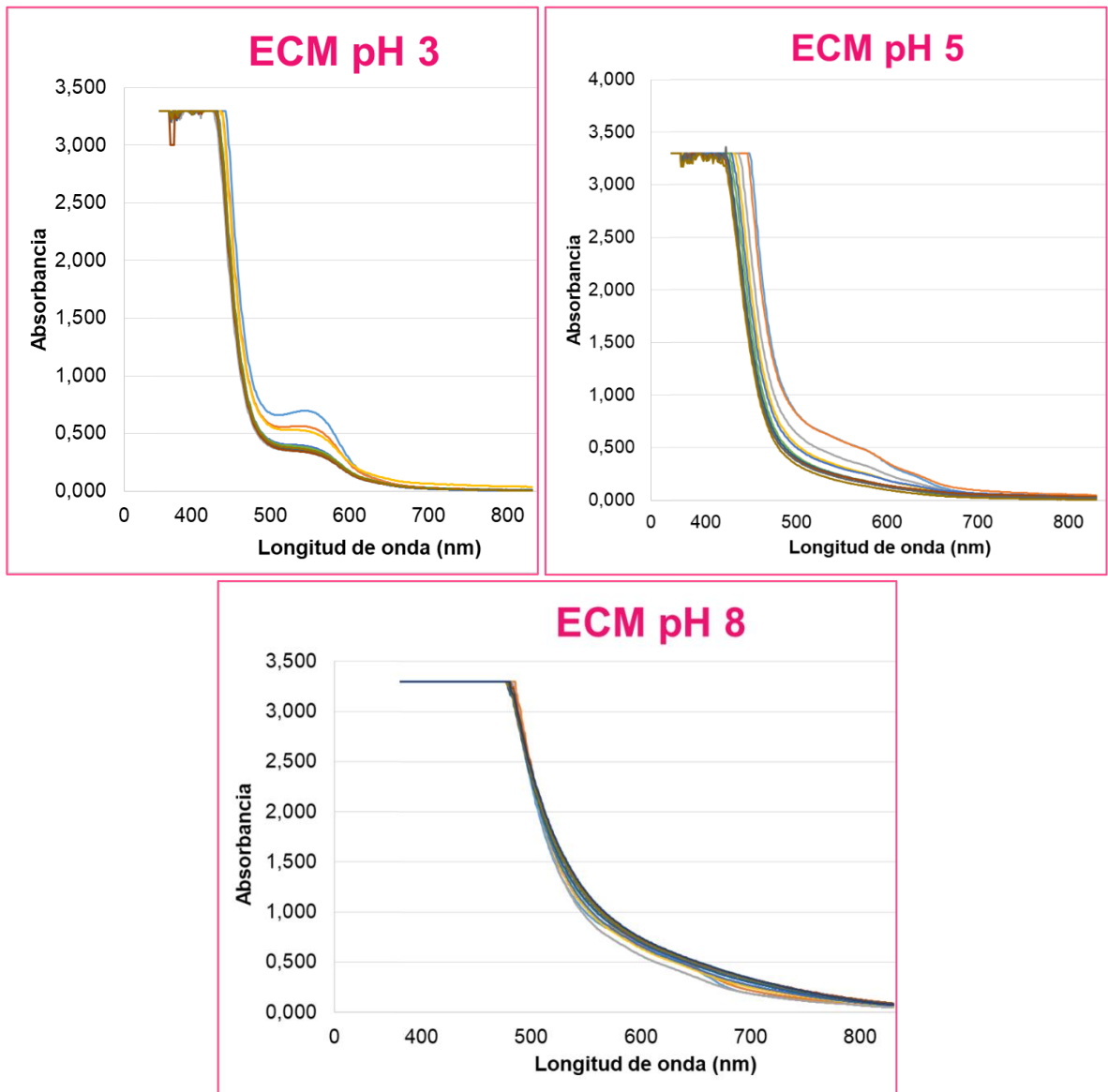
Figura 50. Análisis del ECU a 80°C



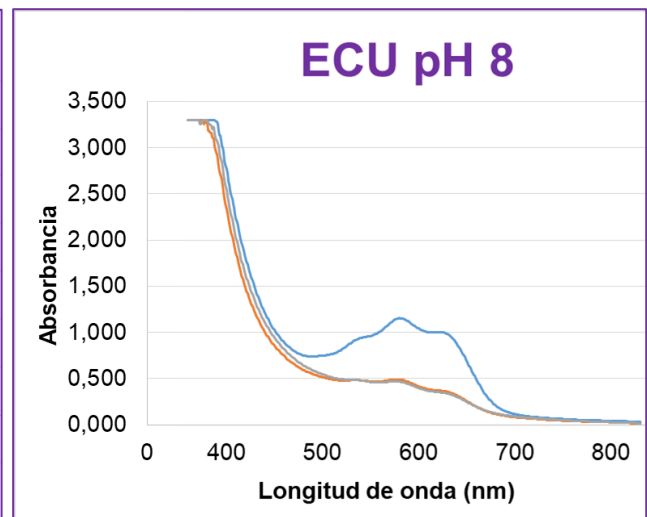
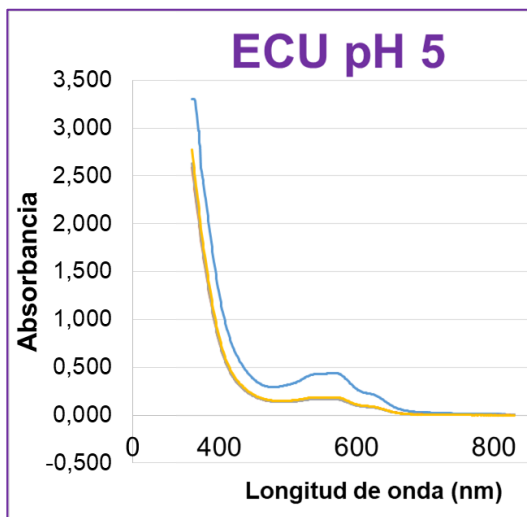
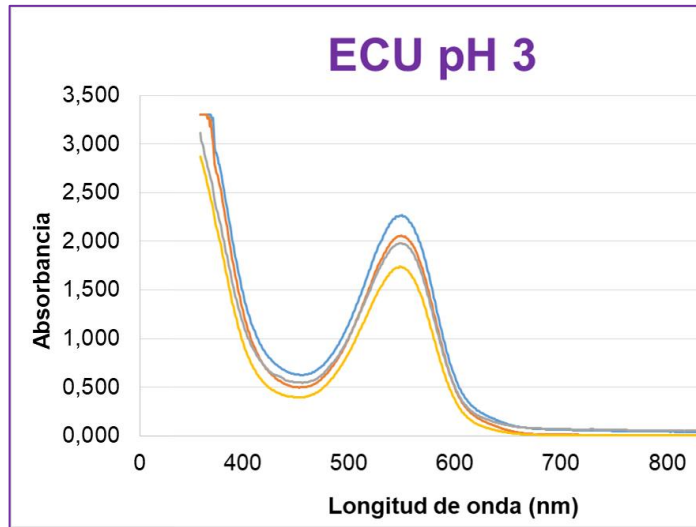
Fuente: Esta investigación

En la figura 51 a y b se observa el comportamiento de los extractos crudos almacenados a 0°C en diferentes condiciones de pH 3, 5, 8.

Figura 51. Comportamiento de extractos crudos ECM y ECU almacenado a 0°C en diferentes condiciones de pH 3, 5, 8



(a)



**(b)**

\* En (a) se muestra el comportamiento de ECM almacenado a 0°C y en (b) el comportamiento de ECU almacenado a 0°C en diferentes condiciones de pH 3, 5, 8.

Fuente: Esta investigación

Como se puede observar en las gráficas de la figura 51 el comportamiento de los dos extractos crudos es similar, en ambos casos se evidencia claramente el cambio visible en la absorbancia en los diferentes valores de pH. Como se mencionó anteriormente, las antocianinas en diferentes pHs experimentan una transformación en su estructura, principalmente cambios en su conjugación. Por otro lado, también se puede observar que a los pHs mas altos (pH 5 y 8), los cambios son mucho más

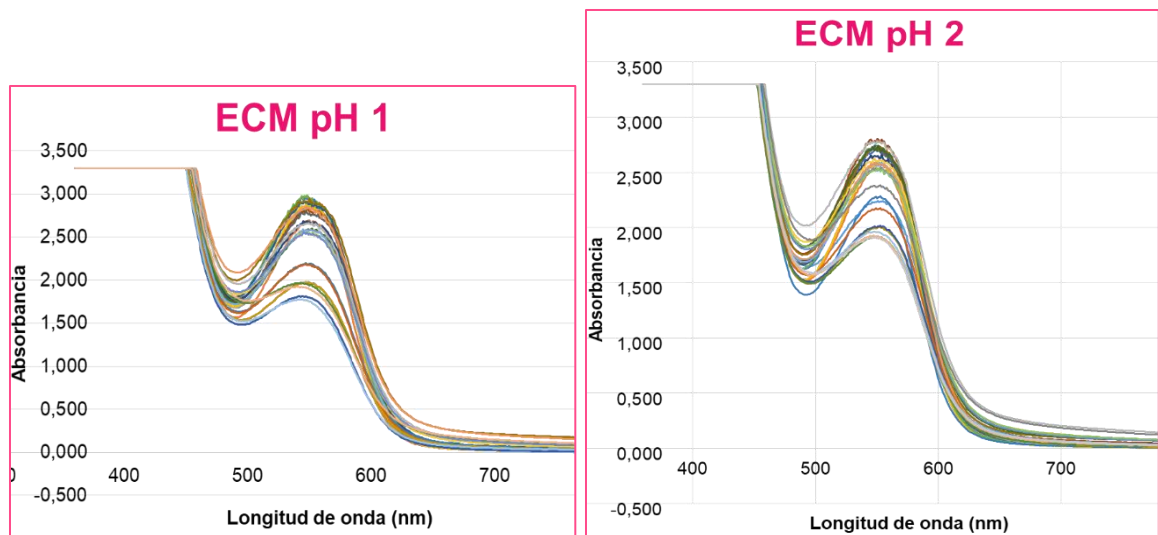
drásticos, es decir, la banda característica de este tipo de compuestos disminuye considerablemente incluso desde el primer día de estar expuestos a estas condiciones. Se evidenció además, que los cambios en absorbancia son mas drásticos cuando los extractos están expuestos a temperatura ambiente y 80°C. Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó que el rango de pH a evaluar sería el pH donde las antocianinas son más estables, es decir de 1 a 3 (Tabla 32) y de esta manera evidenciar cambios en la zona de mayor estabilidad. En las gráficas de la figura 52 se muestra el comportamiento de los extractos a 80°C bajo diferentes pHs (pH 1,2, 3). En el anexo P a temperatura ambiente y 0°C.

Tabla 32. Condiciones usadas para la colorimetría triestímulo

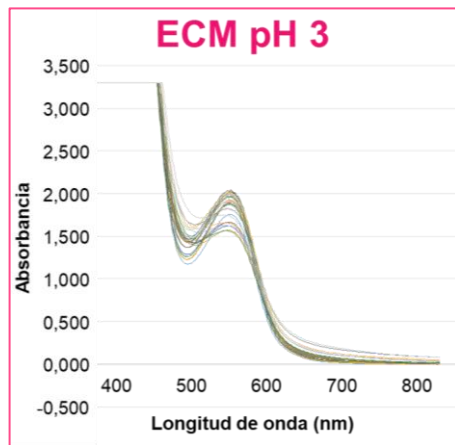
pH	Temperatura °C	Tiempo (T.mollis)	Tiempo (T.urvilleana)
1	0	57 días	30 días
2	20-22	57 días	30 días
3	80	30 min	30 min

Fuente: Esta investigación

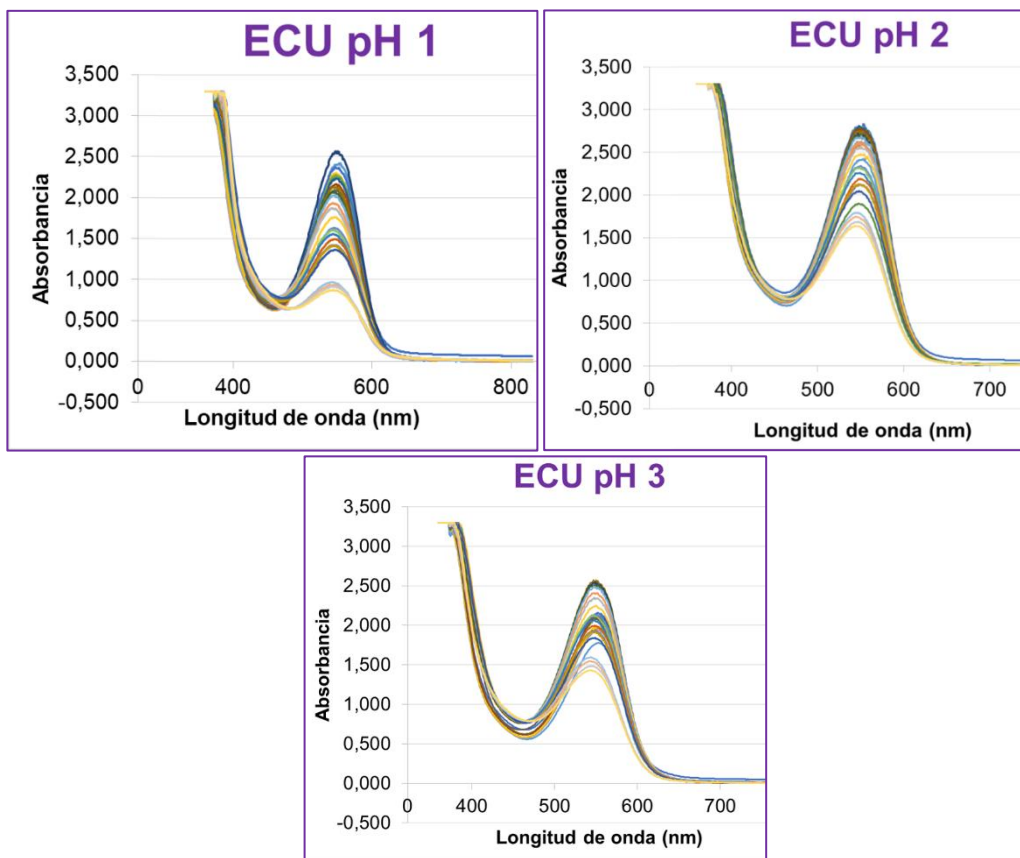
Figura 52. Comportamiento de extractos crudos ECM y ECU almacenados a 80°C en diferentes condiciones de pH 1, 2, 3







(a)



(b)

\* En (a) se muestra el comportamiento de ECM almacenado a 80°C y en (b) el comportamiento de ECU almacenado a 80°C en diferentes condiciones de pH 3, 5, 8.

Fuente: Esta investigación

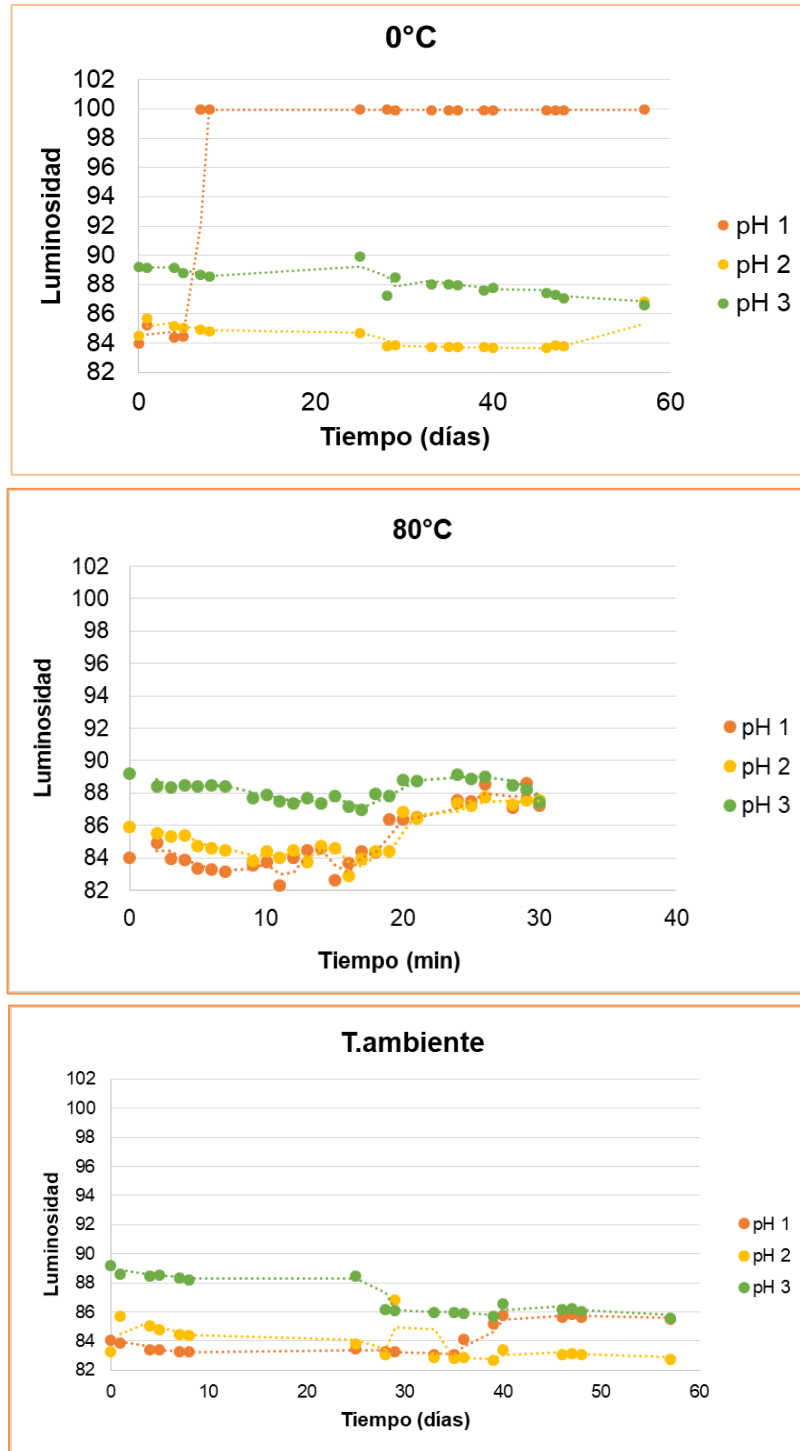
#### 4.8.2. Características colorimétricas

Se investigó el efecto de la temperatura y el pH a lo largo del tiempo sobre el color de los extractos crudos de *T.mollis* y *T.urvilleana* (ECM, ECU). Para estos extractos se evaluó, en diferentes tiempos de almacenamiento, los parámetros de color CIELAB ( $L^*$  (Luminosidad),  $C^*_{ab}$  (Croma) y  $h_{ab}$  (Tono o Matiz)) (Anexo Q).

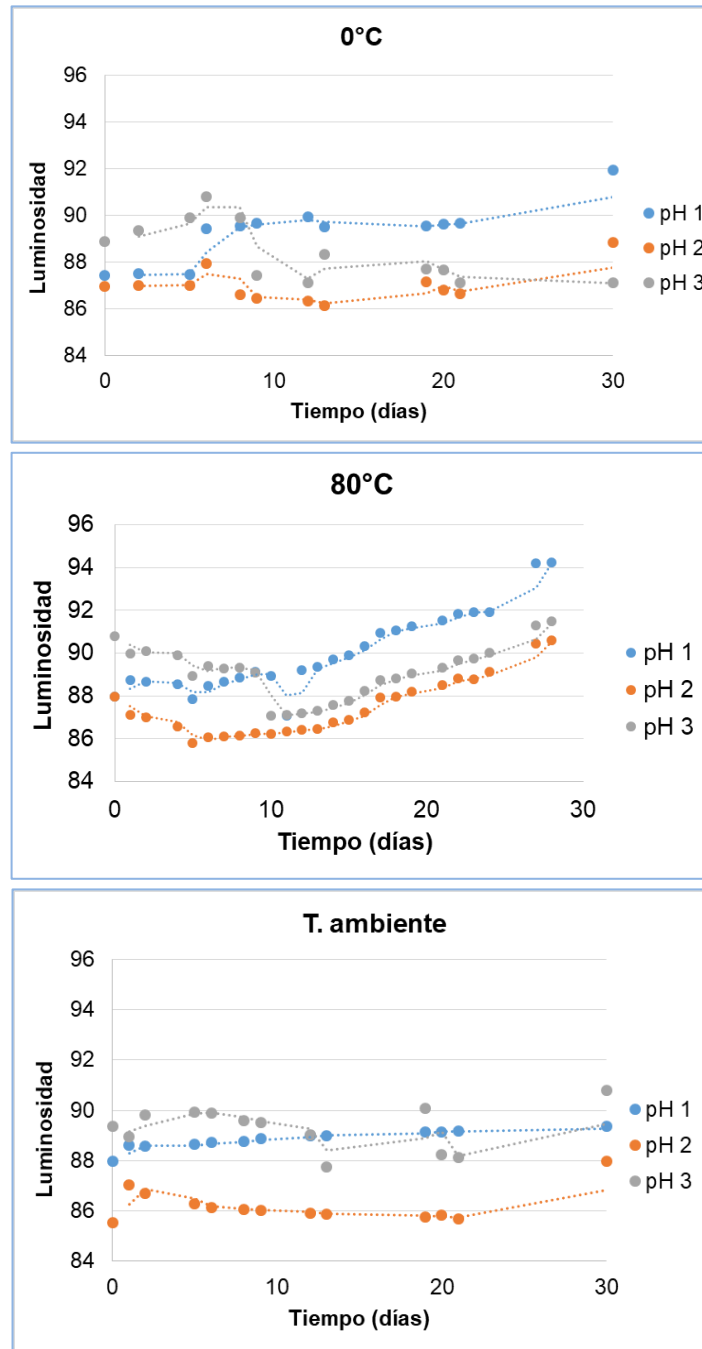
##### 4.8.2.1. Cambios en las coordenadas de color durante el tratamiento térmico a diferentes pH

El estudio de los parámetros colorimétricos se realizó preparando soluciones acuosas a una concentración de 3,1% para el ECM y 0,84% para el ECU, ajustando el pH con soluciones de HCl 1% y NaOH 5%. En la figura 53 a y b se observa como cambia la luminosidad ( $L^*$ ) de ECM y ECU cuando se almacena a 0°C y en diferentes condiciones de pH. La gráfica muestra que no hay cambios apreciables en la claridad del color de las soluciones acuosas cuando se almacenan bajo las diferentes condiciones. Para el caso de ECM, en el tiempo cero es evidente que las soluciones que se encuentran a pH 1 son las más oscuras y a medida que se incrementa el pH hasta 3 las soluciones se tornan más claras (mayor  $L^*$ ). Sin embargo, este comportamiento es algo diferente para las soluciones de ECU, ya que a pH 2 estas soluciones son más oscuras. Es notable también que a 0°C y T ambiente en los diferentes valores de pH todas las soluciones (ECM y ECU) mantienen relativamente estable la claridad durante aproximadamente 60 días de almacenamiento, excepto para la solución de ECM almacenada a 0°C y pH 1, que a los pocos días la solución es totalmente clara. Por el contrario, cuando las soluciones de ECM y ECU se someten a una temperatura de 80°C, se observan cambios más drásticos después de solo 15 minutos de calentamiento, tornándose las soluciones mucho más claras, principalmente al pH más bajo. Se evidencia también que después del tiempo de calentamiento (30 min) las soluciones acuosas del ECU a 80°C experimentan un mayor cambio en la claridad que las soluciones de ECM, esto puede estar relacionado con el mayor contenido de antocianinas poliméricas en este extracto, ya que se ha encontrado que este tipo de compuestos son más estables a los cambios de pH y temperatura.

Figura 53. Variación de la luminosidad en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3



(a)



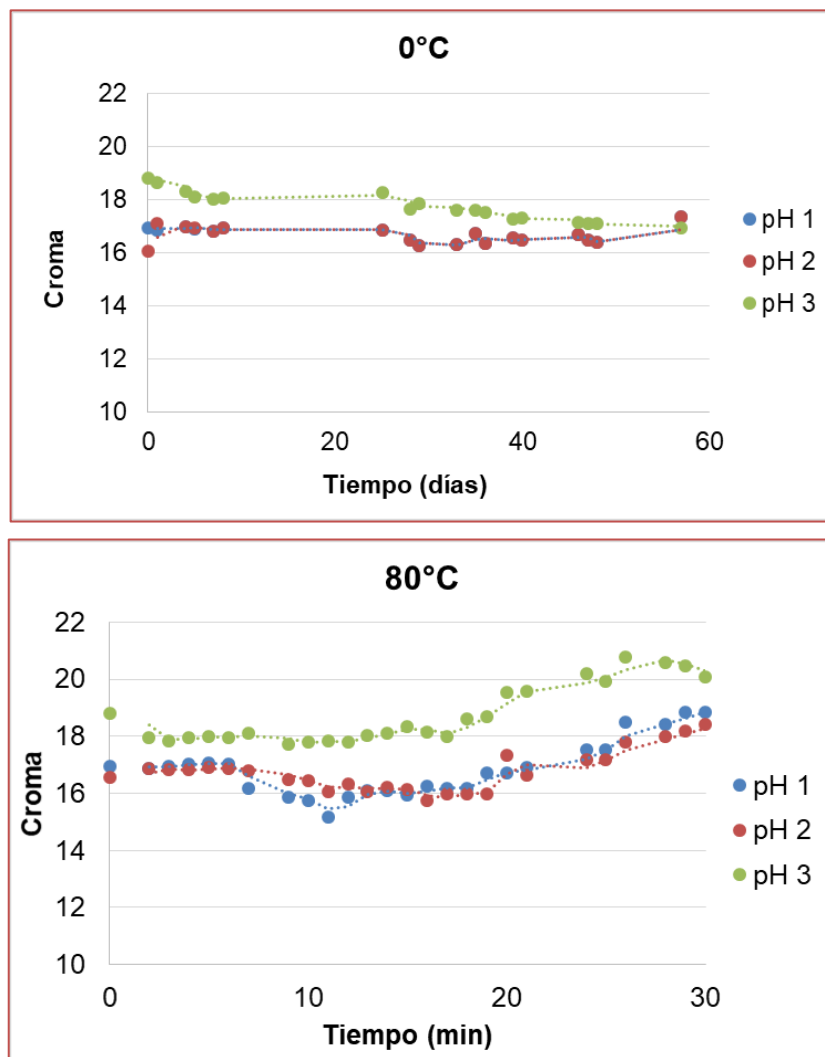
(b)

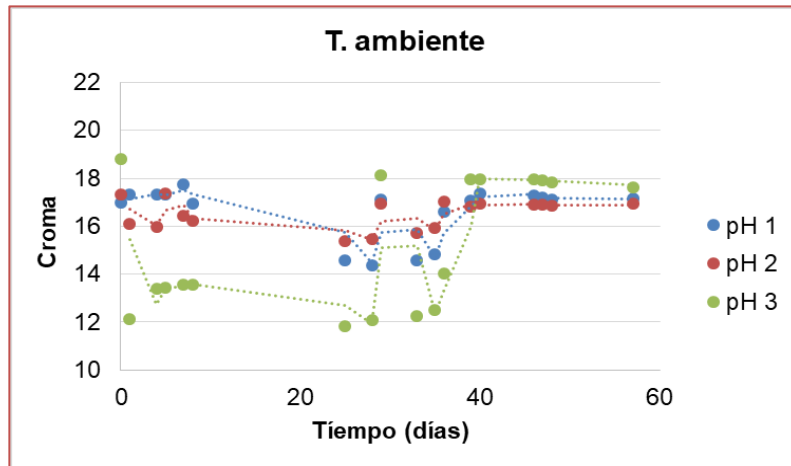
\*En (a) se muestra la variación de la luminosidad ( $L^*$ ) del extracto crudo de *T. mollis* (ECM) a 0°C, 80°C y T. ambiente. En (b) la luminosidad ( $L^*$ ) del extracto crudo de *T. urvilleana*.

Fuente: Esta investigación

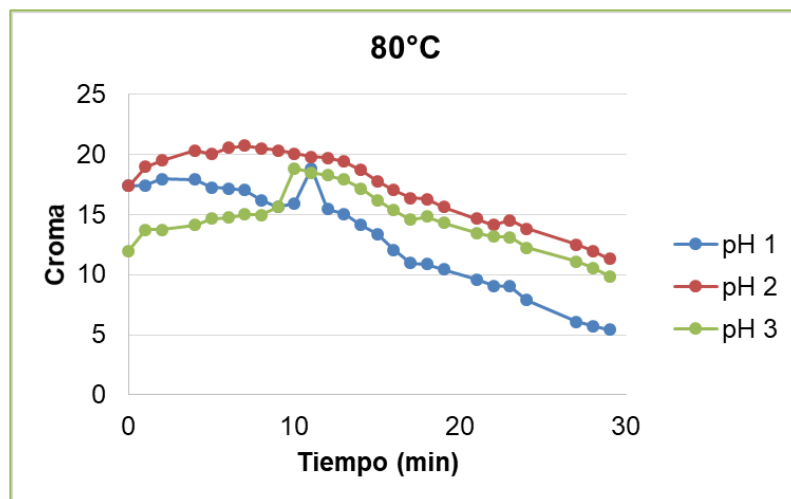
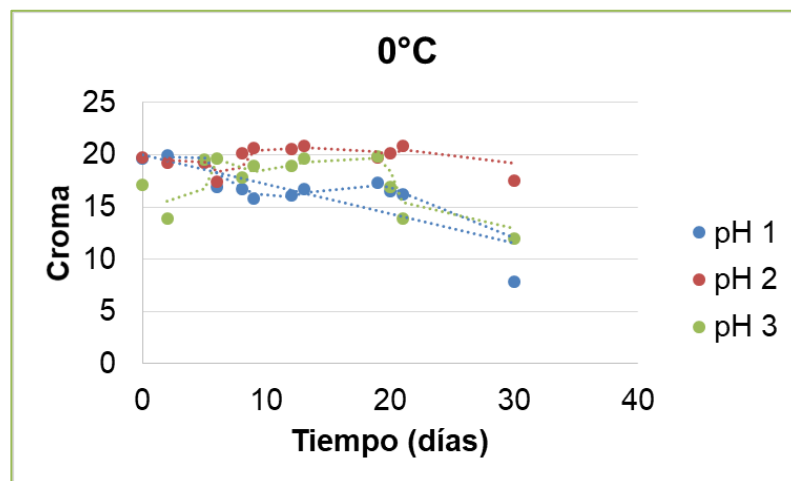
Cuando se estudia la variación del croma ( $C^*_{ab}$ ) (variable cuantitativa del color) en ECM y ECU (Figura 54 a y b). Para el caso de ECM se observa que en el tiempo cero es mayor el croma (saturación de color) cuando las soluciones se encuentran a pH 3 y para las soluciones ECU las soluciones a este pH son quienes presentan el menor croma. Se deduce también que a 0°C y en aproximadamente en 30 días de almacenamiento la muestra que mas cambios presenta en el croma es la solución a pH 3. Es notable también que a T ambiente y 80°C el croma en ECM, en los diferentes valores de pH, no experimentan cambios apreciables en el tiempo. Sin embargo, para ECU el croma a 80°C muestra un cambio significativo principalmente a pH 1.

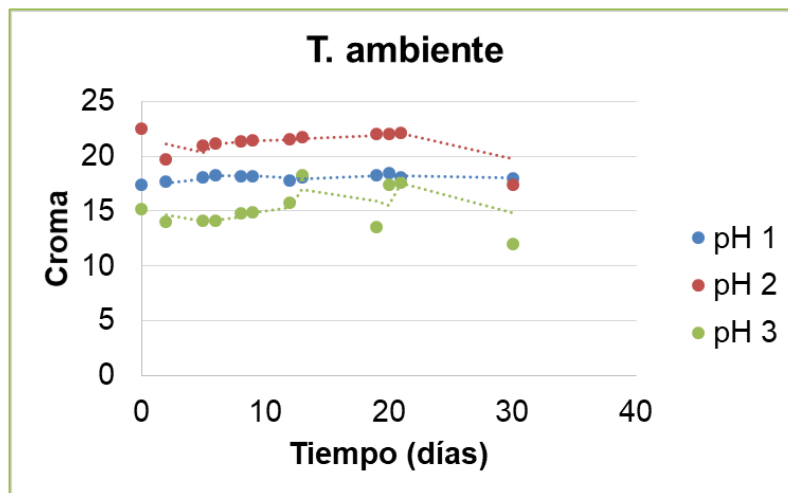
Figura 54. Variación del croma en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3





(a)





(b)

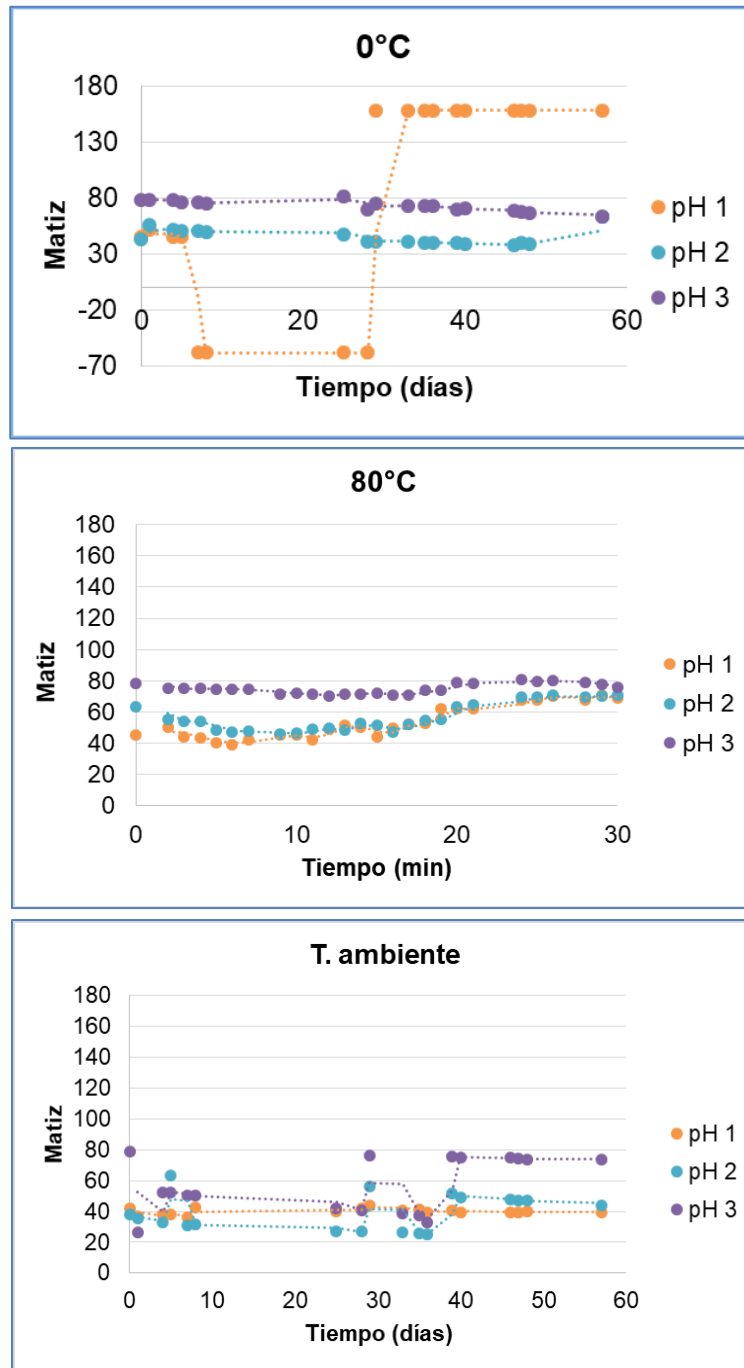
\*En (a) se muestra la variación del croma ( $C_{ab}^*$ ) del extracto crudo de *T. mollis* (ECM) a 0°C, 80°C y T. ambiente. En (b) el croma ( $C_{ab}^*$ ) del extracto crudo de *T. urvilleana*.

Fuente: Esta investigación

Con respecto a los valores del tono o matiz ( $h_{ab}$ ) (variable cualitativa del color) de las soluciones ECM y ECU, en la figura 55 a y b y tablas 33 y 34 se observa sus cambios después del periodo de almacenamiento. En el tiempo cero ( $t_0$ ) de almacenamiento para ECM se observa que a pH 1 y pH 2 el tono del color es muy parecido (aproximadamente 43) que corresponde a un color rojo- anaranjado, es evidente el cambio del tono cuando la solución se lleva a pH 3, tornándose de un color más amarillo ( $h_{ab}$ : 78,6). Después del almacenamiento por 57 días, el mayor cambio de tono lo experimento la solución almacenada a 0°C y pH 1, con un ángulo de tono ( $h_{ab}$ ) de 158,2, que corresponde a colores más verdes, es notable que en este mismo periodo de almacenamiento a 80°C y T ambiente los cambios en el tono fueron menores en los diferentes valores de pH.

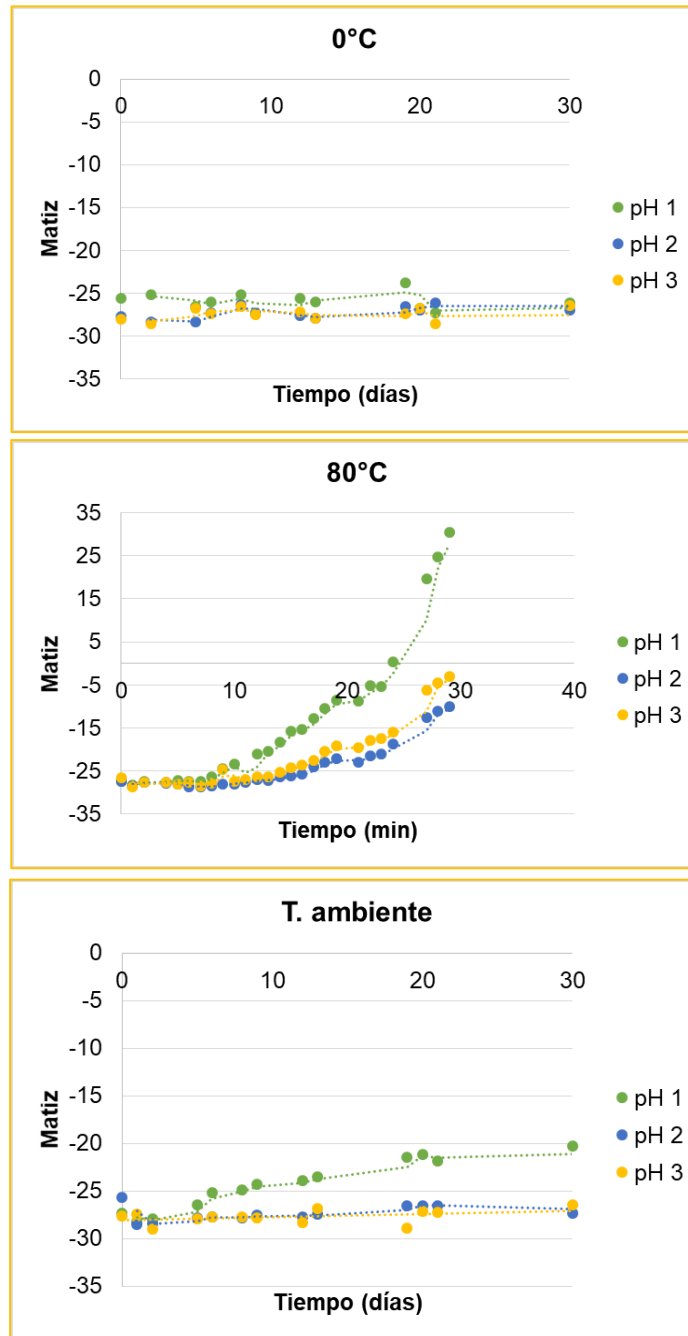
Para el caso de las soluciones acuosas de ECU, en el tiempo cero se observa que el tono de las soluciones prácticamente permanece constante en todos los valores de pH, con valores de tono de aproximadamente -28 que corresponde a un color más azul. Después del periodo de almacenamiento de 30 días se observó un tono constante a 0°C y T ambiente, excepto para la muestra a T ambiente y pH 1 donde el tono cambió a -20,3, (un color mas violeta). Para estas mismas muestras se observan mayores cambios cuando se someten a 80 0°C, observándose también un mayor cambio en el tono para la muestra a pH 1, pasando de -27,6 a 36,5 (Tabla 34).

Figura 55. Variación del matiz en los extractos ECM y ECU almacenados a 0°C, 80°C, temperatura ambiente y en diferentes condiciones de pH 1, 2,3



(a)





(b)

\*En (a) se muestra la variación del matiz ( $h_{ab}$ ) del extracto crudo de *T. mollis* (ECM) a 0°C, 80°C y T. ambiente. En (b) el tono ( $h_{ab}$ ) del extracto crudo de *T. urvilleana*.

Fuente: Esta investigación

Tabla 33. Valores inicial y final del tono o matiz del extracto crudo de *T.mollis* a 0°C, T. ambiente y 80°C

Tiempo (días)	0°C			TA			80°C			
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 1	pH 2	pH 3	Tiempo (min)	pH 1	pH 2	pH 3
0	45,2	43,5	78,6	42,1	38,3	78,6	0	45,2	63,4	78,6
57	158,2	63,3	63,3	39,2	43,7	73,9	30	69,2	70,7	76,2

Fuente: Esta investigación

Tabla 34. Valores inicial y final del tono o matiz del extracto crudo de *T.urvilleana* a 0°C, T. ambiente y 80°C

Tiempo (días)	0°C			TA			80°C			
	pH 1	pH 2	pH 3	pH 1	pH 2	pH 3	Tiempo (min)	pH 1	pH 2	pH 3
0	-25,6	-27,8	-28,0	-27,3	-25,7	-27,6	0	-27,3	-27,3	-26,5
30	-26,2	-27,0	-26,5	-20,3	-27,3	-26,5	30	36,5	-7,7	0,2

Fuente: Esta investigación

Se concluye que existen diferencias notables en la estabilidad del color de los extractos crudos aislados de *T.mollis* (ECM) y *T.urvilleana* (ECU). El color o tono de una solución acuosa de ECM a pH 1 y pH 2 es de color rojo-anaranjado ( $h_{ab}$ : ~44) y cambia de forma apreciable cuando se incrementa a pH 3, tornándose de color amarillo ( $h_{ab}$ : 78,6) y con un croma ( $C^*_{ab}$ : 18,8) superior con respecto a las soluciones a pH 1 y pH 2. Se destaca además que esta solución es más oscura a pH 1.

De otro lado, la solución acuosa del extracto crudo de *T. Urvilleana* (ECU) presentó un color más azul ( $h_{ab}$ : -28) que no presentó cambios apreciables en los diferentes valores de pH (pH 1, 2 y 3), sin embargo la saturación del color fue menor a pH 3 ( $C^*_{ab}$ : 12) y más oscura a pH 2 ( $L^*$ : 89).

El estudio de la estabilidad del color cuando las soluciones, en los diferentes pHs, se sometieron a diferentes condiciones de almacenamiento (0°C, T ambiente y 80°C), muestra diferencias apreciables en el color en los dos extractos (ECM, ECU). Cuando el ECM se almacena a 0°C y pH 1 y 3 no se observaron diferencias perceptibles en el color ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ) en los primeros 5 días, sin embargo esta misma muestra en las mismas condiciones de almacenamiento mostró en solo 10 días cambios en el color a pH 1, que son perceptibles por el ojo humano ( $\Delta E^*_{ab}$ : 23). Se estableció además que las soluciones son menos estables a T. ambiente y 80°C.

Cuando se encuentran a pH 2 y 3 y T ambiente se observaron diferencias de color apreciables en solo 5 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} > 2$ ), en el mismo periodo no se observaron diferencias de color a pH 1 ya que se observó un ( $\Delta E^*_{ab}: 1,4$ ). Cuando se someten a 80°C las soluciones del ECM almacenadas a pH 1 y 3 no mostraron cambios drásticos en el color a los 5 min de estar sometidos a 80°C ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ) (Tabla 35), estos cambios fueron evidentes después de los 15 minutos, la mayor estabilidad de estas soluciones a altas temperaturas puede estar relacionada con la mayor presencia de antocianinas de tipo polimérico en este extracto.

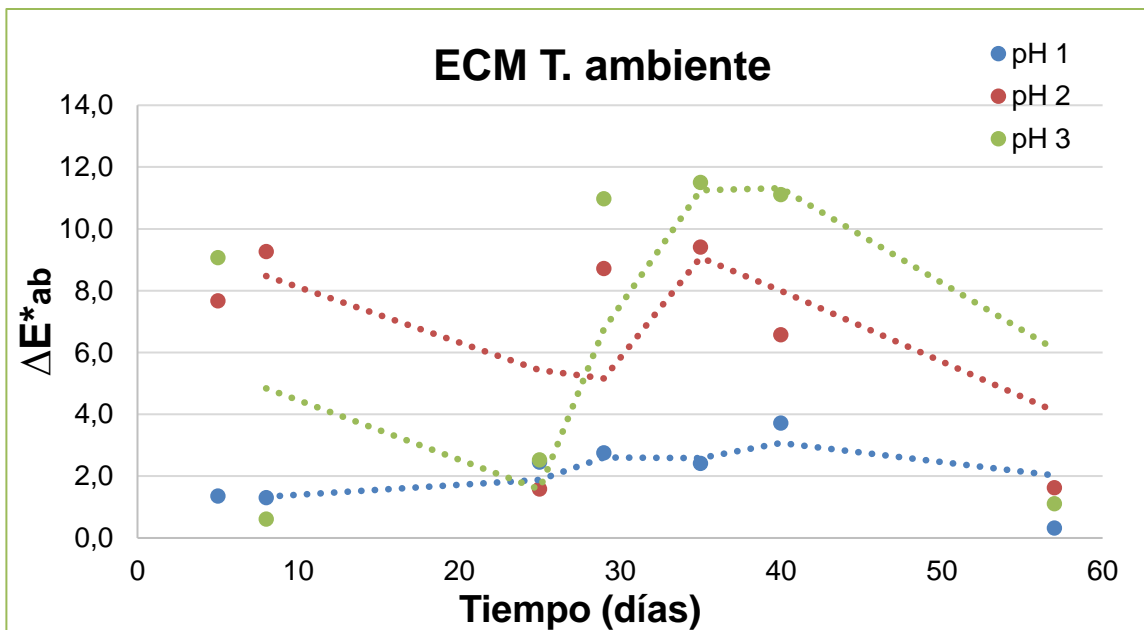
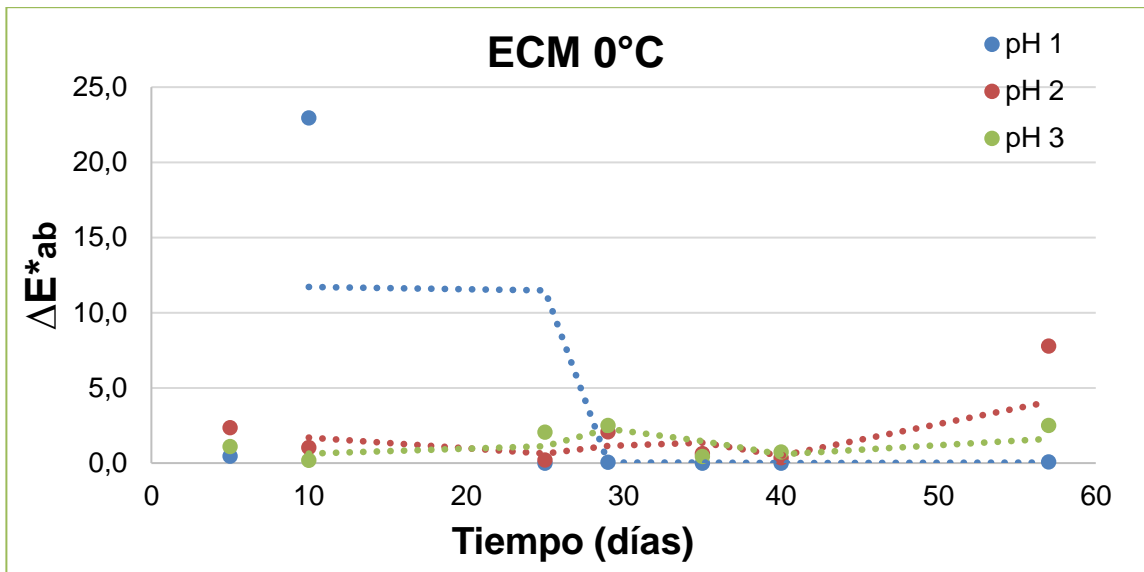
La estabilidad del color del ECU en las diferentes condiciones de almacenamiento muestra que este extracto almacenado a 0°C y pH 1 y 2 no experimenta cambios en el color después de 5 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ), sin embargo, en el mismo periodo a pH 3 si se observaron en el color que son perceptibles al ojo humano ( $\Delta E^*_{ab}: 2,7$ ). También se observó que cuando se almacenan a T. ambiente y pH 1 y 2 el color no cambia en los primeros 19 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ). Finalmente las soluciones de ECU sometidas a 80°C y pH 2 y 3 se observaron cambios más drásticos en el color en tan solo 5 min ( $\Delta E^*_{ab} \sim 3,3$ ).

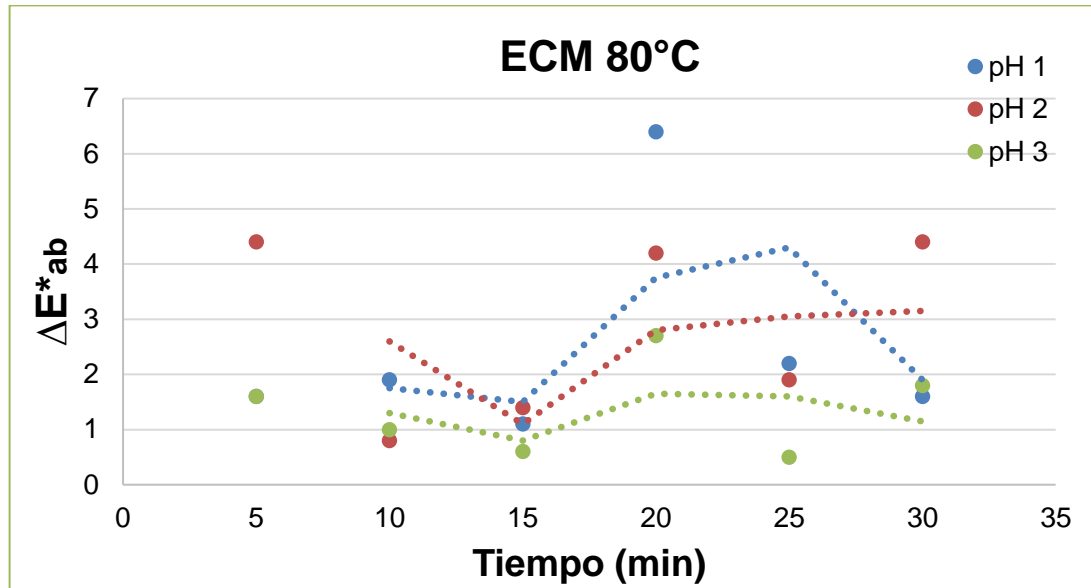
Tabla 35. *Diferencias de color para el extracto crudo de T.mollis a 0°C, T. ambiente 80°C a pH 1, 2, 3.*

ECM											
$\Delta E^*_{ab}$ Tiempo (días)	0°C			$\Delta E^*_{ab}$ Tiempo (días)	TA			$\Delta E^*_{ab}$ Tiempo (min)	80°C		
	pH 1	pH 2	pH 3		pH 1	pH 2	pH 3		pH 1	pH 2	pH 3
<b>0-5</b>	0,4	2,4	1,1	<b>0-5</b>	1,4	7,7	9,1	<b>0-5</b>	1,6	4,4	1,6
<b>5-10</b>	23	1,0	0,2	<b>5-8</b>	1,3	9,3	0,6	<b>5-10</b>	1,9	0,8	1,0
<b>10-25</b>	0	0,2	2,1	<b>10-25</b>	2,5	1,6	2,5	<b>10-15</b>	1,1	1,4	0,6
<b>25-29</b>	0,1	2,1	2,5	<b>25-29</b>	2,8	8,7	11,0	<b>15-21</b>	6,4	4,2	2,7
<b>29-35</b>	0	0,6	0,4	<b>29-35</b>	2,4	9,4	11,5	<b>21-24</b>	2,2	1,9	0,5
<b>35-40</b>	0	0,4	0,7	<b>35-40</b>	3,7	6,6	11,1	<b>24-30</b>	1,6	4,4	1,8
<b>40-57</b>	0,1	7,8	2,5	<b>40-57</b>	0,3	1,6	1,1				

Fuente: Esta investigación

Figura 56. *Diferencias de color de ECM a 0°C, 80°C y T.ambiente a pH 1, 2, 3*





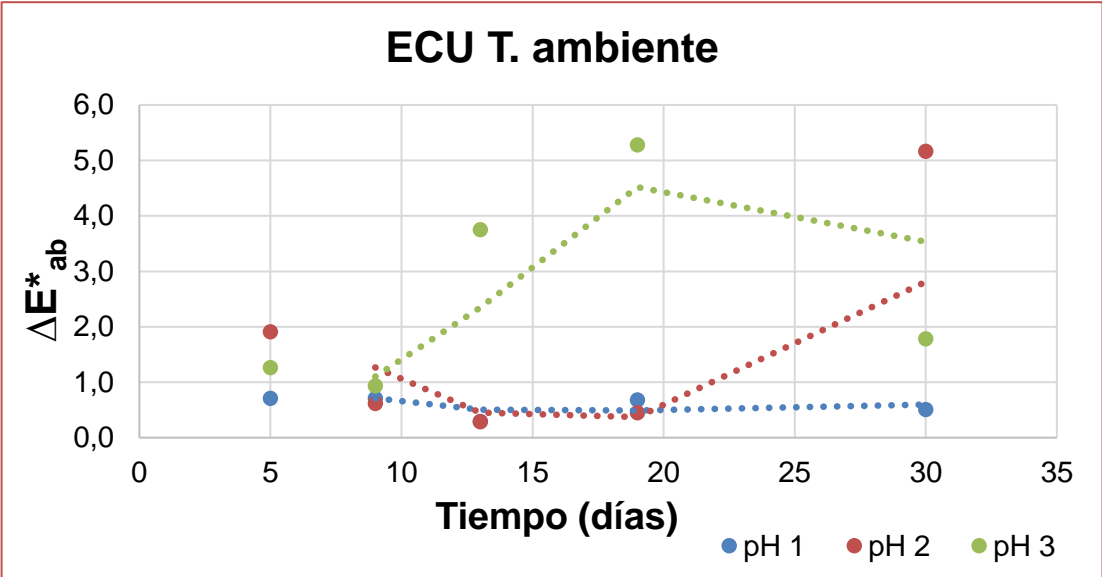
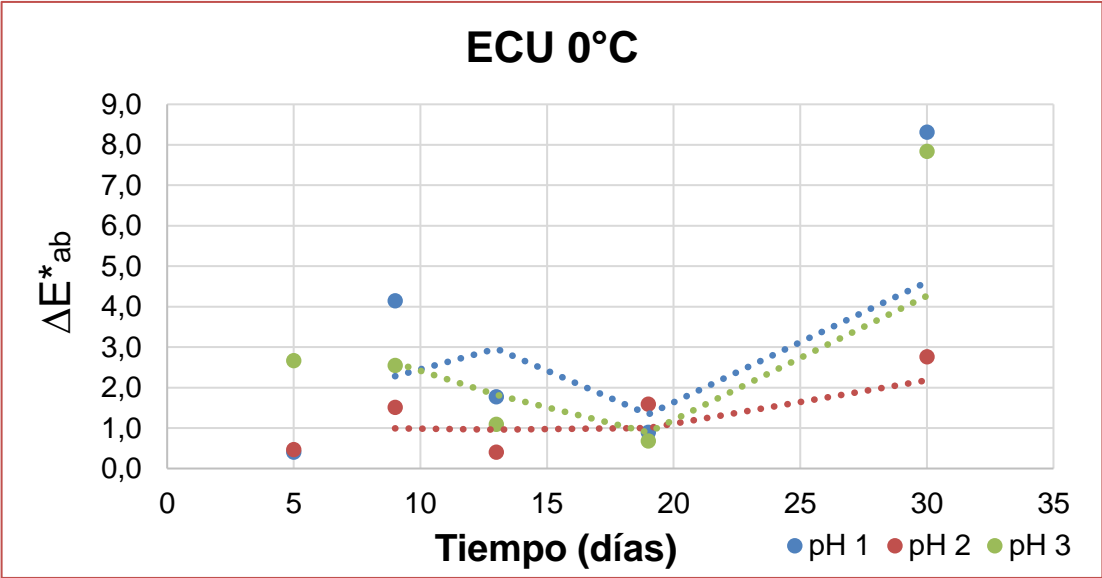
Fuente: esta investigación

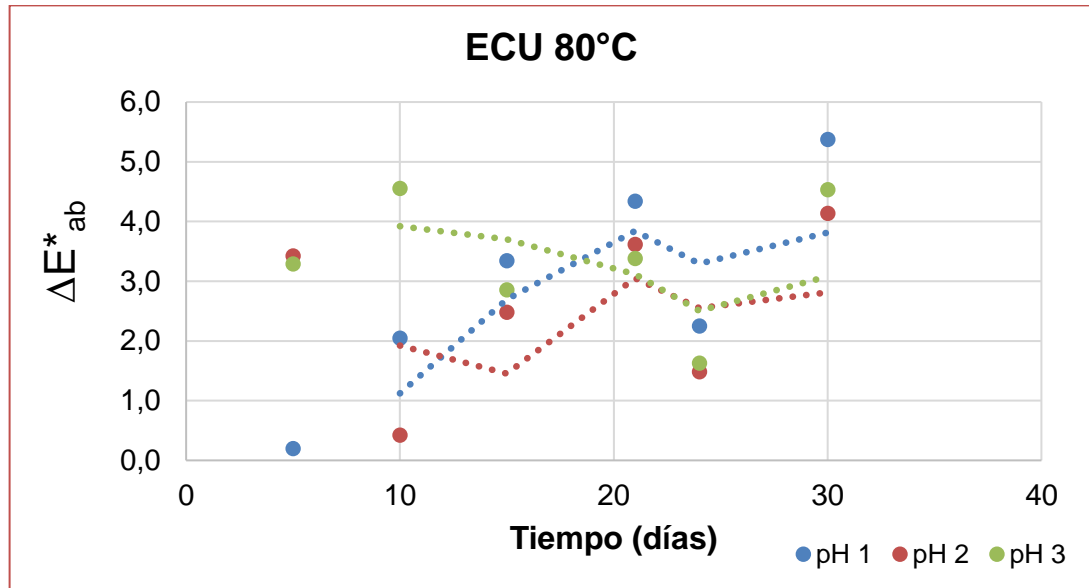
Tabla 36. Diferencias de color para el extracto crudo de *T.urvilleana* a 0°C, T. ambiente a pH 1, 2, 3.

ECU											
ΔE* <sub>ab</sub> Tiempo (días)	0°C			ΔE* <sub>ab</sub> Tiempo (días)	TA			ΔE* <sub>ab</sub> Tiempo (min)	80°C		
	pH 1	pH 2	pH 3		pH 1	pH 2	pH 3		pH 1	pH 2	pH 3
<b>0-5</b>	0,4	0,5	2,7	<b>0-5</b>	0,7	1,9	1,3	<b>0-5</b>	0,2	3,4	3,3
<b>5-9</b>	4,1	1,5	2,6	<b>5-9</b>	0,7	0,6	0,9	<b>5-10</b>	2,0	0,4	4,6
<b>9-13</b>	1,8	0,4	1,1	<b>9-13</b>	0,3	0,3	3,8	<b>10-15</b>	3,3	2,5	2,9
<b>13-19</b>	0,9	1,6	0,7	<b>13-19</b>	0,7	0,5	5,3	<b>15-21</b>	4,3	3,6	3,4
<b>19-30</b>	8,3	2,8	7,8	<b>19-30</b>	0,5	5,2	1,8	<b>21-24</b>	2,2	1,5	1,6
								<b>24-30</b>	5,4	4,1	4,5

Fuente: Esta investigación

Figura 57. Diferencias de color de ECU a 0°C, 80°C y T.ambiente a pH 1, 2, 3





Fuente: Esta investigación

Teniendo en cuenta los datos registrados anteriormente (Tablas 35 y 36, figuras 56 y 57), se puede observar que el pH y la temperatura ejercen un efecto importante en las diferencias de color. Como  $\Delta E^*_{ab} > 3$ , se podría afirmar que las diferencias de color son apreciables en los dos extractos. Sin embargo cuando se someten las soluciones de ECM a 0°C no se observan diferencias a pH 1, 2 y 3 a excepción de los días comprendidos entre 5 y 10 días ( $\Delta E^*_{ab}$ : 2,3) y 40-47 días ( $\Delta E^*_{ab}$ : 7,8) de almacenamiento a pH 1 y 2. A temperatura ambiente y 80°C, las diferencias son más evidentes cuando el tiempo de almacenamiento se incrementa. En el ECU se observan pocas diferencias apreciables cuando se someten las soluciones acuosa a 0°C y T.ambiente. A 0°C se observa que las diferencias significativas se presentan a pH 1 y 2 en los últimos días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab}$ : 8,3 y 7,8., tabla 38), a T. ambiente no existen diferencias visibles al ojo humano.

## 5. CONCLUSIONES

Mediante el uso de diferentes técnicas cromatográficas (retención selectiva Amberlita XAD-7 y exclusión por tamaño molecular Sephadex LH-20) fue posible aislar de manera eficiente diferentes extractos ricos en polifenoles, facilitando la identificación y caracterización de los compuestos mayoritarios presentes en las flores de *T. mollis* y *T. Urvilleana*.

La especie *T.urvilleana* tiene un mayor contenido de antocianinas monoméricas (4,44 mg cy-3-glu /100 g de pétalos frescos). El análisis de los datos permitió establecer la eficiencia de proceso de purificación logrado mediante la retención selectiva de los polifenoles (antocianinas), sobre una resina tipo XAD-7, de las dos variedades de *Tibouchina*. Para el caso de la *T. mollis* el EPM se logró enriquecer en casi 12 veces el contenido de antocianinas. Las flores de *T. mollis* contienen menos antocianinas monoméricas y más antocianinas de tipo polimérico.

En ambas especies se identificaron las antocianinas: Delfinidina-glucósido, Cianidina-3-O-glucósido, Petudina-3-O-glucósido, Peonidina-3-O-glucósido, Malvidina-3-O-glucósido, Petunidina-3-pcumariol-3-O-glucósido y Malvidina-3-pcumariol-3-O-glucósido, el compuesto mayoritario en *T.mollis* fue Cianidina-3-O-glucósido y en *T.urvilleana* Petunidina-3-pcumariol-3-O-glucósido. En compuesto Petudina-3-O-glucósido se encontró en *T. mollis* pero no en *T. urvilleana*.

La mayoría de los flavonoles identificados son derivados de los flavonoides como la Quercetina, Miricetina y Kaempferol. Los resultados muestran que algunos de los compuestos identificados en *T. mollis* también se encuentran en *T. Urvilleana* (Miricetina-3-O-glucorónido, Kaempferol-3-O-glucorónido, Quercetina-3-O-hexósido, Miricetina-3-O-glucorónido, Kaempferol-3-O-hexósido, Isorhamnetina-3-O-glucorónido, Quercetina-3-O-glucósido, Kaempferol-3-O-glucorónido). Se destaca que solo en *Tibouchina urvilleana* se identificó Miricetina-3-O-glucósido y Miricetina.

Las fracciones mas pesadas aisladas de ambas especies de flores, son las que mas aportan al CFT y a la actividad antiradical. Los mayores valores se encontraron para el extracto purificado de *T. mollis*-EPM (TEAC 14,83 mmol de TROLOX / g muestra., EC<sub>50</sub> 4,54 mg/ml). Estos resultados estan en correspondencia con el mayor color polimérico encontrado para *T. mollis*. Los extractos purificados de ambas especies tienen una capacidad antiradical comparable con el antioxidante comercial (ácido ascórbico).

Se encontró una fuerte correlación entre el contenido fenólico (CFT) de cada una de las muestras (extractos crudos y purificados de las dos especies) y la capacidad de reducir radicales libres (TEAC).



Existen diferencias notables en la estabilidad del color de los extractos crudos aislados de *T.mollis* (ECM) y *T.urvilleana* (ECU). El color o tono de una solución acuosa de ECM a pH 1 y pH 2 es de color rojo-anaranjado ( $h_{ab}$ : ~44) y cambia de forma apreciable a color amarillo ( $h_{ab}$ : 78,6) cuando se incrementa el pH a 3, con un croma ( $C^*_{ab}$ : 18,8) superior con respecto a las soluciones a pH 1 y pH 2. Se destaca además que esta solución es más oscura a pH 1. De otro lado, la solución acuosa del extracto crudo de *T. Urvilleana* (ECU) presentó un color más azul ( $h_{ab}$ : -28) que no presentó cambios apreciables en los diferentes valores de pH (pH 1, 2 y 3), sin embargo la saturación del color fue menor a pH 3 ( $C^*_{ab}$ : 12) y más oscura a pH 2 ( $L^*$ : 89).

El estudio de la estabilidad del color a diferentes pHs, cuando las soluciones se someten a diferentes condiciones de almacenamiento (0°C, T ambiente y 80°C), muestra diferencias apreciables en el color en los dos extractos (ECM, ECU). Cuando el ECM se almacena a 0°C y pH 1 y 3 no se observaron diferencias perceptibles en el color ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ) en los primeros 5 días, sin embargo esta misma muestra en iguales condiciones de almacenamiento mostró a pH 1 y en solo 10 días cambios en el color, que son perceptibles por el ojo humano ( $\Delta E^*_{ab}$ : 23). Se estableció además que las soluciones son menos estables a T ambiente y 80°C. Cuando se encuentran a pH 2 y 3 y T ambiente se observaron diferencias de color apreciables en solo 5 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} > 2$ ), en el mismo periodo no se observaron diferencias de color a pH 1 ya que se observó un ( $\Delta E^*_{ab}$ : 1,4). Cuando se someten a 80°C las soluciones del ECM almacenadas a pH 1 y 3 no mostraron cambios drásticos en el color a los 5 min de estar sometidos a 80°C ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ), estos cambios fueron evidentes después de los 15 minutos, la mayor estabilidad de estas soluciones a altas temperaturas puede estar relacionada con la mayor presencia de antocianinas de tipo polimérico en este extracto.

La estabilidad del color del ECU en las diferentes condiciones de almacenamiento muestra que este extracto almacenado a 0°C y pH 1 y 2 no experimenta cambios en el color después de 5 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ), sin embargo, en el mismo periodo a pH 3 si se observaron en el color que son perceptibles al ojo humano ( $\Delta E^*_{ab}$ : 2,7). También se observó que cuando se almacenan a T. ambiente y pH 1 y 2 el color no cambia en los primeros 19 días de almacenamiento ( $\Delta E^*_{ab} < 2$ ). Finalmente las soluciones de ECU sometidas a 80°C y pH 2 y 3 se observaron cambios más drásticos en el color en tan solo 5 min ( $\Delta E^*_{ab} \sim 3,3$ ).

Se ha comprobado que los pétalos de flores de estas dos especies estudiadas son una potencial fuente de compuestos bioactivos, los que podrían ser potencialmente utilizados en la industria textil, farmacéutica y cosmética.

## PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

### PONENCIA MODALIDAD PÓSTER

- *Nombre del Evento:* "IV JORNADA DE ACTUALIZACIÓN CIENTÍFICA EN QUÍMICA-2017: LA QUÍMICA ORGÁNICA Y SUS APLICACIONES"-Universidad de Nariño.
- *Nombre del Evento:* "CONGRESO IBEROAMERICANO DE QUÍMICA 85 AÑOS DE LA SOCIEDAD QUÍMICA DEL PERÚ, XXIX CONGRESO PERUANO DE QUÍMICA". Sociedad Química del Perú-2018
- *Nombre del Evento:* "V JORNADA DE ACTUALIZACIÓN CIENTÍFICA EN QUÍMICA 2018: Retos de la Bioquímica en el siglo XXI"-Universidad de Nariño

### ARTÍCULO EN CONSTRUCCIÓN

- Chemical study, color stability and antiradical capacity of different fractions of anthocyanins isolated from the flowers of *Tibouchina urvilleana* and *Tibouchina mollis*

## RECOMENDACIONES

Se recomienda tener en cuenta el porcentaje de humedad del material vegetal y como este factor podría afectar los resultados de la investigación.

A partir del conocimiento generado en este estudio, se recomienda profundizar en la caracterización de las antocianinas poliméricas.

Es importante completar la elucidación de los compuestos encontrados en esta investigación, mediante RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y análisis bidimensionales como HSQC, HMQC, NOESY y TOCSY.

Finalmente, se recomienda la exploración toxicológica de los extractos de *T.mollis* y *T.urvilleana* para sus posibles usos en la industria alimentaria.

## BIBLIOGRAFÍA

ABAD-GARCÍA B. *et al.* A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. In: Journal of Chromatography A, 2009. vol. 1216, p. 5398–5415.

ABUDUNIA A. M. *et al.* Anticandidal, antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Calendula arvensis* flowers. In: Journal of Mycologie Médicale (2016). vol. 665. p. 1-8.

ADAMS JB. Thermal degradation of anthocyanins with particular reference to the 3-glycosides of Cyanidin I. In acidified aqueous solution at 100°C. In: Journal of the Science of Food and Agriculture. March (1973). vol. 24. p. 747-762.

AGUILERA-ORTÍZ, Miguel, VARGAS María del Carmen, CHEW-MADINAVEITA Gerardo y VELÁZQUEZ Jorge Armando. *Propiedades Funcionales de las Antocianinas*. En: Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Agosto, (2011). vol. 13(2). p. 16.

ALAM, Md.Nur: JAHAN, Nusrat and RAFIQUZZAMAN, Md. *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. In: Saudi Pharmaceutical Journal, 2013. Vol. 21, no.2, p.143-152.

ALCALDE, Cristina., ESCRIBANO Teresa., SANTOS, Celestino., and RIVAS, Julian. C. *Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography*. In: Analytica Chimica. (2004). Acta, 513(1:18). p. 305–318

ALKEMA, Joy and SEAGER, Spencer. *The chemical pigments of plants*. In: Journal of Chemical Education. March, (1982), vol. 59(3). p. 183.

ALZATE, Fernando. *et al.* *Tibouchina mollis* (Bonpl.) Cogn. En: Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Rodrigo, Bernal. Grandstein, y Marcela Celis, eds. (2015).

ANTOLOVICH, Michael, PRENZLER, Paul, ROBARDS, Kevin and Ryan, Danielle. *Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits*. In: Analyst. April, (2000). vol. 125(5). p. 989–1009.

ARNAO, Marino. *Some Methodological Problems in the Determination of Antioxidant Activity Using Chromogen Radicals: A Practical Case*. In: Trends in Food Science and Technology. (2011). vol.11, p. 419-421.

AZEREDO, Henriette. *Original Article Betalains : Properties, Sources, Applications, and Stability – a Review*. In: International Journal of Food Science and Technology. September, (2009). vol. 44. p. 2365–2376

BASANTE VALENCIA, Jessica Saray. Estudio De La Composición Y Actividad Antioxidante *In Vitro* De La Fracción Polifenólica De Subproductos De Aguacate (*Persea Americana Mill*), Semilla Y Epicarpio. Trabajo de Grado Químico. Pasto: Universidad de Nariño. Facultad de Ciencias exactas y Naturales. Departamento de Química, (2016).

BENOIT, I. *et al.* *Gene Overexpression and Biochemical Characterization of the Biotechnologically Relevant Chlorogenic Acid Hydrolase from Aspergillus niger*. In: *Applied and Environmental Microbiology*. (2007). vol. 73 (17): p. 5624-5632.

BENVENUTI, Stefano., BORTOLOTTI, Elisa., and MAGGINI, Rita. *Antioxidant power, anthocyanin content and organoleptic performance of edible flowers*. In: *Scientia Horticulturae*. January (2016). vol. 199. p. 170–177.

BERKÉ, Benedicte., CHÉZE, Catherine., VERCAUTEREN, Joseph and DEFFIEUX, Gérard. (1998). *Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts*. In: *Tetrahedron Letters*. vol. 39(32). p. 5771–5774.

BETTINI, S. *et al.* *Spectroscopic investigations, characterization and chemical sensor application of composite LangmuireSchäfer films of anthocyanins and oligophenylenevinylene derivatives*. In: *Dyes and Pigments*. January (2012), vol 94, 156–162.

BILLMEYER FW and SALTZMAN M. *Principles of Colour Technology*, 2nd edn. New York: Wiley (1981).

BLASCO, Antonio. J., ROGERIO, M. C., GONZALEZ, María and ESCARPA, Alberto. *Electrochemical index as a screening method to determine total polyphenolics in foods: A proposal*. In: *Analytica Chimica Acta*. May (2005). vol. 539. p. 237–244.

BOBBIO, F. O., BOBBIO, P. A., and DEGTSPARI, C. H. *Anthocyanins from Tibouchina grandiflora*. In: *Food Chemistry*. February, (1985), vol. 18(2). p. 153–159.

BOO, Hee-ock, *et al.* *Extraction and Characterization of Some Natural Plant Pigments*. In: *Industrial Crops y Products*. February, (2012). vol. 40. p. 129–35

BORS Wolf, MICHEL Christa and STETTMAIER Kurt. Structure-activity relationships governing antioxidant capacities of plant polyphenols. In: Methods in Enzymology Methods Enzymol. January (2001). vol. 335. p. 166-180.

BOULTON, Roger. *The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review.* In: American Journal of Enology and Viticulture. June (2001). vol. 52. p. 67–87.

BRAGA, M.E.M., *et al.* *Recent Trends and Perspectives for the Extraction of Natural Products.* En: ROSTAGNO, Mauricio A. y PRADO, Juliana M. (Eds.). Natural Product Extraction: Principles and Applications. Cambrigde, UK: RSC Publishing. (2013). p. 231.

BROUILLARD R, MAZZA G, SAAD Z, ALBRECHT-Gary AM and CHEMINAT A. *The co- pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions.* In: J Am Chem Soc. May (1989). vol. 111. p. 2604-2610.

BROUILLARD, R, CHASSAING, S and FOUGEROUSSE, A. *Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why it that red wine color lasts is so long* In: Phytochemistry. December, (2003), vol. 64(7). p. 1179–1186.

CAI, Yi Zhong *et al.* *Phenolic Antioxidants (Hydrolyzable Tannins, Flavonols, and Anthocyanins) Identified by LC-ESI-MS and MALDI-QIT-TOF MS from Rosa chinensis Flowers* In: Journal Agricultural and Food Chemistry. (2005). vol. 53. p. 9940–9948.

CAI, Yizhong. Z., SUN, Mei., and CORKE, Harold. *Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003). vol. 51(8). p. 2288–2294.

CAPITANI, M. I. Caracterización y funcionalidad de subproductos de chía (*Salvia hispanica L.*) aplicación en tecnología de alimentos. Tesis Doctoral. Buenos Aires, Argentina: Universidad Nacional de la Plata-Facultad de Ciencias Exactas. 2013. p. 90.

CARO, Sandra. *Ethnobotanical Studies in the Central Andes (Colombia): Knowledge Distribution of Plant Use According to Informant's characteristics.* In: Journal of ecology and application. December, (2004), vol. 7(2). p. 89–104.

CASSASA, F; SARI, Santiago. *Aplicación de los sistemas CIELAB a los vinos tinto. Correlación con algunos parámetros tradicionales.* En: Revista de Enología y Vinicultura. (2006). vol. 63; p. 5669-5684.

CASTAÑEDA, Araceli., PACHECO, Lourdes., PÁEZ, M. Elena., RODRÍGUEZ, José and GALÁN Carlos. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. In: Food Chemistry. September (2009). vol. 113(4). p. 859–871.

CASTAÑEDA-OVANDO Araceli. *et al. Chemical studies of anthocyanins: A review*. In: Food Chemistry. September, (2009), vol. 113(4). p. 859–871.

CEJUDO-BASTANTE, María, HURTADO, Nelson., MOSQUERA, Natalia., and HEREDIA, Francisco. *Potential use of new Colombian sources of betalains. Color stability of ulluco (Ullucus tuberosus) extracts under different pH and thermal conditions*. In: Food Research International. July (2014). vol. 64. p. 465–471

CHAOVANALIKIT, Arusa; THOMPSON Maxine y WROLSTAD Ronald. *Characterization and Quantification of Anthocyanins and Polyphenolics in Blue Honeysuckle (Lonicera caerulea L.)*. In: Journal of agricultural and food chemistry. (2004). vol. 52. p. 848–852.

CHARFUELÁN, Claudia. *Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del Ivilan (Monima obtusifolia)*. Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2012; 112p.

CHEMISTRY nova. [Online]. Quoted on May 25, 2017] Available at:<<http://quimicanova.sbgq.org.br/imagebank/images/v37n3a19-sch03.jpg>>

CHUN, OCK, *et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods*. In: Journal of Food Composition and Analysis. (2011). vol. 24(7). p. 1043-1045

COOPER-DRIVER, Gillian. A. *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*. In: Phytochemistry. February, (2001), vol. 56(3). p. 229–236.

COUTINHO, M. R., QUADRI, M., MOREIRA, R., and QUADRI, N. *Partial purification of anthocyanins from Brassica oleracea (red cabbage)*. In: Separation Science and Technology. July (2010). vol. 39(16). p. 3769–3782

CRUZ G. José A. *Relación flavonoides totales-actividad antidiabética (In vitro por difusión de glucosa) en extractos de colubrina elliptica*. Tesis Para Obtener el título de: Ingeniero en Alimentos. Huajuapán de León, Oaxaca, México. Universidad Tecnológica De La Mixteca. 2012. p.13

DA COSTA, Cristina, HORTON, Derek, and MARGOLIS, Sam. *Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis*. In: Journal of Chromatography A. June, (2000). vol. 881(1–2). p. 403–410.

DAI Jin and MUMPER Russell. *Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*. In: Molecules. October (2010). vol. 15. p. 7313- 7352.

DAVEY, M. *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures*. In: Encyclopedia of Applied Plant Sciences. Segunda Edición. Elsevier. (2003). vol. 3. p. 1388–1395.

DELGADO-VARGAS, Francisco y PAREDES-LÓPEZ, Octavio. In: Natural colorants for food and nutraceutical uses. Boca Raton: CRC Press, (2003). p. 167-168.

DELGADO-VARGAS, F. JIMENEZ, A. R. and PAREDES-LÓPEZ, O. *Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains. Characteristics, biosynthesis, processing, and stability*. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition. June (2000). vol. 40. p. 173–289.

DÍAS, E.R. *Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad biológica de Tibouchina pereirae Aubl. (Melastomataceae)*. Tesis de maestría, Satate University de Feira de Santana, Bahía, Brasil, 30 de octubre de 2013.

DIAS, Euder, MOREIRA Alexandre Magna., and BRANCO, Alexsandro. *Antinociceptive activity of Tibouchina pereirae, an endemic plant from the Brazilian semiarid region*. In: Journal of Biosciences. June (2016). vol. 71(7–8). p. 261–265.

DINI, A., et al. *Minor components in food plants-Note I. Flavonol glycosides from Ullucus tuberosus*. In: Bollettino.della Società italiana di biologia sperimentale, 1991. vol. 67, no. 12, p. 1053-1058.

DOS SANTOS, Fernanda M. et al. 2012. *Evaluation of Antimicrobial Activity of Extracts of Tibouchina Candolleana (Melastomataceae), Isolated Compounds and Semi-Synthetic Derivatives against Endodontic Bacteria.” Brazilian*. In: Journal of Microbiology 43(2): 793–99.

DOWNHAM, Alison y COLLINS, Paul. *Colouring our foods in the last and next millennium*. In: International Journal of Food Science and Technology. November (1999). vol. 35, p. 5-22.



DRÖGE Wulf. *Free radicals in the physiological control of cell function*. In: American Journal of Physiology (2002). vol. 82. p. 47-95.

ELLA Missang, CREPIN., Guyot, Sylvain., and RENARD, Catherine. *Flavonols and anthocyanins of bush butter, Dacryodes edulis (G. Don) H.J. Lam, Fruit. Changes in their composition during ripening*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2003). vol. 51(25). p. 7475–7480

ESCARPA, A, and GONZÁLEZ, M. C. *An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods*. *Critical Reviews*. In: Analytical Chemistry. June (2001). vol. 31. p. 57–139.

ESCRIBANO, Teresa; SANTOS, Celestino and RIVAS, Gonzalo. *Anthocyanins in cereals*. In: Journal of chromatography. October (2004). vol. 1054. p. 129-141.

ESTÉVES, Mario, *et al.* *Formation of Lysine-Derived Oxidation Products and Loss of Tryptophan during Processing of Porcine Patties with Added Avocado Byproducts*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2012). vol. 60(15). p. 3917-3926.

FOSSSEN, Torgils, *et al.* *Anthocyanins of grasses*. In: Biochemical Systematics and Ecology. June, (2002). vol. 30. p. 855–864.

FOSSSEN, Torgils., and ANDERSEN, Øyvind. *Anthocyanins from red onion, Allium cepa, with novel aglycone*. In: Phytochemistry. April (2003). vol. 62(8). p. 1217–1220.

FURLAN, Claudia.; SALATINO, Antonio and DOMINGOS, Marisa. *Influence of air pollution on leaf chemistry, herbivore feeding and gall frequency on Tibouchina pulchra leaves in Cubatão (Brazil)*. In: Biochemical Systematics and Ecology, March (2004). vol. 32. p. 253–263.

GARCÍA PARRILLA, M.C., *et al.* *Radical scavenging hability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical*. In: Talanta. (2007). vol. 71(1). p. 230–235.

GARCÍA, Cristina and BRIDLE, Peter. *Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid*. In: Food Chemistry. January (1999) vol. 64(1). p. 21–26.

GARY, Takeoka and LAN. Dao. *Methods of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals* In: W.J. Hurst (Ed.), CRC Press, Taylor and Francis Group, 2008, p. 247.

GIULIANI, A. *Properties and Determination of Natural Pigments*. In: Encyclopedia of Food and Health Colors 1st ed. Elsevier Ltd. (2016). p. 274.

GIUSTI, Mónica and WROLSTAD, Ronald. *Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems*. In: Biochemical Engineering Journal. June, (2003), vol. 14(3). p. 217–225.

GIUSTI, Mónica., and WROLSTAD, Ronald. E. *Anthocyanins. Characterization and measurement with UV- visible spectroscopy*. In: R.E.Wrolstad (Ed.), and Food Analytical Chemistry. New York: Wiley. (2001). UNIT F1.2 y F1.2.13.

GIUSTI, Mónica; RODRIGUEZ, Luis and WROLSTAD Ronald. *Molar absorptivity and color characteristics of acylated and nonacylated pelargonidin-based anthocyanins*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. October (1999). vol. 47. p. 4631-4637.

GOLDENBERG, Renato. *et al. Taxonomia de Melastomataceae No Brasil: Retrospectiva, Perspectivas e Chave de Identificação Para Os Gêneros*. En: Rodriguesia. (2012). vol. 63(1). p. 145–61.

GOLDSON, Andrea. *et al. Antioxidant Activity , Total Phenolics and Fatty Acid Profile of Delonix Regia , Cassia Fistula , Spathodea Campanulata , Senna Siamea and Tibouchina Granulosa*. In: Journal of Analytical and Pharmaceutical Research. October, (2016). vol. 3. p. 1–7.

GOTO, Toshio y KONDO, Tadao. *Structure and molecular stacking of anthocyanins-flower color variation*. In: Angew Chemistry. (1991). vol. 30. p. 17-33.

GROTEWOLD, Erich. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer (2006). [On-line]. Available in :< <http://rushim.ru/books/mechanizms/the-science-of-flavonoids.pdf>>

HALBWIRTH Heidi. *The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway*. In: International Journal of Molecular Sciences. February (2010). vol. 11(2). p. 595-621.

HASNAH, Sirat *et al. Isolation and Identification of Radical Scavenging and Tyrosinase Inhibition of Polyphenols from Tibouchina Semidecandra L*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. January, (2010). Vol. 58(19). p. 10404–9.

HE, Jian., y GIUSTI, Mónica. *Antocianinas: colorantes naturales con propiedades que promueven la salud*. In: Revisión anual de ciencia y tecnología de los alimentos. November (2010). vol. 1 (1), 163–187.

HEDIN, P. A. *et al. Plant Resistance to Insects*. In: American Chemical Society, Washington, DC, P. A. Hedin (Ed.). (1983). p. 347.

HENDRA, Rudi and KELLER, Paul. *Flowers in Australia: Phytochemical Studies on the Illawarra Flame Tree and Alstonville*. In: Australian Journal of Chemistry. (2016). vol. 69. p. 925–927.

HERBACH, Kristen, MAIER, Christine, STINTZING, Florian and Carle Reinhold. (2007). *Effect of processing and storage on juice color and betacyanin stability of purple pitaya (Hylocereus polyrhizus) juice*. In: European Food Research and Technology. March, (2007). vol. 224. p. 649-658.

HEREDIA, Fafar., FRANCIA-Aricha, E.M., RIVAS, Julián., VICARIO, Isabel and SANTOS Celestino. *Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes. I. pH effect*. In: Food Chemistry. Diciembre (1998). vol. 63. p. 491-498.

HEREDIA. F. J., ÁLVAREZ, C., GONZÁLEZ-MIRET, M. L y RAMÍREZ, A. CromaLab®, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04. (2004). Sevilla, España.

HOWITT, Crispin and POGSON, Barry. *Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues*. In: Plant, Cell and Environment. March, (2006), vol. 29(3). p. 435–445.

HSIEH Meng Chieh *et al. Antioxidative Activity and Active Components of Longan (Dimocarpus longan Lour.) Flower Extracts*. In: Journal Agricultural and Food Chemistry. (2008). vol. 56. p. 7010–7016.

JACKMAN RL, SMITH JL. *Antocianinas y betalaínas*. En: Hendry GAF, Houghton JD (eds) Colorantes alimentarios naturales. Springer, Boston, MA. (1996) p.244-309.

JAMPANI, Chandrasekhar., NAIK, Aduja and RAGHAVARAO, KSMS. *Purification of anthocyanins from jamun (Syzygium cumini L.) employing adsorption*. In: Separation and Purification Technology. (2014). vol. 575 (125). p. 170-178.

JANNA, O. A. *et al Anthocyanin stability studies in Tibouchina semidecandra L*. In: Food Chemistry. April (2007). vol. 101. p. 1640–1646.

JERZ, Gerold; GUTZEIT, Derek and WINTERHALTER, Peter. *Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization*

*mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols.* In: Journal of Chromatography A, 2007. vol. 1172, no.1, p.40–46.

JIMENEZ, Juan y Villareal, John. *Estudio químico de pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del motilón (Hyeronima macrocarpa).* Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 103p.

JING Pu. *Purple corn anthocyanins: chemical structure, chemopreventive activity and structure/function relationships.* Thesis Ph.D. (2006). Ohio State University, U.S.A. p. 5-90.

JORDHEIM, Mónica. *Isolation, identification an properties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms.* In: Department of Chemistry, University of Bergen. Allégt. 41, 5007 Bergen, Norway (2007). p. 93.

JORHEIM, M. *Isolation, Identification and proprieties of pyranoanthocyanins and anthocyanin forms.* Thesis Post-Doctor. Bergen: University of Bergen. Department of Chemistry, 2007. P. 85.

JUDD DB y WYSZECKI G. *Colour in Business, Science and Industry*, 3rd edn. New York: Wiley. (1975).

KAHKONEN, M. P., HOPIA, A. I and HEINONEN, M. *Berry phenolics and their antioxidant activity.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. August (2001). vol. 49(8). p. 4076–4082.

KAIMAINEN, Mika. *Stability of Natural Colorants of Plant Origin.* Doctoral Thesis in Food Sciences. University of Turku. Food Chemistry and Food Development. Department of Biochemistry, (2014). p. 6.

KAPASAKALIDIS, Petros., RASTALL, Robert., and GORDON, Michael. *Extraction of polyphenols from processed black currant (Ribes nigrum L.) residues.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2006). vol. 54(11). p. 4016–4021.

KAPOOR, Harish and KAUR, Charanjit. *Review Antioxidants in fruits and vegetables the millennium's health.* In: International Journal of Food Science and Technology. (2001). vol. 36(7). p. 703-725.

KARADAG, Ayse., OZCELIK, Beraat and SANER, Samin. *Review of methods to determine antioxidant capacities.* In: Food Analytical Methods. January (2009). vol. 2, p. 41–60.

KHALLOUKI F. *et al.* *Identification of polyphenolic compounds in the flesh of Argan (Morocco) fruits.* In: Food Chemistry, 2015. vol. 179, p. 191–198.

KOES, Ronald, QUATTROCCHIO, Francesca and Mol Joseph. *The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution.* In: BioEssays. February, (1994). vol. 16. p. 123-132.

KONCZAK, Izabela and ZHANG, Wey. *Anthocyanins-more than nature's colours.* In: Journal of Biomedicine and Biotechnology. December, (2004). vol. 5. p. 239–240.

KONG, Jin Ming, *et al.* *Analysis and Biological Activities of Anthocyanins.* In: Phytochemistry. (2003). vol. 64(5). p. 923–33.

KOSIŃSKA, Agnieszka, *et al.* *Phenolic Compound Profiles and Antioxidant Capacity of Persea Americana Mill. Peels and Seeds of Two Varieties.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2012). vol 60(18). p. 4615-4616.

KUSTER, Ricardo, NORBERT Arnold, and LUDGER Wessjohann. *Anti-Fungal Flavonoids from Tibouchina Grandifolia.* In: Biochemical Systematics and Ecology. January, (2009), vol. 37(1). p. 63–65.

LEE, Jungmin., DURST, Robert and WROLSTAD, Ronald *Impact of juice processing on blueberry anthocyanins and polyphenolics: Comparison of two pretreatments.* In: Journal of Food Science. (2002). vol. 67(5). p. 1660–1667.

LEE, Jungmin., DURST, Robert., and WROLSTAD, Ronald. *Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative Study.* In: The Journal of the Association of Official Analytical Chemists International. (2005). vol. 88. p. 1269-1278.

M. Greenwell and P.K.S.M. Rahman. *Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment.* In: International J Pharm Sci Res. October (2015). vol. 6(10). p. 4103–4112.

MACCARONE Emanuele, MACCARRONE Angelo and RAPISARDA Paolo. *Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice.* In: Journal Food Science. (1985). vol. 50. p. 901-904.

MAGALHAES, Luis. M., SEGUNDO, Marcela. A., REIS, Salette., and LIMA, José. *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.* February (2008). In: Analytica Chimica Acta, 613, 1–19.

MARTENS, Stefan, *et al.* *Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues.* In: Biochemical Engineering Journal. June, (2003). vol. 14(3). p. 227–235

MARTÍN Julia, SÁEZ Purificación, RAMOS Fernando, JÍMENEZ Ana María and FETT Agustín. *Analysis and antioxidant capacity of anthocyanin pigments. Part II: Chemical structure, color, and intake of anthocyanins.* In: Critical Reviews in Analytical Chemistry. March (2012). vol. 42(2). p. 126-151.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., *et al.* *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.* En: Nutrición hospitalaria, 2002. vol. 17(6). p. 271-278.

MATSUFUJI, Hiroshi, *et al.* *Identification of reaction products of acylated anthocyanins from red radish with peroxy radicals.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. May (2003). vol. 51(10). p. 3157–3161

MAZZA, Giuseppe and BROUILLARD, Raymond. *The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions.* In: Phytochemistry. (1990). vol. 29(4). p. 1097–1102.

MCDONALD R (ed.) *Colour Physics for Industry*, 2nd edn. Bradford: Society of Dyers and Colourists (1997).

MENDOZA Humberto y RAMÍREZ, Bernardo. *Guía ilustrada de géneros de melastomataceae y memecylaceae de Colombia: género Tibouchina.* Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, (2006). ISBN: 958-8151-67-8. p.226

MORTENSEN, Alan. *Carotenoids and other pigments as natural colorants.* In: Pure and Applied Chemistry, (2006). vol.78 (8). p. 1478

MOSQUERA, Oscar *et al.* *Antioxidant Activity of Plant Extracts from Colombian Flora.* In: Brazilian Journal of Pharmacognosy. March (2009). vol.19 (2 A). p. 382–87.

MOTTA, Lucimar.; KRAUS, Jane.; SALATINO, Antonio and SALATINO, María. *Distribution of metabolites in galled and non-galled foliar tissues of Tibouchina pulchra.* In: Biochemical Systematics and Ecology. October (2005). vol. 33. p. 971–981.

MOBHAMMER, Marcus, STINTZING, Florian and CARLE, Reinhold. *Evaluation of different methods for the production of juice concentrates and fruit powders from cactus pear*. In: Innovative Food Science and Emerging Technologies. December, (2006). vol. 7. p. 275-287.

MUÑOZ, Óscar, TORRES, Gaspar. A., NÚÑEZ José, DE LA ROSA, Laura, RODRIGO, Joaquín, AYALA Fernando., y ÁLVAREZ Emilio. *Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo De Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación De Polifenoles Totales*. En: Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Abril (2017). vol. 20(2). p. 23-28.

NICHENAMETLA, S. N, TARUSCIO, T. G, BARNEY, D. L and EXON, J. H. *A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer*. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 46(2). p. 161–183.

NICOLETTI Isabella, BELLO Cristiano, DE ROSSI Antonella and CORRADINI Danilo. *Identification and quantification of phenolic compounds in grapes*. In: Journal Agriculture. Food Chemistry. (2008). vol. 56. p. 8801–8808.

OKUMURA, F.; SOARES, M.; BARBOSA, H.F and CABALLERO, E.T.G. *Identificación de pigmentos naturales de especies vegetales utilizando cromatografía en papel*. Quim. Nuevo. 2002, 25, p. 680-683.

OLIVEIRA Joana, DA SILVA Mara Alhinho, TEIXEIRA Natercia, DE FREITAS Victor and SALAS Erika. *Screening of anthocyanins and anthocyanin-derived pigments in red wine grape pomace using LC/DAD-MS and MALDI-TOF techniques*. In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. April, (2015).

PAZMIÑO, Alexandra., GIUSTI, Mónica., WROLSTAD, Ronald., y GLÓRIA, Beatriz. *Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants*. In: Food Chemistry. April (2001). vol. 75(2). p. 211–216.

PAZMIÑO-DURÁN, Alexandra. *et al. Anthocyanins from oxalis triangularis as potential food colorants*. In: Food Chemistry. November, (2001), vol. 75(2). p. 211–216.

PEÑA, Daniel., INOSTROZA Claudio., REYES Marjorie and RIBERA., Alejandra. *Anthocyanins in Berries and Their Potential Use in Human Health*. In: Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine. Chapter 8. [Online]. Available in:< <https://cdn.intechopen.com/pdfs/53823.pdf>>.

PLANTAS Y FLORES. [En línea]. [Citado el 26 de Julio de 2018]. [Última actualización, 30 de Junio de 2018]. Disponible en: <<https://plantayflor.blogspot.com/2010/01/tibouchina-urvilleana-tibouchina.html>>

PORTILLO, Dairo; Villacréz, José. *Análisis químico de los pigmentos tipo antocianina presentes en el fruto del mortiño (Vaccinium floribundum H.B.K)*. Trabajo de grado Química, Pasto: Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Exactas y Matemáticas. Departamento de Química, 2008; 128p.

PRIOR, Ronald L and XIANLI Wu. *Analysis Methods of Anthocyanins*. In: Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals, chapter 5. First edition. (2012). John Wiley & Sons, Ltd. p. 149–180.

QUIÑONES, Ximena., RODRÍGUEZ C, Karen., Evaluación Del Extracto De Flavonoles Y Antocianinas Contenidos En El Agraz (*Vaccinium Meridionale Swartz*) Obtenidos A Nivel Laboratorio Por Medio De Los Métodos De Extracción Por Solventes Y Extracción Asistida Por Microondas. Proyecto integral de grado para optar el título de: INGENIERO QUÍMICO. Fundación Universidad De América Facultad De Ingenierías. Bogotá. (2016)

RASCO, Bárbara, *et al.* *Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (Allium cepa) and shallot (Allium oschaninii) using infrared spectroscopy*. In: Food Chemistry. (2011). vol. 129(2). p. 637-644

RE, R, *et al.* *Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay*. In: Free Radical Biology and Medicine. (1999). vol. 26(9). p. 1231-1237.

REIN, Maarit. *Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins*. In: Department of Applied Chemistry and Microbiology. Division of Food Chemistry. University of Helsinki, (2005). p. 67.

REZENDE Fernanda, FERREIRA Marcelo, CLAUSEN Mads Hartvig, ROSSI Magdalena and FURLAN Claudia Maria. *Acylated Flavonoid Glycosides are the Main Pigments that Determine the Flower Colour of the Brazilian Native Tree Tibouchina pulchra (Cham.) Cogn.* In: Moléculas. February (2019). vol. 24(4). p. 718.

RODRÍGUEZ, José Olimpo, PEÑA, José y RODRÍGUEZ, Eduardo. *Flora de los Andes. Cien especies del Altiplano CundiBoyacense*. Villegas Editores. Bogotá, Colombia. (1984). p. 103.



RONALD, Prior., XIANLI, Wu and SCHAICH, Karen. *Standardized Methods for the Determination of Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements Antioxidant Agric.* In: Food Chemistry. (2005). vol. 53. p. 4290-4302.

ROSE, Paul M. *et al.* *Application of Anthocyanins from Blackcurrant (Ribes Nigrum L.) Fruit Waste as Renewable Hair Dyes.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (2018). vol. 66. p. 6790–6798.

SCHANDA J Colorimetry: Understanding the CIE system. New York, NY: Wiley. Wyszecki G and Stiles WS (1982) Color Science, (2007). 2nd edn. New York, NY: Wiley.

SCHEER, H. *Structure and occurrence of chlorophylls in Chlorophylls*, ed. H. Scheer, CRC Press, Boca Raton, FL. (1991). p. 3–30.

SCHWARTZ, S. *et al.* *Colorants in Fennema's Food Chemistry.* (4th Edición), eds. S. Damodaran, K.L. Parkin & O.R. Fennema, Taylor and Francis Group, LLC, Boca Raton, FL, (2008) p. 571–638.

SCHWARZ, Michael., WABNITZ, Tobias. C., and WINTERHALTER, Peter. *Pathway leading to the formation of anthocyanin–vinylphenol adducts and related pigments in red wines.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry, June (2003). vol. 51(12). p. 3682–3687.

SEGUNDO, Marcela, *et al.* *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties.* In: Analytica Chimica Acta. (2008). vol. 63, p.1-19.

SHIPP Jaclyn. and ABDEL-AAL Sayed. M. *Food Applications and Physiological Effects of Anthocyanins as Functional Food Ingredients.* In: The Open Food Science Journal. (2010). vol. 4. p. 7-22.

SIMMONDS, M. S. J. *Flavonoid–insect interactions: Recent advances in our knowledge.* In: Phytochemistry. Septiembre, (2003). vol. 64(1). p. 21–30.

SOBRINHO, Andrea *et al.* *Characterization of Anti-Inflammatory Effect and Possible Mechanism of Action of Tibouchina Granulosa.* In: Journal of Pharmacy and Pharmacology. January, (2017).

STINTZING, Florian C. and CARLE, Reinhold. *Betalains in food: occurrence, stability, and postharvest modifications.* In: SOCACIU, Carmen (Ed.), Food Colorants. Chemical and Functional Properties. Boca, Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, (2008). p. 286.

- STRACK, Dieter, VOGT, Thomas and SCHLIEMANN, Willibald. *Recent advances in betalain research*. In: Phytochemistry. October, (2002). vol. 62. p. 247–269.
- TANAKA, Yoshikazu, NOBUHIRO Sasaki and AKEMI Ohmiya. *Biosynthesis of Plant Pigments: Anthocyanins, Betalains and Carotenoids*. In: Plant Journal, vol. 54(4). January, (2008). p. 733–49.
- TERAHARA, Norihiko, *et al.* *A Diacylated Anthocyanin from Tibouchina-Urvilleana Flowers*. In: Journal of Natural Products. March (1993). vol. 56. p. 335–340.
- TIRZITIS Gunars and BARTOSZ Grzegorz. *Determination of antiradical and antioxidant activity: Basic principles and new insights*. In: Acta Biochimica Polonia. February (2010), vol. 57(1). p. 139-142.
- TODZIA, Carol and ALMEDA, Frank: *A revision of Tibouchina section Lepidotae (Melastomataceae: Tibouchineae)*. In: Proceedings of the California Academy of Science. January (1991). vol. 47(6). p. 175-206.
- TRACANNA, María *et al.* *Anti-Leishmanial, Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities of Phenolic Derivatives from Tibouchina Paratropica*. In: Phytotherapy Research. November, (2015). vol. 29(3). p. 393–97.
- ULLAH Rahat, KHAN Mehtab, ALI SHAH Shahid, SAEED Kamran y MYEONG Ok Kim. *Natural Antioxidant Anthocyanins—A Hidden Therapeutic Candidate in Metabolic Disorders with Major Focus in Neurodegeneration*. In: Nutrients. May (2019). vol. 11(3). p. 1-32.
- UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. [En línea]. [Citado el 26 de Julio de 2018]. [Última actualización 14 de febrero de 2007]. Disponible en: <<http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/64173/>>
- URIBE, Lorenzo. *Catálogo ilustrado de las plantas de Cundinamarca: Passifloraceae, Begoniaiceae, Melastomataceae*. En: Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá. (1972). vol. 5.
- VARGAS, William. *Guía ilustrada de las Plantas de las Montañas del Quindío y los Andes Centrales*. Manizales: Universidad de Caldas, Centro Editorial. (2002). p. 814.
- VILLACREZ YEPEZ, Jose L. *Desarrollo de microencapsulados por SPRAY DRYING a partir de frutos de mora de castilla (Rubus glaucus Benth)*. Tesis de

Maestría en Ciencias Químicas. Bogotá D.C: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Química, 2013.

WATERS CORPORATION U.S.A. The most successful Column in Over 30 Years of Stationary Phase Technology. In: XTerra Columns. Disponible en <<http://waters.com/xterra>>

WYSZECKI G and STILES WS. Color Science Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2nd edn. New York: Wiley (1982).


XIAO Jun-Song, XIE Bi-Jun, CAO Yan-Ping, WU Hua, SUN Zhi-Da and XIAO Di. *Characterization of Oligomeric Procyanidins and Identification of Quercetin Glucuronide from Lotus (Nelumbo nucifera Gaertn.) Seedpod.* In: Journal of Agricultural and Food Chemistry. February (2012). vol. 60. p. 2825–2829.

Zheng, Jingyun., Yu, Xiaoming., Maninder, Meenu., and Xu, Baojun. *Total phenolics and antioxidants profiles of commonly consumed edible flowers in China.* In: International Journal of Food Properties. July (2018). vol. 21(1). p. 1524–1540.

ZHONG, J. and SHANGHAI Jiao. *Comprehensive Biotechnology Plant Secondary Metabolites.* In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Segunda Edición. Elsevier. (2010). vol. 6, p. 3883–3819.

## ANEXOS

### ANEXO A. Certificado de clasificación taxonómica impartido por el Herbario –PSO- de la Universidad de Nariño.

 Universidad de Nariño  
HERBARIO-PSO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA**

La suscrita directora del **HERBARIO PSO DE LA UNIVERSIDAD DE NARIÑO**, certifica que la estudiante: **NATALIA ESTEFANIA SOLARTE IMBACHI**, del programa de Química, con código: **2121401161**, solicitó la identificación taxonómica para dos muestras botánicas, las cuales contienen la siguiente información:

**Muestra 1:**  
**Nombre común reportado:** Pucasacha.  
**Lugar de colecta:** Corregimiento de la Laguna.  
**Altura sobre el nivel del mar:** 2800 msnm.  
**Fecha de colecta:** 15 de mayo de 2017.

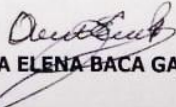
**Muestra 2:**  
**Nombre común reportado:** Siete cueros, Flor de mayo.  
**Lugar de colecta:** Municipio de Nariño.  
**Altura sobre el nivel del mar:** 2467 msnm.  
**Fecha de colecta:** 15 de mayo de 2017.

Una vez revisadas las características morfológicas de los ejemplares y comparados con los exsiccados registrados en el Herbario de Investigaciones –HERBARIO PSO-, como única colección vegetal legalmente registrada en el departamento de Nariño, las muestras corresponden a:




**Muestra 1:** familia Melastomataceae, especie:  
***Tibouchina mollis* (Bonpl.) Cogn.**

**Muestra 2:** familia Melastomataceae, especie:  
***Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn.**

Se expide a solicitud de la interesada, como soporte para el anteproyecto de grado denominado **"ESTUDIO QUÍMICO Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE PIGMENTOS TIPO ANTOCIANINAS PRESENTES EN DOS ESPECIES DE FLORES SILVESTRES DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO"**, a los 23 (veintitrés) días del mes de mayo de 2017.

  
**AIDA ELENA BACA GAMBOA**

Ciudad Universitaria Torobajo - Laboratorios de Biología - Bloque I - Tel. 731 1449 Ext. 263  
email: adminherbario@udenar.edu.co - San Juan de Pasto - Nariño - Colombia

GA-CER 11282 30-CER 11048 CD-ISO-CER 11048

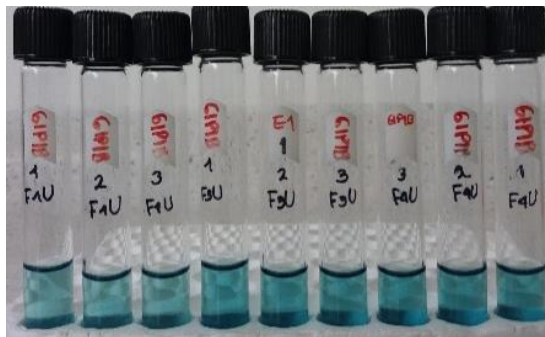
ANEXO B. Coloración azul característica de la reacción del Método de Folin.



\*Muestras + Reactivo de Folin.

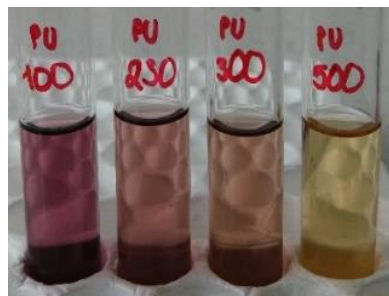
Fuente: Esta investigación

ANEXO C. Coloración azul-verdosa característica del radical ABTS•+



Fuente: Esta investigación

ANEXO D: Coloración violeta característica del radical DPPH.



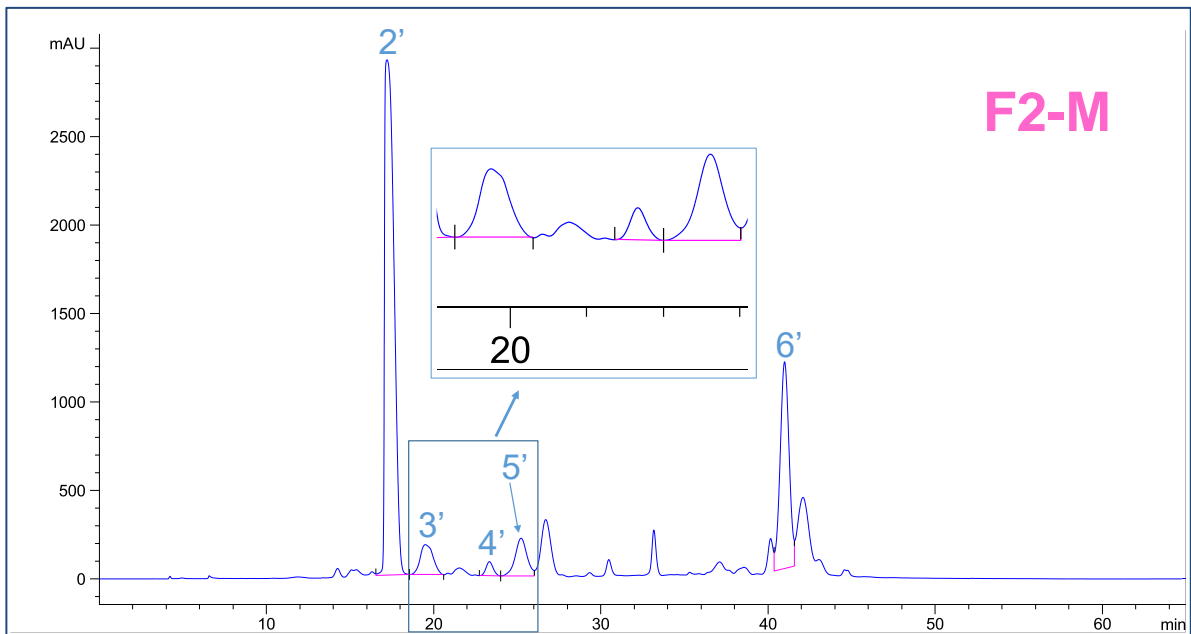
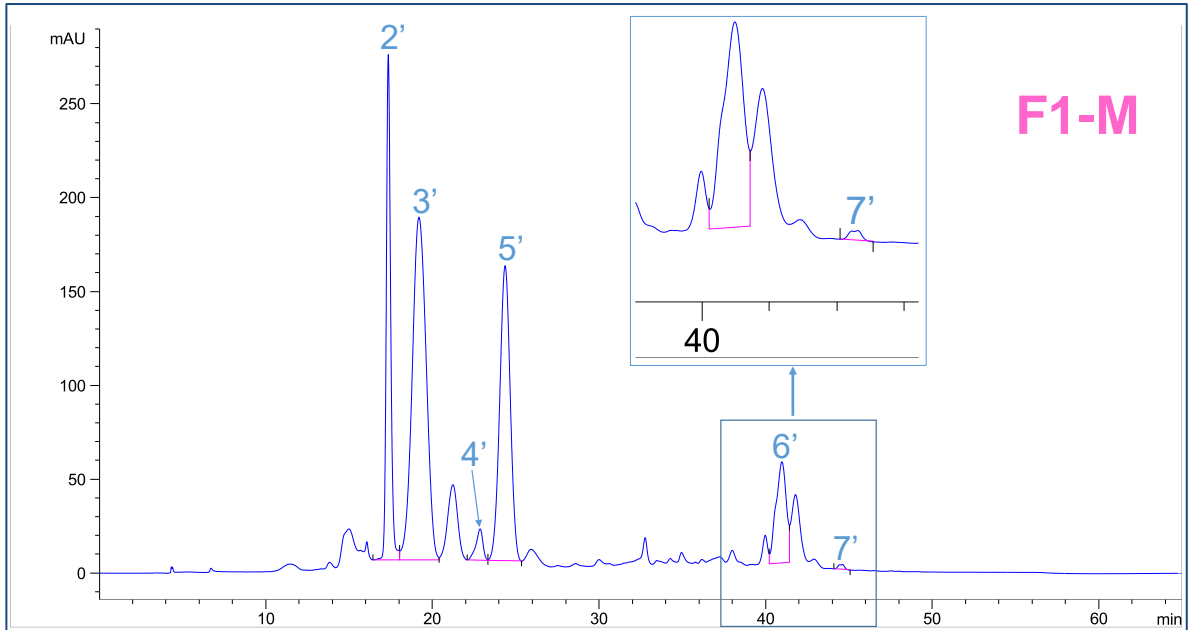
**EPU**

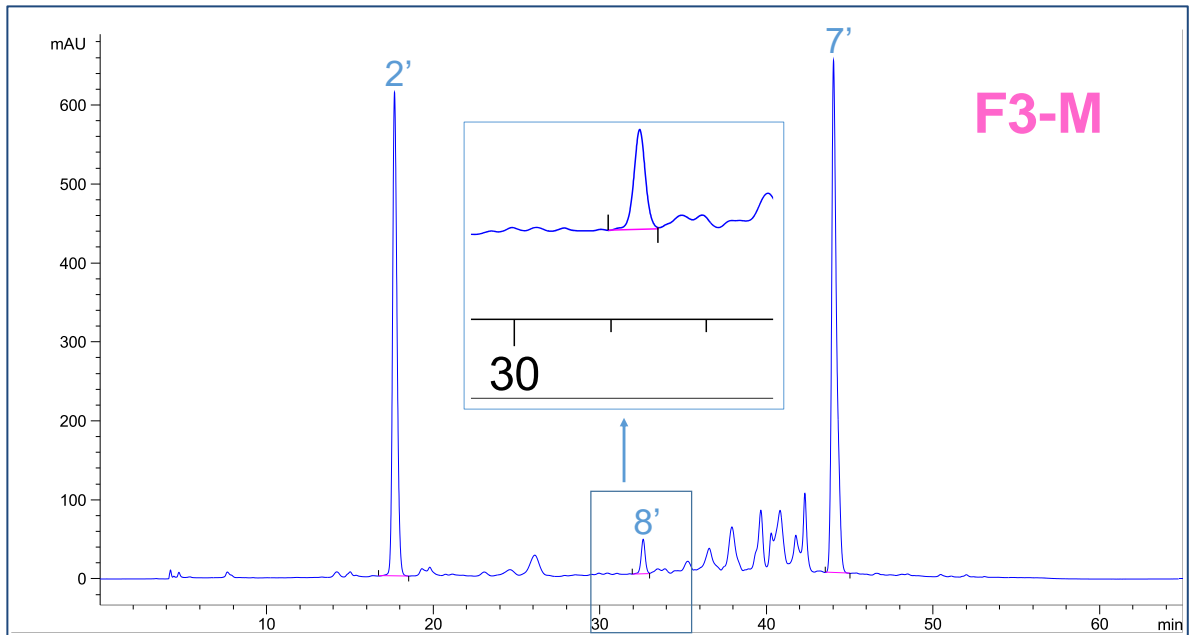


\*La concentración de antioxidante aumenta de derecha a izquierda.

Fuente: Esta investigación.

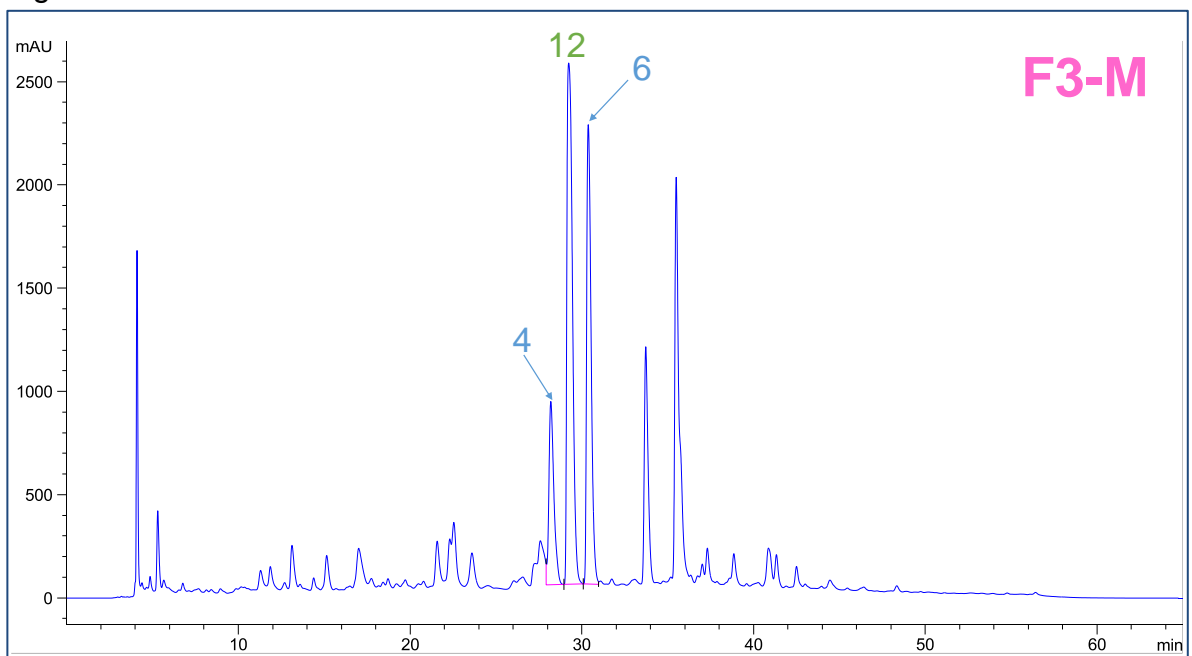
ANEXO E: Perfiles cromatográficos de F1-M, F2-M, F3-M, F1-U, F2-U, F3-U, F4-U registrados a 520 nm

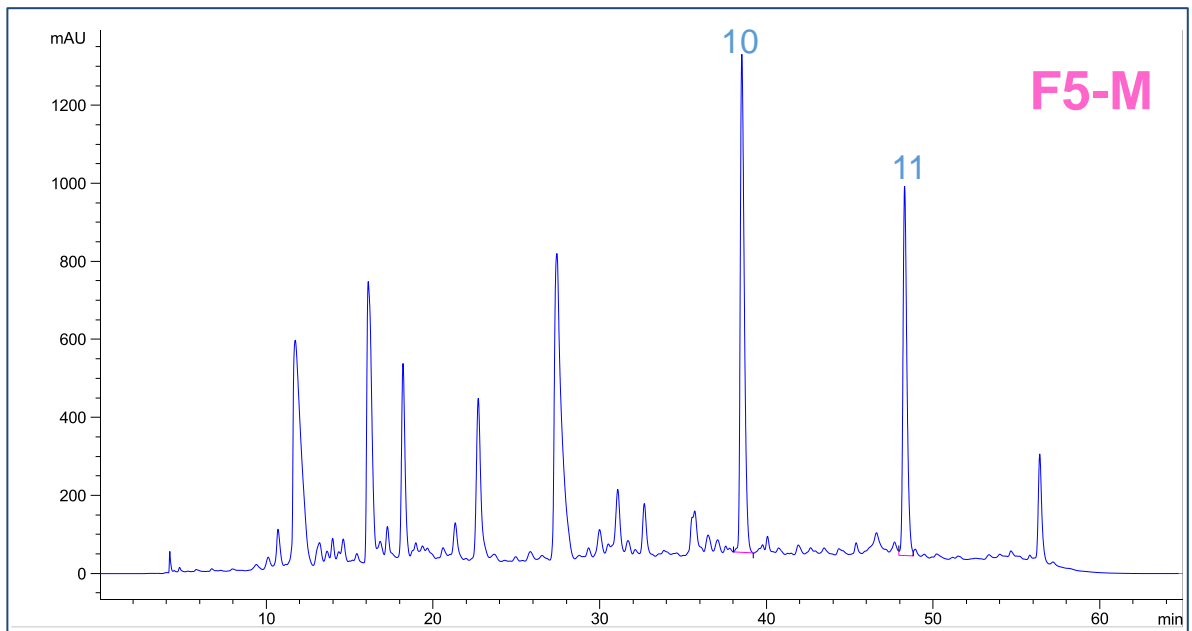
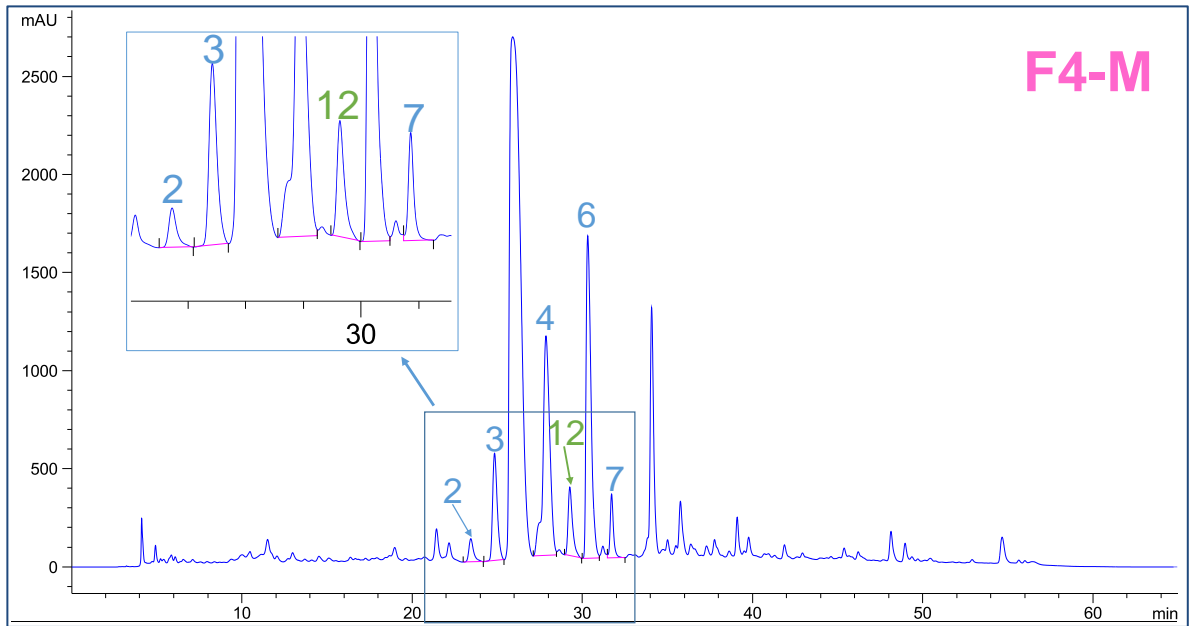




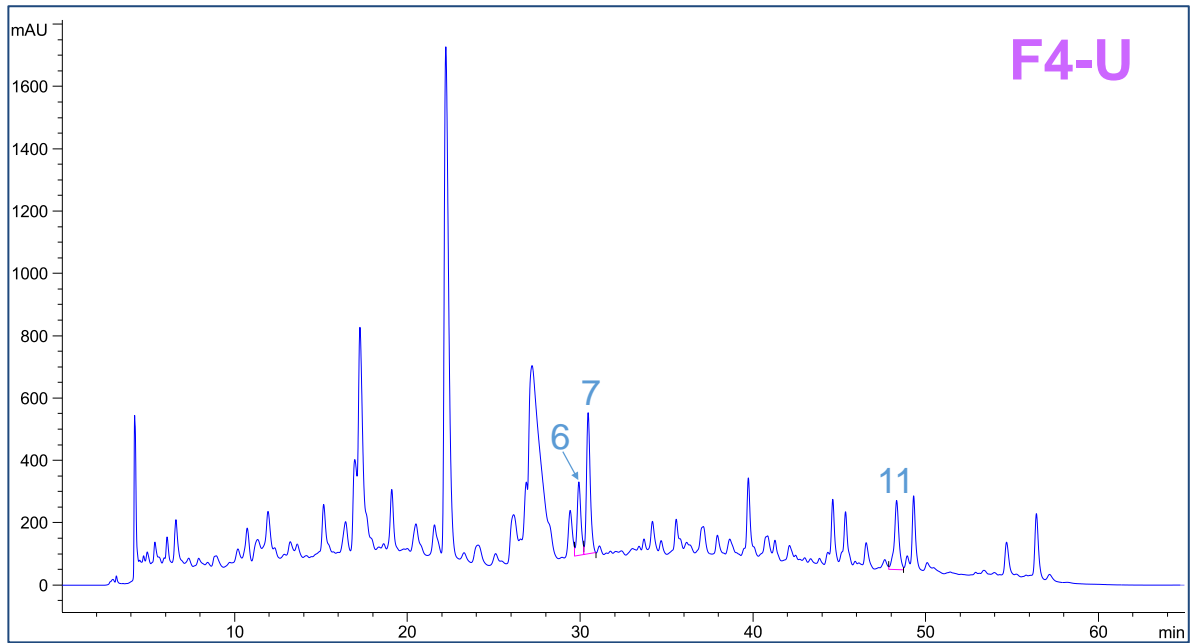
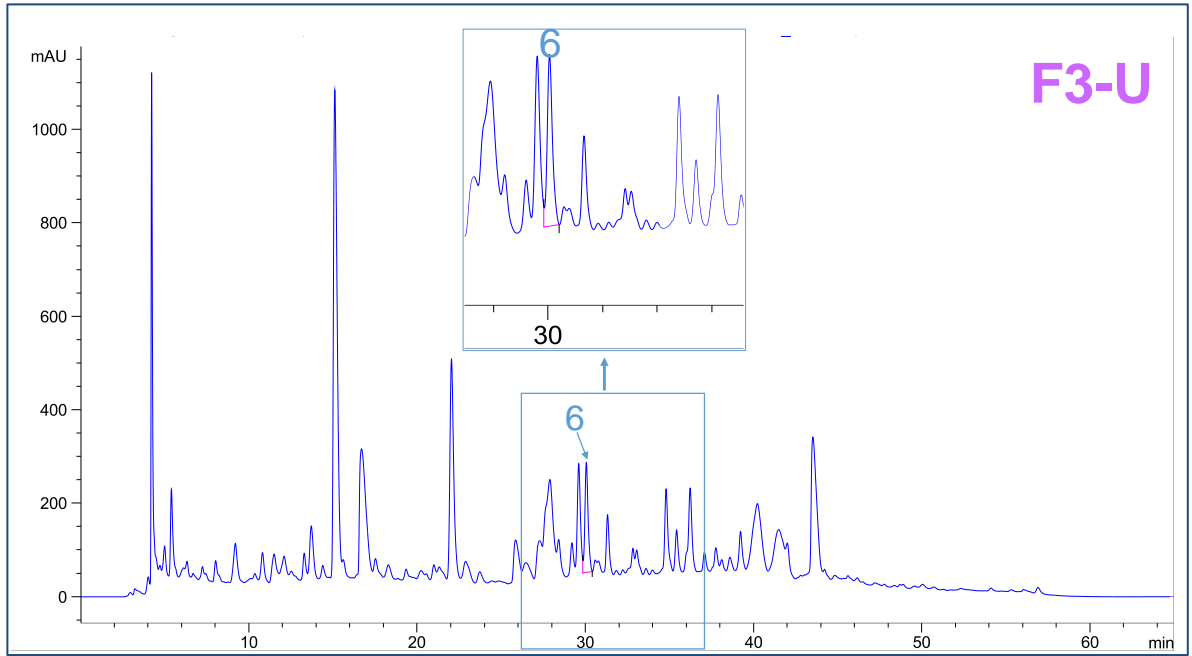
Fuente: Esta investigación.

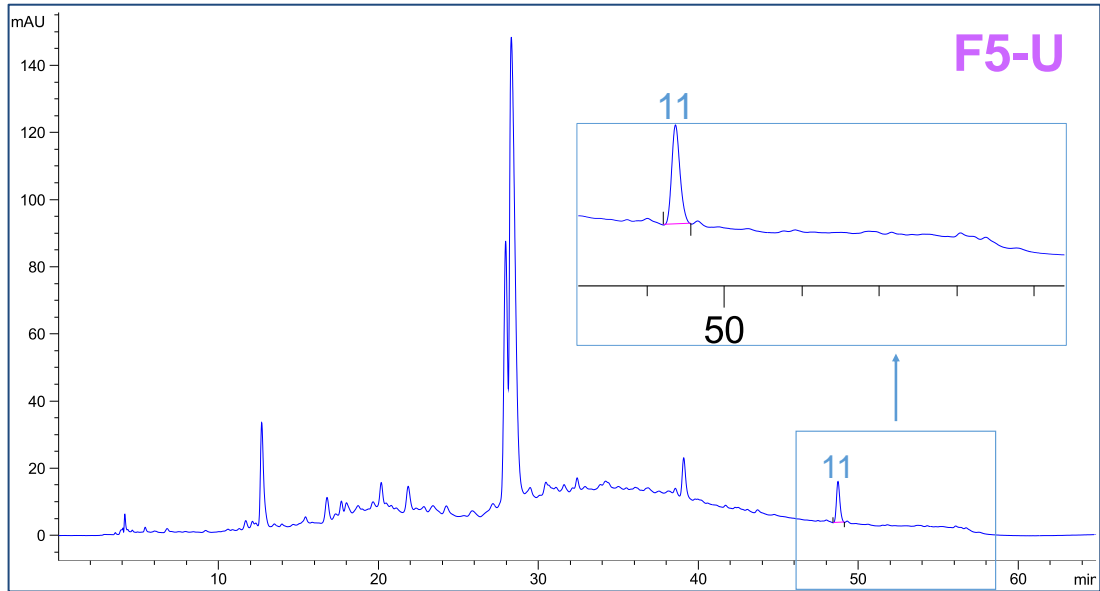
ANEXO F: Perfiles cromatográficos de F3-M, F4-M, F5-M, F3-U, F4-U, F5-U registrados a 360 nm





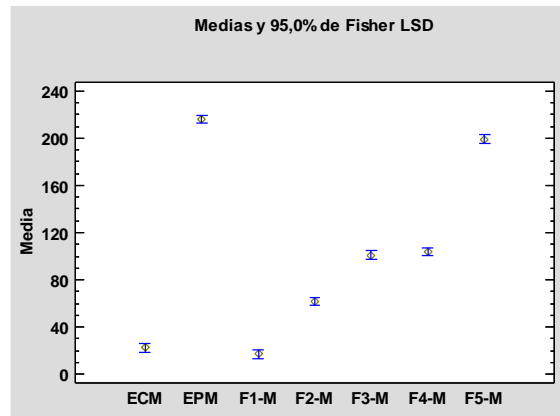






Fuente: Esta investigación

ANEXO G. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones de *T.mollis*.



Método: 95,0 porcentaje LSD

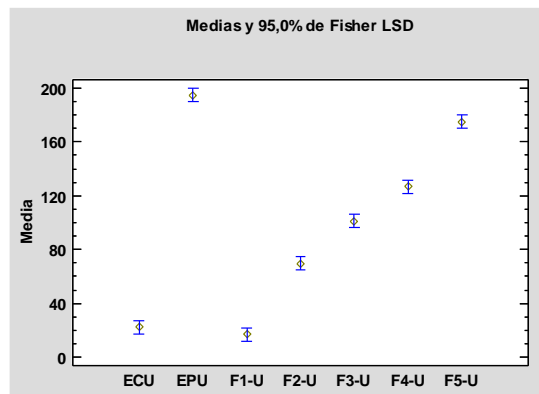
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F1-M	3	17,14	X
ECM	3	22,39	X
F2-M	3	61,9	X
F3-M	3	100,82	X
F4-M	3	103,71	X
F5-M	3	199,33	X
EPM	3	216,09	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ECM - EPM	*	-193,7	7,06726
ECM - F1-M		5,25	7,06726
ECM - F2-M	*	-39,51	7,06726
ECM - F3-M	*	-78,43	7,06726
ECM - F4-M	*	-81,32	7,06726
ECM - F5-M	*	-176,94	7,06726
EPM - F1-M	*	198,95	7,06726
EPM - F2-M	*	154,19	7,06726
EPM - F3-M	*	115,27	7,06726
EPM - F4-M	*	112,38	7,06726
EPM - F5-M	*	16,76	7,06726
F1-M - F2-M	*	-44,76	7,06726
F1-M - F3-M	*	-83,68	7,06726
F1-M - F4-M	*	-86,57	7,06726
F1-M - F5-M	*	-182,19	7,06726
F2-M - F3-M	*	-38,92	7,06726
F2-M - F4-M	*	-41,81	7,06726
F2-M - F5-M	*	-137,43	7,06726
F3-M - F4-M		-2,89	7,06726
F3-M - F5-M	*	-98,51	7,06726
F4-M - F5-M	*	-95,62	7,06726

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación.

ANEXO H. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para el CFT de extractos y fracciones de *T.urvilleana*.



Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F1-U	3	16,8	X
ECU	3	22,39	X
F2-U	3	69,65	X
F3-U	3	101,35	X
F4-U	3	126,6	X
F5-U	3	174,89	X
EPU	3	194,79	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ECU - EPU	*	-172,4	9,67218
ECU - F1-U		5,59	9,67218
ECU - F2-U	*	-47,26	9,67218
ECU - F3-U	*	-78,96	9,67218
ECU - F4-U	*	-104,21	9,67218
ECU - F5-U	*	-152,5	9,67218
EPU - F1-U	*	177,99	9,67218
EPU - F2-U	*	125,14	9,67218
EPU - F3-U	*	93,44	9,67218
EPU - F4-U	*	68,19	9,67218
EPU - F5-U	*	19,9	9,67218
F1-U - F2-U	*	-52,85	9,67218
F1-U - F3-U	*	-84,55	9,67218
F1-U - F4-U	*	-109,8	9,67218
F1-U - F5-U	*	-158,09	9,67218
F2-U - F3-U	*	-31,7	9,67218
F2-U - F4-U	*	-56,95	9,67218
F2-U - F5-U	*	-105,24	9,67218
F3-U - F4-U	*	-25,25	9,67218
F3-U - F5-U	*	-73,54	9,67218
F4-U - F5-U	*	-48,29	9,67218

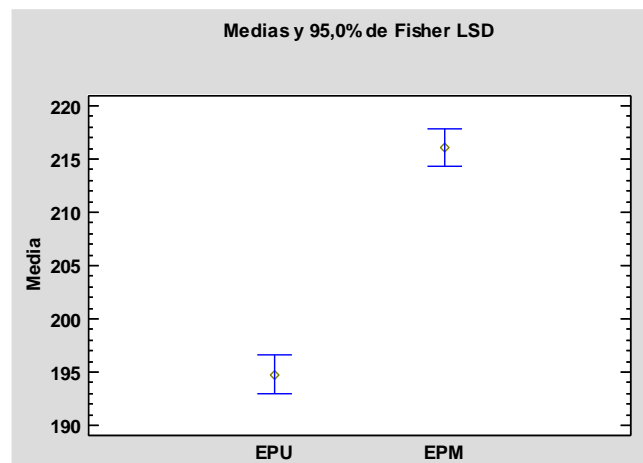
\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación.

ANEXO I. Prueba de múltiples rangos y gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher del CFT para los extractos purificados y fracción de mayor peso molecular de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
EPU - EPM	*	-21,3	3,58213

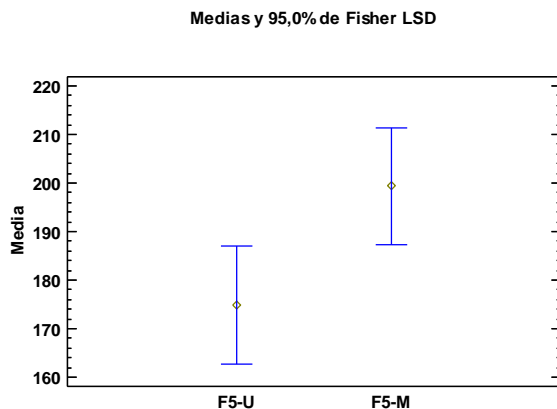
\* indica una diferencia significativa.



Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
F5-U - F5-M	*	-24,44	24,1451

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación.



ANEXO J. Compuestos mayoritarios identificados parcialmente en las fracciones aisladas de *T.mollis* y *T.urvilleana*.

$\lambda$ (nm)	FRACCIÓN	COMPUESTOS MAYORITARIOS Identificados parcialmente
520	F1-M F1-U	Petunidina-3-O-glucósido
		Malvidina-3-O-glucósido
		Petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
	F2-M F2-U	Cianidina-3-O-glucósido
		Petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
		Petunidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
	F3-M F3-U	Malvidina-3-pcumaroil-3-O-glucósido
		Cianidina-3-O-glucósido
		Cianidina-3-O-glucósido
360	F4-M F5-U	Quercetina-3-O-glucorónido
		Quercetina-3-O-glucósido
		Quercetina
		Miricetina

Fuente: Esta investigación.

ANEXO K. Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos crudos, purificados y fracciones de *T.mollis*.

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F1-M	3	1,24	X
ECM	3	1,7	X
F2-M	3	3,85	X
F3-M	3	6,85	X
F4-M	3	7,8	X
F5-M	3	13,97	X
EPM	3	14,83	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ECM - EPM	*	-13,13	0,449308
ECM - F1-M	*	0,46	0,449308
ECM - F2-M	*	-2,15	0,449308
ECM - F3-M	*	-5,15	0,449308
ECM - F4-M	*	-6,1	0,449308
ECM - F5-M	*	-12,27	0,449308
EPM - F1-M	*	13,59	0,449308
EPM - F2-M	*	10,98	0,449308
EPM - F3-M	*	7,98	0,449308
EPM - F4-M	*	7,03	0,449308
EPM - F5-M	*	0,86	0,449308
F1-M - F2-M	*	-2,61	0,449308
F1-M - F3-M	*	-5,61	0,449308
F1-M - F4-M	*	-6,56	0,449308
F1-M - F5-M	*	-12,73	0,449308
F2-M - F3-M	*	-3,0	0,449308
F2-M - F4-M	*	-3,95	0,449308
F2-M - F5-M	*	-10,12	0,449308
F3-M - F4-M	*	-0,95	0,449308
F3-M - F5-M	*	-7,12	0,449308
F4-M - F5-M	*	-6,17	0,449308

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación.

ANEXO L. Prueba de Múltiple Rangos para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos crudos, purificados y fracciones de *T.urvilleana*.

Método: 95,0 porcentaje LSD

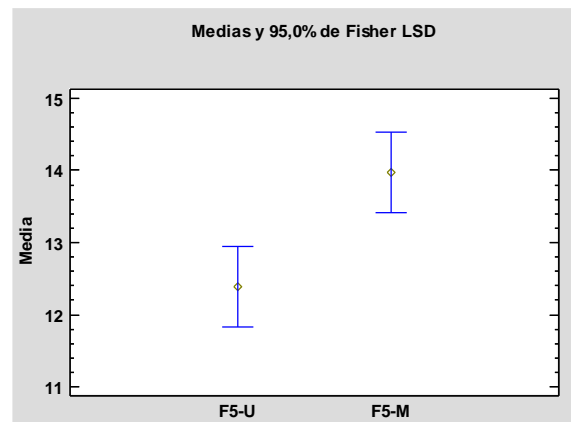
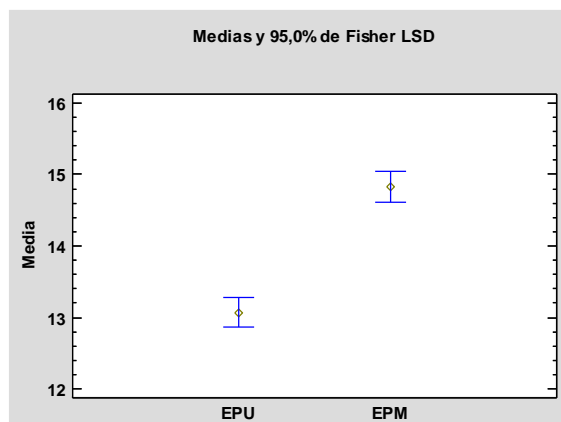
	Casos	Media	Grupos Homogéneos
F1-U	3	1,02	X
ECU	3	1,43	X
F2-U	3	6,75	X
F3-U	3	6,98	X
F4-U	3	8,29	X
F5-U	3	12,38	X
EPU	3	13,07	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ECU - EPU	*	-11,64	0,531034
ECU - F1-U		0,41	0,531034
ECU - F2-U	*	-5,32	0,531034
ECU - F3-U	*	-5,55	0,531034
ECU - F4-U	*	-6,86	0,531034
ECU - F5-U	*	-10,95	0,531034
EPU - F1-U	*	12,05	0,531034
EPU - F2-U	*	6,32	0,531034
EPU - F3-U	*	6,09	0,531034
EPU - F4-U	*	4,78	0,531034
EPU - F5-U	*	0,69	0,531034
F1-U - F2-U	*	-5,73	0,531034
F1-U - F3-U	*	-5,96	0,531034
F1-U - F4-U	*	-7,27	0,531034
F1-U - F5-U	*	-11,36	0,531034
F2-U - F3-U		-0,23	0,531034
F2-U - F4-U	*	-1,54	0,531034
F2-U - F5-U	*	-5,63	0,531034
F3-U - F4-U	*	-1,31	0,531034
F3-U - F5-U	*	-5,4	0,531034
F4-U - F5-U	*	-4,09	0,531034

\* indica una diferencia significativa.

Fuente: Esta investigación.

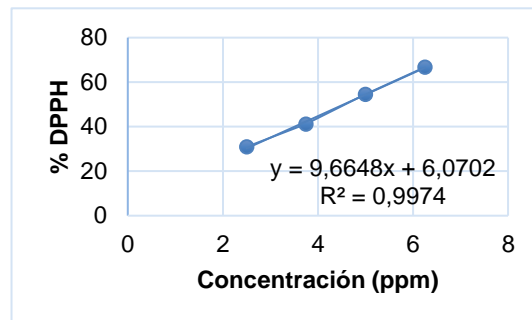
ANEXO M. Gráfica de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la actividad antioxidante equivalente al TROLOX (TEAC) en los extractos purificados y fracción de mayor peso molecular de *T.mollis* y *T.urvilleana*.



Fuente: Esta investigación.

ANEXO N. Construcción de las curvas dosis-respuesta para los extractos crudos y purificados de *T.mollis* y *T.urvilleana*

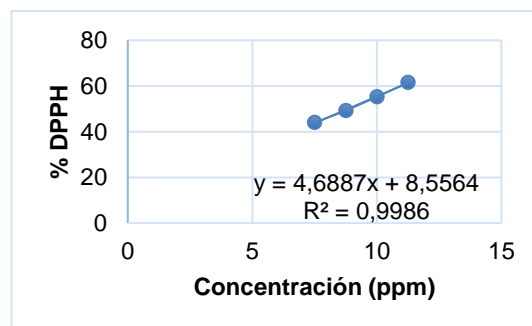
Absorbancia control: 1,27



ECM (µg/mL)	Absorbancia <sup>a</sup> ± DE	% Inhibición de DPPH
7,5	0,711 ± 0,0281	43,9895013
8,75	0,644 ± 0,0225	49,2650919
10	0,568 ± 0,0235	55,2755906
11,25	0,489 ± 0,0197	61,5223097

<sup>a</sup>Promedio de 3 réplicas

Absorbancia control: 1,235

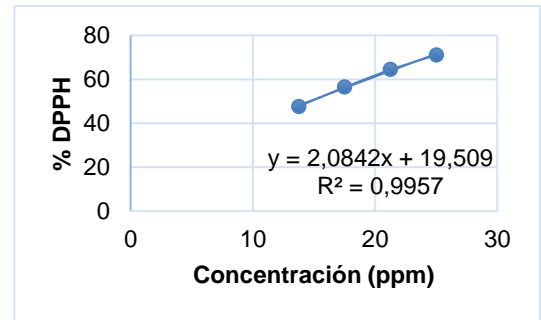


EPM (µg/mL)	Absorbancia <sup>a</sup> ± DE	% Inhibición de DPPH
2,5	0,853 ± 0,0520	30,9311741
3,75	0,727 ± 0,0176	41,1605938
5	0,561 ± 0,0231	54,6018893
6,25	0,411 ± 0,0262	66,7206478

<sup>a</sup>Promedio de 3 réplicas



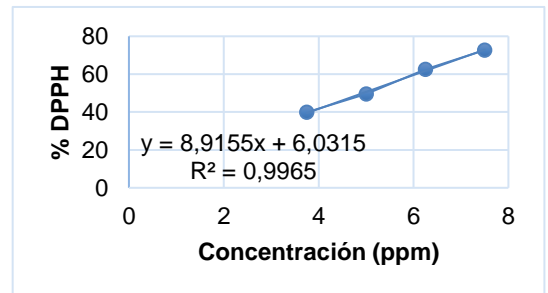
Absorbancia control: 1,349



ECU (µg/mL)	Absorbancia <sup>a</sup> ± DE	% Inhibición de DPPH
13,75	0,707 ± 0,0081	47,6155177
17,5	0,587 ± 0,0085	56,4862861
21,25	0,480 ± 0,0126	64,4427971
25	0,391 ± 0,0215	71,0155671

<sup>a</sup>Promedio de 3 réplicas

Absorbancia control: 1,349



ECU (µg/mL)	Absorbancia <sup>a</sup> ± DE	% Inhibición de DPPH
3,75	0,763 ± 0,0031	39,8950131
5	0,641 ± 0,0108	49,5275591
6,25	0,475 ± 0,0042	62,6246719
7,5	0,347 ± 0,0121	72,6771654

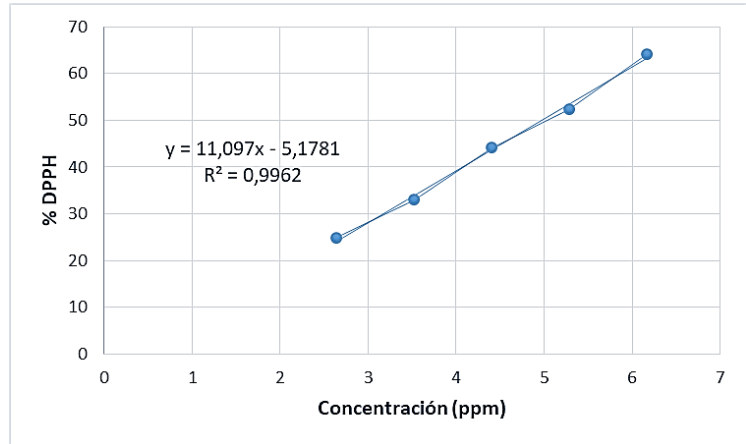
<sup>a</sup>Promedio de 3 réplicas

Fuente: Esta investigación.

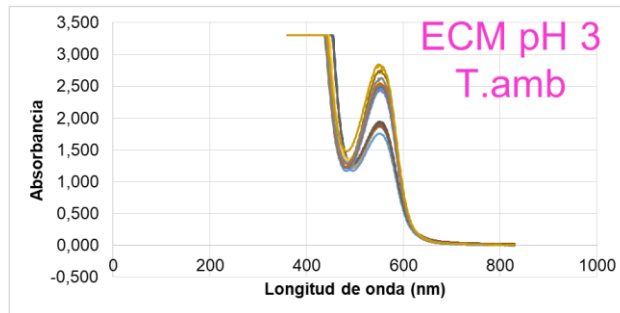
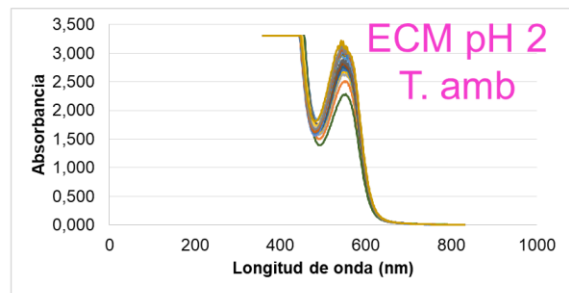
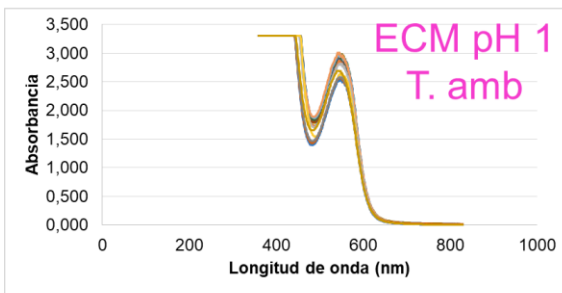
ANEXO O. Curva dosis respuesta para el control ácido ascórbico usado en DPPH

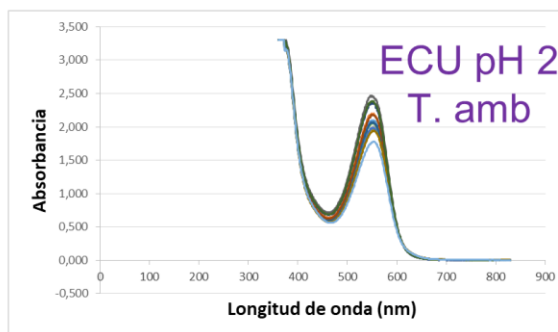
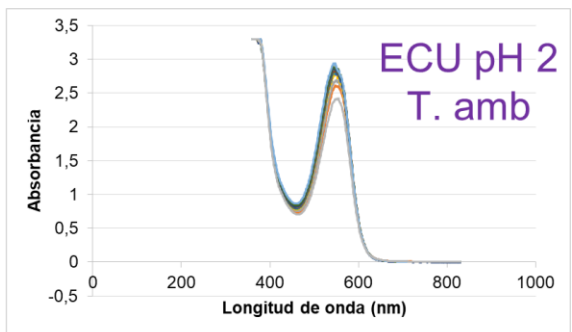
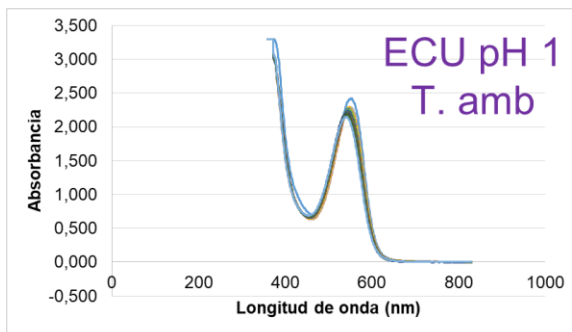
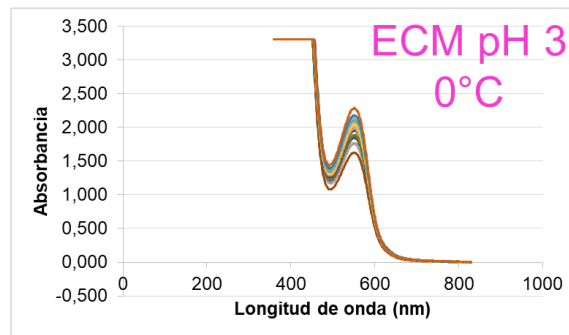
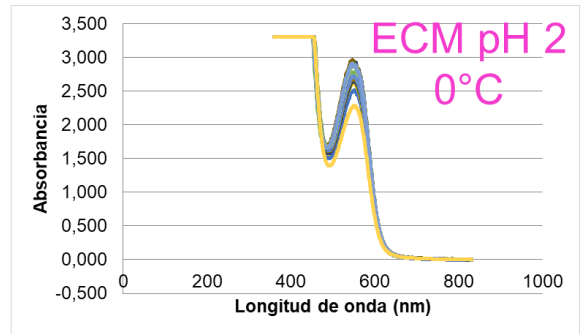
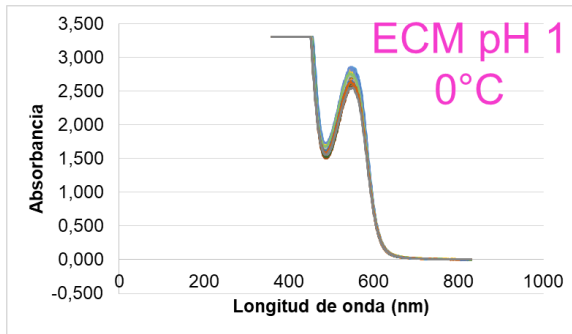
Patrón ppm	%DPPH
2,642	24,88448845
3,522	33,00330033
4,403	44,12541254
5,284	52,31023102
6,164	64,09240924

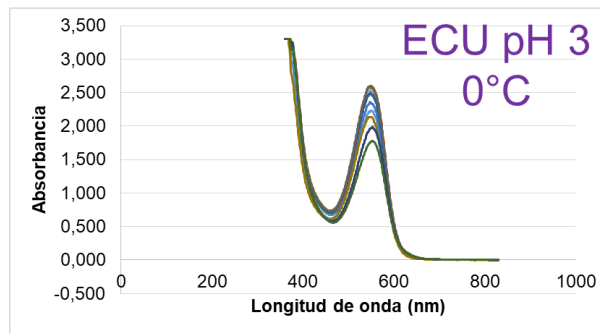
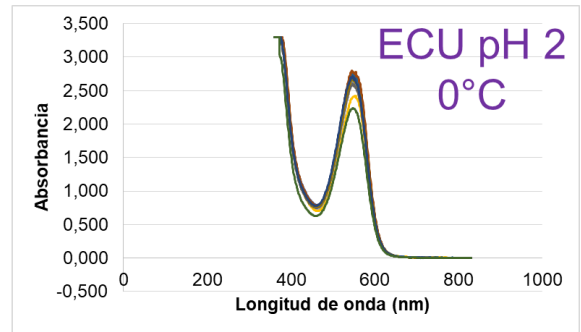
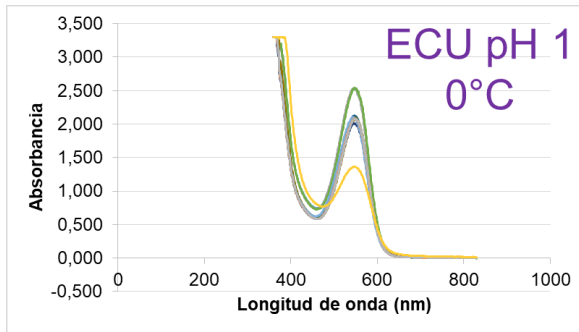
Fuente: Esta investigación.



ANEXO P. ECM y ECU a pH 1, 2, 3 y T. ambiente y 0°C







Fuente: Esta investigación

## ANEXO Q: Parámetros CIELAB

